Untersuchungen zur systemischen Verteilung von Eisenoxid-Nanopartikeln im Organismus nach intravenöser Applikation sowie zum therapeutischen Effekt von wirkstoffassoziierten Nanopartikeln nach der Thermotherapie im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Tobias Deigner aus Waiblingen

2013

Diese Arbeit wurde in dem Zeitraum vom Juni 2009 bis August 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer H. Müller am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in Kooperation mit der MagForce AG angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller

2. Gutachter: Prof. Michael Dittgen

Disputation am 24. Januar 2014



Während der Promotion und der Erarbeitung der vorliegenden Dissertation haben mich viele Personen begleitet und unterstützt. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

In erster Linie gilt mein Dank Prof. Dr. Rainer H. Müller, für dessen Betreuung und für die Möglichkeit ein Teil der Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Andreas Jordan für das spannende Thema und die Finanzierung der Arbeit, sowie für die Hilfestellungen und das bei ihm Gelernte bedanken.

Für das gute Arbeitsklima sowie für die fachliche und persönliche Unterstützung möchte ich mich vor allem bei Dr. Christian Sänger, Stefan Zornow, Catrin Schmidt, Jiang Gao und dem ganzen MagForce-Team bedanken.

Bei Inge Volz möchte ich mich für die tatkräftige Hilfe bei den HPLC-Messungen bedanken.

Ein gesonderter Dank geht an Nils Bohmer, der mir immer als Freund und Kollege hilfreich zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau Bianca dafür danken, dass sie stets an mich glaubte und mir den Rücken stärkte.

Inhaltsverzeichnis

<u>1. </u>	EINLEITUNG	<u>8</u>
1.1	ZIELE DER ARBEIT	8
1.2	Tumor	8
1.3	EPR EFFEKT	10
1.4	MAGNETISCHE NP	12
1.5	Hyperthermie	14
1.6	ZYTOSTATIKA	17
1.6.1	1 CisPlatin	17
1.6.2	2 Doxorubicin	18
1.6.3	3 Methotrexat	19
1.6.4	4 Paclitaxel	19
<u>2.</u> <u>I</u>	MATERIAL UND METHODEN	<u> 21</u>
2.1	ZELLKULTUR	21
2.1.1	<u> </u>	
2.1.2	2 Passage der kultivierten Zellen	22
2.1.3	3 Bestimmung der Zellzahl	23
2.1.4	4 Mediumwechsel	23
2.1.5	5 Mykoplasmentest mit DAPI	23
2.1.6	6 Verdopplungszeit (PDT) bestimmen	24
2.1.7	7 MTT-Assay	24
2.2	C3H-MAMMAKARZINOM-MODELL DER MAUS	25
2.2.1	1 Haltungsbedingungen	25
2.2.2	2 Ohrmarkierungen bei Tierversuchen	26
2.2.3	3 Tumorimplantation	26
2.2.4	4 Tumorvolumen bestimmen	27
2.2.5	5 Narkosen	27
2.2.6	6 NP-Applikation i.v./i.t	27
2.3	Hyperthermie	29
2.3.1	1 MFH (<i>Magnetic Fluid Hyperthermia</i>)	29
2.3.2	2 WBH (<i>Water Bath Hyperthermia</i>)	29
2.4	ANALYTIK	30
2.4.1	1 Aufschluss Säure/Mikrowelle	30
2.4.2	2 Bestimmung des Fisengehaltes	31

Inhalsverzeichnis

2.5	STATISTIK
2.6	PEGYLIERTE NP
2.6.1	in vitro Versuche32
2.6.2	in vivo Versuche34
2.7	CISPT-NP
2.7.1	in vitro Versuche35
2.7.2	in vivo Versuche36
2.8	DOX-NP
2.8.1	in vito Versuche38
2.8.2	in vivo Versuche39
2.9	MTX-NP 40
2.9.1	in vitro Versuche40
2.9.2	in vivo Versuche41
2.10	PCX-NP41
2.10.	1 <i>in vitro</i> Versuche41
2.10.	2 <i>in vivo</i> Versuche45
3. <u>E</u>	RGEBNISSE47
	SYSTEMISCHE VERTEILUNG VON FEOX-NP NACH I.V. APPLIKATION
	PEGylierte NP
	.1 <i>in vitro</i> Versuche
	.2 <i>in vivo</i> Versuche51
	THERAP. EFFEKT VON WIRKSTOFFASSOZIIERTEN FEOX-NP NACH I.T. APPLIKATION 54
3.2.1	CisPt-NP54
	.1 <i>in vitro</i> Versuche
3.2.1	
	DOX-NP
3.2.2	
3.2.2	
3.2.3	MTX-NP65
3.2.3	
3.2.3	
	PCX-NP69
3.2.4	
3.2.4	.2 <i>in vivo</i> Versuche78
<u>4.</u> <u>C</u>	DISKUSSION ZU DEN <i>IN VIVO</i> STUDIEN80

Inhalsverzeichnis

4.1	SYSTEMISCHE VERTEILUNG VON FEOX-NP NACH I.V. APPLIKATION	80
4.1.1	PEGylierten NP	80
4.2	THERAP. EFFEKT VON WIRKSTOFFASSOZIIERTEN FEOX-NP NACH I.T. APPLIKATION	82
4.2.1	CisPt-NP	82
4.2.2	DOX-NP	84
4.2.3	MTX-NP	86
4.2.4	PCX-NP	87
4.2.5	Zusammenfassung der Studien	89
<u>5.</u> <u>z</u>	ZUSAMMENFASSUNG IN DEUTSCH UND ENGLISCH	93
<u>6.</u> <u>F</u>	PUBLIKATIONEN	9 <u>5</u>
<u>7. </u>	ANHANG	9 <u>6</u>
7.1	ABKÜRZUNGEN	96
7.2	ABBRUCHKRITERIEN PILOTSTUDIE	99
7.3	CHEMIKALIEN	100
7.4	Puffer und Lösungen	101
7.5	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	103
8. L	.ITERATURVERZEICHNIS	106

1. Einleitung

1.1 Ziele der Arbeit

Es wurden vier wirkstoffassoziierte Nanopartikel-Konjugate für eine intratumorale Applikation hergestellt und deren therapeutischer Effekt im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus geprüft. Die Konjugate aus superparamagnetischen Nanopartikeln und Zytostatika wurden durch die Art der Bindung so konstruiert, dass eine thermosensitive, lokale Freisetzung der therapeutisch wirksamen Substanz mittels eines externen Magnetwechselfeldes möglich war. Mit Hilfe dieser NP-Konjugate sollte eine neuartige Form der Thermo-Chemotherapie entwickelt werden, indem der synergistische Effekt der Hyperthermie mit dem zytotoxischen Effekt des Wirkstoffes lokal kombiniert wurde. Der daraus resultierende therapeutische Effekt wurde über das Tumorvolumen ermittelt.

Des Weiteren wurden Eisenoxid-Nanopartikel mit Polyethylenglycol (PEG) modifizierter Oberfläche eingesetzt, mit der die Anreicherung der Partikel in den Organen und im Tumor nach systemischer Applikation zeitabhängig im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus untersucht wurde. Zusätzlich wurde getestet, ob es möglich ist, durch eine regionale Erwärmung des Tumors die passive Anreicherung im Tumor zu steigern.

Die Erkenntnisse dieser Studien können für kommende Therapieformen mit wirkstoffgekoppelten Nanopartikeln von großem Interesse sein.

1.2 Tumor

Nach einer Schätzung des Robert Koch-Instituts sind im Jahr 2008 rund 470 000 Menschen in Deutschland neu an Krebs erkrankt, das sind 70 000 bis 80 000 mehr als zehn Jahre zuvor. Für das Jahr 2012 rechnete das Robert Koch-Institut mit knapp 490 000 Erkrankungen. Der wesentliche Grund für den Anstieg ist die zunehmende Zahl älterer Menschen, da die meisten Krebserkrankungen in höherem Alter auftreten. Hinzu kam ein erwarteter Anstieg beim Brustkrebs in der ersten Phase des bundesweiten Mammographie-Screening-Programms. Brustkrebs macht bei den Frauen etwa ein Drittel aller Fälle aus, bei den Männern ist Prostatakrebs mit einem Anteil von etwa 25 % nach wie vor die häufigste Krebsart (siehe Abbildung 1.2-1). Durch die Therapiefortschritte ist der Anteil der Todesfälle unter den Krebspatienten weiter gesunken. Vor 1980 starben mehr als zwei Drittel an ihrer Krebserkrankung, heute sind es weniger als die Hälfte [1].

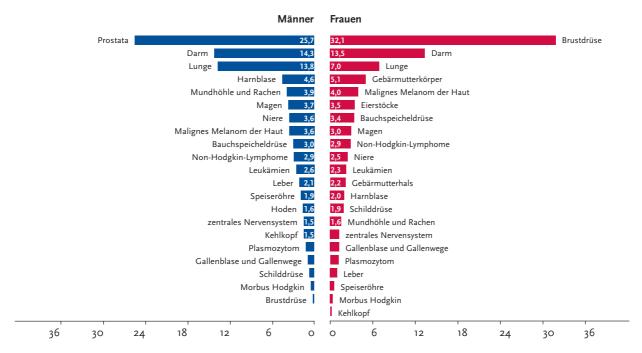


Abbildung 1.2-1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 nach Geschlecht (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Auflage, 2012)

Krebs ist keine Erkrankung der Neuzeit, sondern begleitet die Menschheit wahrscheinlich von ihrem Beginn an. 1931 wurde von Gustav Riek der Schädel eines frühen Menschen geborgen, der auf ein Alter von 32 500 Jahren datiert wurde. 2002 konnte nachgewiesen werden, dass dieser Mensch an einem Meningeom gestorben war [2]. Auch aus der vorchristlichen ägyptischen und griechischen Kultur sind zahlreiche Schilderungen von Tumorerkrankungen bekannt [3].

Unter dem Begriff "Tumor" versteht man im Allgemeinen die abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welche durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Der Begriff "Krebs" steht für maligne (bösartige) Tumoren, die sich von benignen (gutartigen) Tumoren durch infiltratives und schnelles Wachstum, einer unscharfer Begrenzung sowie der Fähigkeit zur Metastasenbildung unterscheiden [4]. Nach einer operativen Resektion können benigne Tumoren in der Regel als geheilt betrachtet werden, wohingegen bei malignen Tumoren oft Rezidive auftreten.

Gegliedert werden alle Tumoren nach der Herkunft ihrer Zellen. Epitheliale Tumoren entstehen aus den oberflächlichen Zellen der Haut und der Schleimhäute sowie aus den Zellen der Drüsen. Die benignen Tumoren lassen sich unterteilen in Adenome (Drüsentumoren) und Papillome (Tumoren des Deckepithels). In der malignen Form bezeichnet man sie als Karzinome. Benigne Tumoren aus dem mittleren Keimblatt der

Embryonalentwicklung sind je nach ihrem Gewebetyp z.B. Myome, wenn sie aus Muskelzellen bestehen, Lipome aus Fettzellen, Osteome aus Knochenzellen usw. Die bösartigen Tumoren dieser Gruppe sind die Sarkome. Aus den Blutzellen entstehen die durchweg bösartigen Lymphome und Leukämien [5].

Tumoren entstehen durch den Verlust der zellulären Proliferationskontrolle, aufgrund von Mutationen bzw. Veränderungen im Genom, was zu einem unregulierten Wachstum führt. Sie wachsen in der Regel klonal, d. h. sie entstehen aus einer einzelnen entarteten Zelle. Ursachen hierfür sind neben Erbfaktoren Umweltsubstanzen wie Verbrennungsprodukte im Tabakrauch und in den Autoabgasen, aber auch verschiedene Chemikalien. Weitere Ursachen können energiereiche Strahlen (UV-, Atom-, kosmische Strahlen), Infektionskrankheiten (vor allem durch Viren bedingt) und Ernährungsfaktoren sein [5].

Das rasche Wachstum der Tumoren braucht Energie, zu dessen Gewinnung Sauerstoff benötigt wird, der über das Blut transportiert wird. Eine Neubildung von Blutgefäßen, die Angionese im Tumorgewebe, sorgt für eine ausreichende Durchblutung. Die morphologischen Besonderheiten, die durch das schnelle Wachstum auftreten, sind unter 1.3 beschrieben.

Die zwei größten Herausforderungen bei der effektiven Bekämpfung von Krebs sind zum einen die frühzeitige Erkennung der Tumoren, um mit einer Therapie beginnen zu können bevor der Tumor zu groß ist, und zum anderen eine Behandlungsmethode zu finden, durch die der Tumor effektiv therapiert werden kann ohne die gesunden Zellen des Organismus dabei zu sehr zu schädigen [6]. Es gibt eine Vielzahl an Diagnoseverfahren, die ständig verbessert und verfeinert werden, um dem ersteren Punkt gerecht zu werden. Hierzu zählen Methoden wie Ultraschall, Endoskopie, Computer- und Kernspintomographie, Szintigraphie und die Positronen-Emissions-Tomographie. Zu den üblichen Behandlungsmethoden gehören in erster Linie die Resektion sowie die Radio- und Chemotherapie. Die Chemotherapie muss noch mehr als die Strahlentherapie die Grenzen zwischen Schaden und Nutzen beachten, da alle Zytostatika entsprechende Nebenwirkungen haben. Die heute kaum noch überschaubare Fülle der Medikamente wird ergänzt durch die Notwendigkeit, verschiedene wirksame Mittel und Therapieformen in Kombination einzusetzen [5].

1.3 EPR Effekt

Wenn sich Tumorzellen vermehren und zu Clustern von 2–3 mm zusammenlagern, wird die Angiogenese induziert, um den ständig steigenden Nährstoff- und Sauerstoffbedarf des wachsenden Tumors zu gewährleisten [7]. Diese neu gebildeten Gefäße unterscheiden sich im Aufbau stark von denen des normalen Gewebes [8]. Die Blutgefäße der Tumoren z. B.

sind in ihrer Form unregelmäßig, dadurch erweitert und durchlässig oder defekt. Die Endothelzellen sind ungleichmäßig angeordnet wodurch große Zwischenräume (10–1000 nm) entstehen [9]. Auch die perivaskulären Zellen und die Basalmembran sowie die glatte Muskulatur der Gefäßwände sind häufig abwesend oder abnormal. Neben weitlumigen Gefäßen besitzt das Tumorgewebe eine schlechte Lymphdrainage [10, 11]. Diese anatomischen Mängel und Abnormalitäten führen zu einem umfangreichen Austreten von Blutplasmakomponenten in das Tumorgewebe wie z. B. Makromoleküle, Lipidteilchen oder auch Nanopartikel in der Größenordnung von 20–200 nm (vgl. Abbildung 1.3-1). Zusätzlich führt der langsame venöse Rückstrom aus dem Tumorgewebe [12] und der schlechte lymphatische Abtransport dazu, dass die Makromoleküle in dem Tumor zurückgehalten werden. Dieses Phänomen der erhöhten Permeabilität und Retention, der sogenannte EPR-Effekt (*Enhanced Permeability and Retention*), wurde von Matsumura and Maeda entdeckt [10] und tritt bei fast allen schnell wachsenden, soliden Tumoren auf [13].

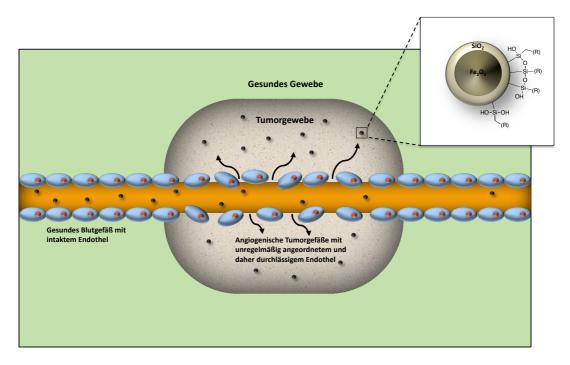


Abbildung 1.3-1: Schematische Darstellung des EPR Effektes

Durch den EPR-Effekt ist es möglich Nanopartikel passiv im Tumor anzureichern. Hierfür ist es optimal, wenn die NP vom Immunsystem unerkannt bleiben und lange Zirkulationszeiten im Kreislauf haben. Auf diese Weise können nach 1–2 Tagen 10–50-fach höhere Konzentrationen in Tumoren erreicht werden, als in gesunden Geweben [14].

Um eine gute passive Anreicherung in Tumoren zu erhalten, sind drei Eigenschaften der NP besonders wichtig:

- Die Größe sollte zwischen 10 und 100 nm liegen. Sie müssen einerseits größer als 10 nm sein, um die Filtration durch die Nieren zu vermeiden, andererseits sollten sie kleiner als 100 nm sein, damit sie nicht von den Kupffer-Zellen der Leber phagozytiert werden.
- 2. Die Ladung der Partikel sollte neutral oder anionisch sein, damit sie nicht renal ausgeschieden werden.
- 3. Die Partikel dürfen nicht von dem retikuloendothelialen System (RES) erkannt werden, da sie ansonsten opsonisiert und anschließend phagozytiert werden [15, 16]. Dies lässt sich z. B. durch eine PEGylierung realisieren.

Ein weiterer Punkt der beachtet werden sollte ist der erhöhte interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) in Tumoren. Er kann einen effizienten Wirkstofftransport in den Tumor einschränken. Viele Wirkstoffe, insbesondere Verbindungen mit hohem Molekulargewicht, werden aus dem Kreislaufsystem in den interstitiellen Raum eher durch Konvektion als durch Diffusion transportiert. Der erhöhte IFP trägt zu einer verringerten Extravasation bei, was zu einer verringerten Wirkstoffaufnahme in den Tumor führt. Zusätzlich scheint der IFP im Tumorzentrum höher zu sein als in der Tumorperipherie, wodurch es erschwert wird alle Tumorzellen gleichmäßig mit Wirkstoff zu erreichen [17, 18]. Aufgrund der Größe sind wirkstoffbeladene Transportsysteme von dem erhöhten IFP weniger betroffen als kleinere Moleküle.

Die Kombination aus dem erhöhten IFP und der verminderten Lymphdrainage erklären die Beziehung zwischen Partikelgröße und EPR-Effekt. Größere Partikel (100 nm) werden im Tumor besser zurückgehalten, wohingegen kleinere Moleküle wieder leicht aus dem Tumor diffundieren können [19].

1.4 Magnetische NP

Laut National Nanotechnology Initiative (NNI) werden Nanopartikel als Strukturen, Einheiten oder Systeme definiert, die einen Durchmesser von 1–100 nm aufweisen. Häufig ändern sich anhand der geringen Größe die bekannten Eigenschaften der Materialien. So ändern sich zum Beispiel die magnetischen Eigenschaften von Eisenpartikeln (Ferro- bzw. Ferrimagnetismus zu Superparamagnetismus), sobald die Kristallgröße kleiner als die der magnetischen Domänen wird [20]. Nanopartikel sind somit deutlich kleiner als humane Zellen (10–20 μ m). Sie sind von der Größe mit Makromolekülen wie Enzymen und

Rezeptoren vergleichbar. Hämoglobin hat z.B. einen Durchmesser von 5 nm und die Lipiddoppelschicht von Zellen ist ca. 6 nm dick [21]. Aufgrund ihrer geringen Größe können tausende Nanopartikel von Zellen akkumuliert werden, wie z.B. das Kontrastmittel Gadolinium, wodurch die Sensitivität des Kontrastes im MRT verbessert wird und Tumoren somit in früheren Stadien erkannt werden können [22].

Für eine intravenöse Applikation sollten die Partikel klein genug sein (<200 nm), um nicht sofort von der Milz oder dem retikuloendothelialen System der Leber aus dem Blut filtriert zu werden [21]. Die Kupffer-Zellen der Leber können den Großteil des Eisens der Eisenoxid-Nanopartikel in Ferritin einbauen [23]. Auf der anderen Seite müssen die Partikel groß genug sein (>10 nm), um nicht renal ausgeschieden zu werden [24]. Aber nicht nur die Partikelgröße ist für einen Abbau verantwortlich. Unbeschichtete Nanopartikel werden vom Immunsystem schnell erkannt, opsonisiert und über Makrophagen des RES abgebaut [25]. Durch eine Beschichtung der Partikel, wie z. B. mit dem hydrophilen Polymer Polyethylenglycol (PEG), werden die Nanopartikel abgeschirmt, wodurch sich die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Protein verringern. Dies hat einen geringeren Abbau durch phagozytierende Zellen zur Folge, womit die Bluthalbwertszeit der Partikel deutlich verlängert wird [26].

Magnetische Nanopartikel kommen in vielen Gebieten zum Einsatz. Hierzu zählen ganz unterschiedliche Bereiche wie z.B. die Datensicherung, Herstellung von Lacken und Kosmetika aber auch biologische Anwendungen wie z.B. Wirkstoff-Screening, Zellseparation, Imaging (MRT), Diagnose und Monitoring von Krankheitsmarkern, Gewebserneuerung, Wirkstofftransport und die Hyperthermie sowie der jüngste Bereich Theranostik (Kombination aus Therapie und Diagnostik) [27, 28, 29, 30]. Für die Hyperthermie eignen sich unterschiedliche magnetische Nanopartikel. Neben den sogenannten SPIONs (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles), die hauptsächlich aus Magnetit (Fe₃O₄) und Maghemit (γ-Fe₂O₃) bestehen [28], werden auch Partikel bzw. Gemische aus Eisen mit Palladium, Kobalt, Mangan, Zink, Gadolinium, Kupfer und Nickel eingesetzt [31]. SPIONs sind typischerweise entweder aus einem Magnetit- oder Maghemitkern, der von einer biokompatiblen Schicht umgeben ist, oder aus einem porösen, biokompatiblem Polymer, in welchem die SPIONs eingelagert sind, aufgebaut [32]. Und obwohl sich die SPIONs im Vergleich zu manch anderen magnetischen Nanopartikeln weniger effizient erwärmen lassen [33], so besitzen die meisten Nanopartikel, die für die Hyperthermie eingesetzt werden (experimentell als auch kommerziell), einen Kern aus SPIONs. Gründe hierfür sind die gute Biokompatibilität, die Abbaubarkeit und die geringe Toxizität der SPIONs, wodurch sie sich für biomedizinische Anwendungen eignen [31].

1.5 Hyperthermie

Die Hyperthermie ist die bewusste Herbeiführung einer erhöhten Temperatur im Organismus und der vielleicht älteste Therapieansatz zur Tumorbehandlung. Bakterielle Infektionen und daraus resultierende, bewusst induzierte Fieberschübe waren bis nach dem Zweiten Weltkrieg Stand der Wissenschaft zur Versorgung von Patienten mit inoperablen malignen Tumoren [34].

Experimentelle Untersuchungen zur Hyperthermie mit magnetischen Nanopartikeln reichen zurück bis 1957, als Gilchrist *et al.* verschiedene Gewebsproben mit 20–100 nm großen Maghemit-Partikeln in einem magnetischen Feld mit 1,2 MHz erhitzte [35]. Seither wurde eine Vielzahl an weiteren Studien mit verschiedenen Materialien, variierenden Feldstärken und Frequenzen, sowie mit unterschiedlichen Applikationwegen der Nanopartikel veröffentlicht [31]. Die Nanopartikel wurden so entwickelt, dass sie im magnetischen Feld erhitzt werden können, wodurch sie sich für die Hyperthermie eignen.

Es kann zwischen vier verschiedenen Arten der Hyperthermie unterschieden werden:

- 1. Lokale Hyperthermie: Erwärmung von kleinen Arealen wie z. B. Tumoren
- 2. Regionale Hyperthermie: Erwärmung von größeren Bereichen wie z.B. ganzen Organen oder Extremitäten
- 3. Ganzkörper-Hyperthermie: Erwärmung des gesamten Organismus
- 4. Interstitielle Hyperthermie: Erwärmung des Tumors durch intratumorale Einbringung von Antennen oder Sonden

Es können verschiedene Techniken eingesetzt werden, um genügend Energie für eine Erwärmung in ein entsprechendes Areal zu transportieren. Als Beispiele hierfür seien Mikrowellen, Radiowellen, Infarot, Ultraschall oder Magnetfelder genannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Erwärmung mit Hilfe von FeOx-NP, die in einem extern angelegten Magnetwechselfeld erhitzt wurden, realisiert. Ziel ist es hierbei eine Temperatur zwischen 39–45 °C zu erhalten (Hyperthermie), wodurch die Zellen für eine Chemo- oder Radiotherapie sensibilisiert werden. Bei Temperaturen oberhalb von 46 °C spricht man von Thermoablation, in der das maligne Gewebe durch Denaturierung der Proteine direkt zerstört wird [36]. Im zweiteren Fall ist zu beachten, dass die, für die Thermoablation benötigte Temperatur zum Teil auch das gesunde Gewebe schädigen kann.

Die Rate, mit der die elektromagnetische Energie vom biologischen Material absorbiert wird, ist als SAR (*specific absorption rate*) definiert und wird in W/kg angegeben. Sie kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$SAR = c_i (\Delta T/\Delta t)$$

wobei c_i für die Wärmekapazität des Gewebes und $\Delta T/\Delta t$ für die Temperaturänderung über die Zeit steht. [31].

Superparamagnetismus und MFH

Bei der MFH (*magnetic fluid hyperthermia*) kommen superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel zum Einsatz, die sich im Magnetwechselfeld erwärmen. Superparamagnetismus tritt bei sehr kleinen ferro- und ferrimagnetischen Partikeln auf, sobald die Kristallgröße kleiner als die der magnetischen Domänen ist. Somit stellt jeder Partikel eine einzelne magnetische Domäne dar, in denen die Spins alle in eine Richtung ausgerichtet sind [20]. In Abwesenheit eines Magnetfeldes werden die Nanopartikel, und somit auch die magnetischen Domänen, durch thermische Energie immer wieder verändert, so dass das magnetische Moment der gesamten Suspension null ist [37]. Wird ein externes Magnetfeld angelegt, dann richten sich die magnetischen Domänen daran aus, wodurch die Suspension magnetisch wird. Die Nanopartikel-Suspension ist nur so lange magnetisch, wie ein externes Magnetfeld angelegt ist. Sobald das externe Magnetfeld abgeschalten wird, fällt das magnetische Moment der Supension wieder auf null.

Der Erwärmung der Eisenoxid-Nanopartikel im Magnetwechselfeld liegen zwei Mechanismen zu Grunde: die Brown-Rotation sowie die Néel-Relaxation. Das Anlegen eines Magnetwechselfeldes führt zur Rotation der Nanopartikel, wodurch die Wärme erzeugt wird. Beim Brown-Mechanismus rotiert der ganze Partikel in seiner Umgebung. Der Mechanismus wird durch die Relaxationszeit τB charakterisiert und ist von der Viskosität des Mediums abhängig (Gl.1). Der Néel-Mechanismus bezieht sich auf die Rotation des magnetischen Moments im Kern der Nanopartikel und wird von der magnetischen Anisotropie beeinflusst. Charakterisiert wird er durch die Relaxationszeit τN (Gl.2) [38].

Wie stark sich die Partikel erhitzen lassen hängt von den magnetischen Eigenschaften des Materials, der Stärke des Magnetfeldes, der angelegten Frequenz und von dem Wärmetransport aus dem Tumor durch die Blutzirkulation ab [29].

$$\tau_{B} = \frac{3 \times \eta \times V_{hyd}}{kT} \qquad (GI.1) \qquad \qquad \tau_{N} = \tau_{0} e^{\frac{KV_{Kern}}{kT}} \qquad (GI.2)$$

τΒ: Brown-Relaxationszeit τΝ: Neél-Relaxationszeit

η: Viskosität το: Vorfaktor

V_{hyd}: hydrodynamisches Volumen K: Anisotropiekonstante

k: Boltzmannkonstante V_{Kern}: Kernvolumen

T: Temperatur k: Boltzmannkonstante

T: Temperatur

Studien

Dass sich die SPIONS zur Hyperthermie eignen, wurde 1993 von Jordan et al. und Chan et al. demonstriert [38, 39]. Sie konnten zeigen, dass SPIONs die Energie eines Magnetwechselfeldes absorbierten und in Wärme umwandelten. Bedingt durch die Tatsache, dass Tumorzellen empfindlicher auf Erwärmung reagieren als gesundes Gewebe [40, 41], lässt sich die Hyperthermie in vivo nutzen, um Tumorgewebe durch Hyperthermie zu schädigen [31]. Hierbei kann das Tumorgewebe entweder durch Thermoablation (>46 °C) direkt zerstört oder durch moderatere Temperaturen (40-43 °C) für eine Chemo- bzw. Radiotherapie sensibilisiert werden [42]. Der synergistische Effekt der Hyperthermie in Kombination mit dem Einsatz von Zytostatika, wie z. B. Doxorubicin und Cisplatin, führt zu einem erhöhten zytotoxischen Effekt [43, 44]. Es ist bekannt, dass durch die Hyperthermie der Blutfluss und die vaskuläre Permeabilität in Tumoren erhöht wird, was einen verstärkten Wirkstofftransport in das Tumorgewebe zur Folge hat. Als weiterer Effekt der Hyperthermie ist die erhöhte Membranfluidität zu nennen, wodurch es zu einer verstärkten intrazellulären Aufnahme des Zytostatikums und damit zu einer Potentierung der Wirkung kommt [36, 44]. Des Weiteren konnte in Studien gezeigt werden, dass in den hypoxischen Bereichen eines aufgrund der schlechten vaskulären Perfusion, keine hohen Wirkstoffkonzentrationen erzielt werden können. Der erhöhte Blutfluss, hervorgerufen durch die Hyperthermie, führt zu einem verbesserten Sauerstoff- und Wirkstofftransport in diese hypoxischen Bereiche [45]. Die erhöhte Sauerstoffversorgung bietet zusätzlich eine optimale Voraussetzung für die Radiotherapie, in der die Tumorzellen mit Hilfe von γ-Strahlung und den strahleninduzierten Sauerstoffradikalen geschädigt werden [46].

Die Durchführbarkeit der Thermotherapie (MFH), sowie der synergistische Effekt der Hyperthermie in Kombination mit einer Radiotherapie, konnte sowohl in präklinischen wie auch in klinischen Studien gezeigt werden [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57]. Die erste klinische Studie wurde von Jordan *et al.* durchgeführt, in der Patienten, die ein Glioblastom Rezidiv aufwiesen, mit einer Radio-Thermotherapie behandelt wurden. In dieser einarmigen Studie konnte eine durchschnittliche Überlebensrate von 13,4 Monaten nach

Diagnose des Rezidivs und 23,2 Monaten nach Erstdiagnose des Glioblastoms erzielt werden [56, 58]. Dies war im Vergleich zu 6,2 und 14,6 Monaten aus Referenzstudien [59, 60] eine deutliche Verlängerung der Überlebensrate.

Bei längerer Erwärmung (<42,5 °C) oder nach einer kurzen, starken Erhitzung, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C, kann es zu einer Thermotoleranz der Zellen kommen [61]. Grund dafür sind Hitzeschockproteine (HSP, heat shock protein) die zelluläre Proteine stabilisieren können und sie damit vor einer Denaturierung schützen. Wenn die HSP-Konzentration hoch genug ist, kann dies den synergistischen Effekt der Hyperthermie und der Chemotherapie unterbinden. Daher sollte die Gabe des Zytostatikums möglichst zeitnah mit der Hyperthermie einhergehen, bevor die Schutzmechanismen der Zellen greifen können [36].

Dies ist einer der großen Vorteile der wirkstoffgekoppelten NP-Konjugate aus der vorliegenden Arbeit. Die thermosensitive Freisetzung des Zytostatikums findet erst durch die Hyperthermie statt, wodurch die Wirkstoffgabe und die Hyperthermie quasi zeitgleich stattfinden. Als weiterer Vorteil kommt hinzu, dass der Wirkstoff mit den Partikeln bereits lokal am Zielort vorliegt und daher sofort seine zytotoxische Wirkung erzielen kann.

1.6 Zytostatika

1.6.1 CisPlatin

Cisplatin (Cis-Diammindichloridoplatin; CisPt) ist ein Zytostatikum, das ein komplexgebundenes Platinatom enthält und zu der Gruppe der Alkylantien gehört. Alkylantien können Alkylgruppen in die DNA einbauen wodurch es zu einer Quervernetzung der Guanin Basen kommt. Dies verhindert eine korrekte Entwindung und Auftrennung der DNA. Damit wirkt sich Cisplatin sowohl auf die DNA Synthese bei der Replikation als auch auf die RNA bei der Transkription aus. Des Weiteren löst Cisplatin Punktmutationen in der DNA aus. All dies hat Funktionsstörungen im Zellstoffwechsel und bei der Zellteilung zur Folge, was zur Einleitung der Apoptose (programmierten Zelltod) führt. Cisplatin wird in der Tumortherapie bei unterschiedlichen Tumorarten eingesetzt. Mitunter kommt es bei Lymphomen, Leukämien und Mammakarzinomen zum Einsatz [62].



Abbildung 1.6-1: Strukturformel Cisplatin. Abbildung: http://www.drugbank.ca

In Kombination mit einer Hyperthermie konnten durch den Einsatz von CisPt vielversprechende Ergebnisse bei der Tumortherapie erzielt werden, wenn auch der Mechanismus der Potentierung bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnte [63]. Die zelluläre Aufnahme erfolgt über zwei Mechanismen. Zum einen aktiv über einen Kupfer-Transporter und zum anderen passiv über Diffusion durch die Zellmembran [64]. Derzeit wird davon ausgegangen, dass der aktive Transport der dominierende ist [65]. Sobald Cisplatin intrazellulär vorliegt, kann es aufgrund der dort herrschenden niedrigeren Chlorid-Ionenkonzentration hydrolysiert werden und geht damit in eine aktivere Form über, welche leichter mit der DNA reagiert [66]. Es wird vermutet, dass der synergistische Effekt von CisPt und MFH durch eine Änderung der Membranpermeabilität zu Stande kommt, wodurch CisPt über den passiven Transport verstärkt in die Zellen gelangt [44].

1.6.2 Doxorubicin

Abbildung 1.6-2: Strukturformel Doxorubicin. Abbildung: http://www.drugbank.ca

Doxorubicin gehört zur Stoffgruppe der Anthrazykline und wird als Zytostatikum zur Behandlung von Tumoren wie z.B. Mammakarzinomen, Bronchialkarzinomen und Lymphomen eingesetzt. Es kann in die DNA interkalieren und wird dabei über die Aminogruppen stabilisiert [67]. Durch die Interkalation werden die beiden DNA-Stränge miteinander verknüpft, wodurch sie bei der Transkription nicht mehr voneinander getrennt werden können. Dies hat eine Blockade der RNA Polymerase zur Folge. Dadurch wird die Proteinbiosynthese der betroffenen Zellen unterbunden. Neben der Interkalation kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen spezies*, ROS). ROS können zu Schäden in der RNA und DNA sowie in Lipiden und Proteinen führen, wodurch Membranschäden, Basenaustausch sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA hervorrufen werden. Doxorubicin ist ein sehr potenter Wirkstoff, der auf alle Zellen zytotoxisch und mutagen wirkt. Die sich daraus ergebenden Nebenwirkungen sind entsprechend vielseitig. Das größte Problem bereitet hierbei die kardiotoxischen Wirkungen. Das Doxorubicin

akkumuliert im Myokard und führt dort zur Bildung von ROS. Diese können im Herzmuskelgewebe durch fehlende Katalasen nicht inaktiviert werden, was zu einer Zerstörung des Gewebes führt [68].

1.6.3 Methotrexat

Methotrexat ist ein Analogon der Folsäure (Vitamin B₉) und wird als Zytostatikum in der Chemotherapie eingesetzt [69]. Es inhibiert als Folsäure-Antagonist kompetitiv und reversibel die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR). Die Bindungskonstante von Methotrexat an die DHFR ist im Vergleich zu Folat um den Faktor 1000 größer [70]. Die DHFR ist ein Enzym das die Reaktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat katalysiert. Diese Reaktion ist für die Synthese von Thymidin essentiell, welches für die Nukleotid-Biosynthese benötigt wird. Methotrexat inhibiert somit als Antimetabolit die Purin- und Thymidinsynthese, wodurch die korrekte Synthese von RNA, DNA und Proteinen verhindert wird [71]. Die damit verbundene Inhibierung der Replikation wirkt sich vor allem auf häufig teilende Zellen aus.

Methotrexat wird in der Tumortherapie zur Behandlung von verschiedenen Tumorarten wie z.B. akute lymphatische Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphom oder auch Mammakarzinom angewandt. Durch seine immunsupprimierende Wirkung wird Methotrexat auch bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis eingesetzt.

Abbildung 1.6-3: Strukturformel Methotrexat. Abbildung: http://www.drugbank.ca

1.6.4 Paclitaxel

Paclitaxel gehört zu der Gruppe der Taxane und wurde 1963 erstmals aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) extrahiert. Durch den Nachweis der hohen klinischen Wirksamkeit an mehrern verschiedenen Tumorarten wie z. B. Ovarialkarzinom und Mammakarzinom, stieg der Bedarf an Taxol[®]. Da für die Gewinnung des Wirkstoffes die gesammte Rinde der seltenen und langsam wachsenden Pazifischen Eibe abgeschält wurde, woran die Bäume zugrunde gingen, musste eine neue Möglichkeit zur Paclitaxelherstellung gefunden

werden. Nach vorübergehender halbsynthetischer Herstellung konnte 1991 durch die Firma Phyton ein effektives wie auch kostengünstiges Verfahren zur großtechnischen Paclitaxelgewinnung mittels Pflanzenzellfermentation entwickelt werden. Seit 2002 wird der Wirkstoff Paclitaxel für Taxol[®] ausschließlich über dieses Verfahren hergestellt [72].

Pharmakologischer Angriffspunkt von Taxol[®] sind die Mikrotubuli. Diese sind dünne, starre, fadenförmige Zellstrukturen die maßgeblich an der Zellteilung sowie an intrazellulären Transportvorgängen und an der Neurotransmittersekretion beteiligt sind. Sie bestehen aus Tubulinmolekülen die aneinandergereiht einen Hohlzylinder bilden. Die Mikrotubuli sind labile Gebilde. Es lagern sich ständig neue Tubulin-Dimere aus dem Tubulinpool der Zelle an (Polymerisation), während sich andere wieder aus dem Verband lösen (Depolymerisation). Somit entsteht ein dynamisches Gleichgewicht aus Polymerisation und Depolymerisationsvorgängen [72]. Der Wirkmechanismus beruht auf der reversiblen Anlagerung des Paclitaxelmoleküls an das Tubulin der bereits aufgebauten Mikrotubuli, wodurch sich der Depolarisationsvorgang verzögert. Damit kippt das Gleichgewicht in Richtung Polymerisation, das Wachstum der Mikrotubuli wird beschleunigt und der Zellpool an Tubulin erschöpft sich [73, 74]. Die unter Paclitaxeleinfluss gebildeten Mikrotubuli sind länger und etwa 10-mal biegsamer als unter normalen Umständen [75]. Außerdem bilden sich in den Zellen abnorme Mikrotubulusstrukturen aus, wodurch die Ausbildung eines funktionsfähigen Spindelapparats während der Mitose verhindert wird. Es kommt zu Chromosomenbrüchen, der Zellteilungsvorgang wird extrem verlängert oder kann gar nicht zu Ende geführt werden [72].

Abbildung 1.6-4: Strukturformel Paclitaxel. Abbildung: http://www.drugbank.ca

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen *in vitro* Untersuchungen wurden mit murinen C3H-Mamma-karzinomzellen durchgeführt, die von der MagForce AG zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen stammen ursprünglich aus einem spontan entstandenen Mammakarzinom einer C3H/HeJ-Maus, aus dem sie entnommen wurden, um daraus eine Zelllinie zu etablieren [121]. Dank des engen Verwandschaftsgrades eignen sich diese Zellen auch für die Tumorimplantation in Mäusen des C3H/HeNHsd-Stammes.

2.1.1 Auftauen und Einfrieren der verwendeten Passage

Auftauen

Zum Anlegen von Reservekulturen kann Zellmaterial eingefroren werden. So kann jederzeit eine lebensfähige Kultur aufgetaut werden, die über die gleichen spezifischen Eigenschaften der passagierten Zelllinie zum jeweiligen Passagezeitpunkt verfügt.

Zum Auftauen wurden 25 ml eines auf 37 °C vortemperierten Zellkulturmediums in ein 50 ml Zentrifugengefäße pipettiert. Mit warmem Medium (500 μ l) wurde die gefrorene Zellsuspension im Cryoröhrchen durch mehrfaches auf und ab Pipettieren langsam gelöst. Die 500 μ l wurden hierbei immer wieder in das Zentrifugenröhrchen zurück pipettiert und durch neues Medium ersetzt. Hierdurch wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO schnell verdünnt und verlor so seine Toxizität.

Nachdem die Zellen komplett aufgetaut waren und alles ins Zentrifugenröhrchen überführt wurde, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 125 g und RT für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 25 ml frischem Medium resuspendiert, mit welchem sie dann in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt wurden. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Danach konnten die Zellen wie unter 2.1.2 beschrieben kultiviert und passagiert werden. Um eine Kontamination der Zellkultur zu verhindern, fanden alle hierfür erforderlichen Arbeitsschritte unter einer Sterilbank statt

Einfrieren

Das Einfriermedium (10 %ige DMSO-Lösung in FBS) sowie sterile Cryoröhrchen wurden in einem Eisbad vorgekühlt. Die C3H-Zellen wurden, wie unter 2.1.2 beschrieben, mittels Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche gelöst, in Medium aufgenommen und gezählt. Die entsprechende Menge der Zellsuspension (1 x 10^6 Zellen pro Cryoröhrchen) wurde in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und mit 125 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend

wurde das Röhrchen mit dem Zellpellet und dem Überstand für 15 Minuten in ein Eisbad gestellt. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden in der benötigten Menge Einfriermedium aufgenommen, zu je 1 ml in die vorbereiteten Cryoröhrchen verteilt und anschließend umgehend in einem -80 °C-Gefrierschrank eingelagert.

2.1.2 Passage der kultivierten Zellen

Permanente Zelllinien wurden gemäß ihres Wachstumverhaltens passagiert, um die Vitalität der Zellen zu erhalten. Der Aussaattiter und die Kulturdauer sollten dabei so gewählt werden, dass die Zellen im Stadium der Subkonfluenz passagiert werden (<100 % der Kulturoberfläche sind mit Zellen bewachsen).

Alle benötigten Lösungen wurden vor Beginn der Arbeit bei 37 °C im Wasserbad temperiert. Jeder Gegenstand, der mit unter die Sterilbank kam, wurde zuvor mit 70 %igem Ethanol abgewischt.

Um die Zellen zu passagieren, wurde mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette das alte Medium abgesaugt. Zuerst wurden 5 ml PBS (*Phosphate buffered saline*) auf die Zellen gegeben. Durch kurzes Hin- und Herschwenken der Kulturflasche wurde das Restmedium vom Zellrasen gewaschen. Das PBS wurde abpipettiert und durch 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Trypsin gehört zu der Gruppe der Peptidasen und ist ein Enzym, welches Proteine und Peptide spalten kann. Durch langsames Hin- und Herschwenken der Kulturflasche wurden die Zellen gleichmäßig mit Trypsin benetzt. Danach wurde das Trypsin bis auf ca. 500 µl abpipettiert, die Öffnung der Kulturflasche abgeflammt und die Flasche verschlossen. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt bei 37 °C im Brutschrank, in dem sich die Zellen, dank der enzymatischen Spaltung von Proteinen, vom Flaschenboden ablösten. Der Status der Ablösung konnte mikroskopisch überprüft werden. Nachdem sich alle Zellen abgelöst hatten, wurden sie mit 9,5 ml frischem Medium in einem 50 ml Röhrchen wieder aufgenommen.

Um die Zellen dabei möglichst gut zu vereinzeln, wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer 10 ml-Pipette mehrmals auf und ab pipettiert. Direkt im Anschluss wurden von der Zellsuspension 50 µl in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 50 µl Trypanblau gemischt. Mit dieser Mischung wurde eine Neubauer Zählkammer gefüllt und die vitalen Zellen (farblos) gezählt. Aus der Zellzahl der vier Großquadrate wurde der Mittelwert pro Großquadrat gebildet.

Für die Passage säte man pro 75 cm 2 Kulturflasche 5 x 10^5 Zellen aus, so dass sie in drei bis vier Tagen erneut einen subkonfluenten Zellrasen bilden konnten. Das benötigte Volumen an Zellsuspension wurde errechnet (siehe 2.1.3) und in die neue Kulturflasche überführt.

Anschließend wurde die Flasche auf 25 ml Medium aufgefüllt. Die Öffnung der Kulturflasche wurde abgeflammt und verschlossen. Zur Kultivierung der Zellen wurde die Kulturflasche wieder in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelegt.

2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und mit einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellzahl errechnete sich nach folgender Formel:

(Zellen/Großquadrat) x 2 $_{(Verdünnung)}$ x $10^4_{(Kammerfaktor)}$ = Zellzahl/ml

2.1.4 Mediumwechsel

Je nach Konfluenz der Zellen und Dauer der Kultur ist ein Mediumwechsel erforderlich. Dieser sollte alle 2 bis 3 Tage erfolgen, um die Zellen optimal mit Nährstoffen zu versorgen und um unter Umständen toxische Stoffwechselprodukte zu entfernen.

Die Kulturflasche wurde mit Ethanol abgewischt und anschließend unter die Sterilbank gestellt. Mit dem auf 37 °C temperierten Medium wurde genauso verfahren. Das verbrauchte Medium saugte man mit einer sterilen Pasteurpipette ab, bevor 25 ml des neuen Mediums pro 75 cm²-Kulturflasche zugegeben wurden.

Abschließend wurden die Flaschen zur Kultivierung wieder zurück in den Brutschrank gelegt.

2.1.5 Mykoplasmentest mit DAPI

Zur Überprüfung von Zelllinien auf Mykoplasmen- und Bakterienkontaminationen führte man diesen Fluoreszenztest wie folgt durch. Die Kontrolle erfolgte in routinemäßigen Abständen oder nach Bedarf vor dem Einfrieren, nach dem Auftauen und vor der Freigabe der Zellen zur Implantation.

Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer 12-Well-Zellkulturplatte. Vor der Aussaat wurden in die jeweiligen Wells ein rundes (Ø 18 mm), autoklaviertes Deckglas gelegt. Der Einsaattiter (1×10^4 Zellen/Well) wurde so gewählt, dass nach 24 h Vorkultur ca. 50 % des Wells bewachsen waren. Das Mediumvolumen pro Well betrug 1 ml. Die Vorkultur der Zellen erfolgte bei 37 °C im Brutschrank.

Nach 24 h wurde das Medium mit einer Pipette abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS/Well gewaschen. Das PBS wurde entfernt und die Zellen mit Carnoy`s Reagenz (1 ml/Well) für 10 min fixiert. Anschließend erfolgte ein zweifacher Waschschritt mit PBS.

Die folgenden Arbeitsschritte mussten unter abgedunkelten Bedingungen durchgeführt werden, damit das DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) nicht ausbleichte. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in Nukleinsäuren einlagert und damit zur Färbung von Zellkernen eignet. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe. Zwei separate Tropfen des DAPI-Eindeckmediums wurden auf einen Objektträger gegeben, das Deckglas mittels gebogener Kanüle und Pinzette aus dem Well herausgenommen, einmal in VE-Wasser gepült und dann mit den Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Tropfen Eindeckmedium gelegt. Nach 24 h bei 4 °C konnten die Objektträger mittels Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden.

Eine Mykoplasmenkontamination wäre durch einen hellblauen Hof um die Zellkerne zu erkennen. Sollten die Zellen mit Bakterien kontaminiert sein, würde man dies an kleineren blau leuchtenden Flecken erkennen, bei denen es sich um gefärbte Fremd-DNA handeln würde. Diese wären um ein vielfaches kleiner als die Zellkerne der eukaryotischen Zellen.

2.1.6 Verdopplungszeit (PDT) bestimmen

Die "Population Doubling Time" (PDT) beschreibt die Zeitspanne, in der sich eine Zellpopulation verdoppelt. Nach der Etablierung von Tumorzelllinien muss diese möglichst konstant bleiben. Bei starken Abweichungen von der ursprünglichen PDT sollte die betroffene Passage verworfen und durch eine frühere, standardisierte ersetzt werden, da in diesem Fall nicht mehr gewährleistet ist, dass die Zellen noch über ihre spezifischen Eigenschaften verfügen.

Das Wachstum der Zellen wurde bis zur stationären Phase beobachtet. Alle 24 Stunden wurden die Zellen von 3 Flaschen abgelöst und die Zellernte bestimmt. Wie in 2.1.2 beschrieben, wurden die Zellen von ihrer Wachstumsfläche abgelöst, wieder in Medium aufgenommen und die absolute Zellzahl ermittelt. Das Wachstum wurde halblogarithmisch in einem Diagramm gegen die Wachstumszeit aufgetragen. Die PDT berechnete sich dann wie folgt:

$$PDT = \frac{\ln 2}{Steigung\ der\ Trendlinie}$$

2.1.7 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays kann die Zytotoxizität von verschiedenen Stoffen getestet werden [76]. Für den Test wurden 3,5 x 10^3 Zellen/Well (C3H-Zellen) in 100 μ l/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Das zu testende Material wurde entsprechend verdünnt und auf 37 °C temperiert. Das Medium wurde

abgesaugt, durch die jeweilige Verdünnung (100 µl/Well) ersetzt und bei 37 °C weiter im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h folgte ein zweimaliger Waschschritt mit 37 °C warmem Medium (200 µl/Well), bei dem zuletzt 100 µl Medium in den Wells verblieb. Zu dem Medium wurden 150 µl der MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) pipettiert, gefolgt von einer 4 stündigen Inkubation bei 37 °C. MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid] ist ein schwach gelbes, nicht membrangängiges Tetrazoliumsalz. Es wird von Zellen vermutlich durch Endozytose aufgenommen. In vitalen Zellen wird es zu einem blauvioletten Formazan reduziert, welches nadelförmige Kristalle bildet. Die Reduktion ist hauptsächlich von den pyridinhaltigen Reduktionsäquvivalenten NADH und NADPH und teilweise von den mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen abhängig.

Nach der Inkubation wurde das MTT abgesaugt und durch 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) pro Well ersetzt, um den Farbstoff zu extrahieren. Durch die Zugabe von DMSO wurden sowohl die Zellmembranen als auch die intrazellulär vorliegenden Formazan-Kristalle gelöst. Die Konzentrationen an Formazan konnten photometrisch bei einer Wellenlänge von 690 nm und 540 nm im Tecan Reader bestimmt werden und stellten ein Maß für die Glykolyserate und damit der Vitalität der Zellen dar.

2.2 C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus

Alle hier beschriebenen Versuche mit Tieren, wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) beantragt und durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt. Die Versuche erfolgten im Rahmen des TierSchG und der Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des TierSchG (AVV TierSchG).

2.2.1 Haltungsbedingungen

Die C3H/HeNHsd Mäuse wurden in Eurostandard Typ II L – Käfigen mit einer Grundfläche von 530 cm² konvenzionell gehalten. Sie wurden mit Streu und zusätzlichem Enrichement (Zellstoff und Häuser) bestückt und mit Filterhauben verschlossen, um die Tiere vor Zugluft zu schützen. Das Umsetzen der Tiere erfolgte ein- bis zweimal wöchentlich, abhängig von der Anzahl der Tiere pro Käfig und dem jeweiligen Verschmutzungsgrad. Je nach Gewicht wurden unterschiedlich viele Tiere in einem Käfig zusammengesetzt.

```
\geq 15 g \rightarrow max. 11 Tiere
```

 \geq 20 g \rightarrow max. 09 Tiere

 \geq 30 g \rightarrow max. 06 Tiere

 \geq 35 g \rightarrow max. 05 Tiere

Für die Mäuse bestand keine Futterrestriktion; alle Tiere erhielten Wasser *ad libitum*. Der Tag/Nacht Rhythmus war auf 12 h hell/dunkel eingestellt. Die relative Luftfeuchte in der Tierhaltung betrug 55 ± 10 % bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C.

2.2.2 Ohrmarkierungen bei Tierversuchen

Um Tiere während eines Versuches auseinander halten zu können, mussten diese dauerhaft gekennzeichnet werden. Die Ohren der Mäuse wurden nach folgender Codierung markiert:

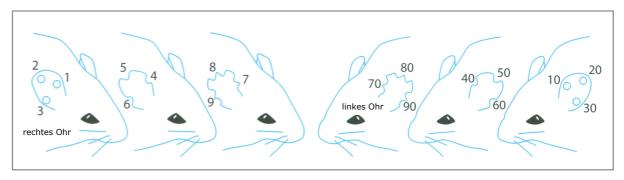


Abbildung 2.2-1: Ohrmarkierung der Versuchstiere (Abbildung aus "The Laboratory Mouse", Elsevier 2004, leicht verändert)

2.2.3 Tumorimplantation

Für eine erfolgreiche Tumorimplantation musste sichergestellt werden, dass die C3H-Zellen auch vital und Mykoplasmenfrei waren. Daher musste vor jeder Implantation die PDT (siehe 2.1.6) überprüft und ein Mykoplasmentest (siehe 2.1.5) durchgeführt werden. Erst danach konnten die C3H-Zellen für die Tumorimplantation vorbereitet werden. Die Zellen wurden analog zu einer Passage mittels Trypsin abgelöst (vgl. 2.1.2) und auf 1 x 10^6 Zellen/100 µL verdünnt. Die Zellsuspension wurde mit einer 1 ml Tuberkulinspritze (Injekt®-F) aufgezogen und bis zur Injektion in Bewegung gehalten damit sich die Zellsuspension nicht absetzte. Dies war wichtig, um eine gleichbleibende Zellzahl pro Tier zu gewährleisten. Die Tiere wurden vor der Implantation sediert (vgl. 2.2.5). Nach Desinfektion der Einstichstelle wurden 100 µl der Zellsuspension intramuskulär in den rechten Oberschenkel einer C3H-Maus implantiert. Die Injektion erfolgte mit einer Injektionskanüle (30G 1/2°, 0,3 mm x 13 mm). Die Tiere blieben bis zum Aufwachen aus der Narkose unter Beobachtung und konnten anschließend wieder in ihren ursprünglichen Käfig zurückgesetzt werden.

2.2.4 Tumorvolumen bestimmen

Um vor und nach einer Tumorimplantation das Schenkelvolumen (Kontrolle) und später auch das Tumorvolumen zu bestimmen, wurden Längenmessungen des Schenkeldurchmessers entlang einer Medianlinie mit einem Messschieber vorgenommen (siehe Abbildung 2.2-2). Je nach Größe und Form bestimmte man pro Schenkel max. 3 Messwerte.

Am Tag der Implantation wurde der mediane Durchmesser an beiden hinteren Extremitäten bestimmt und als Leerwert angenommen. An den darauf folgenden Tagen vermaß man nur noch den tumortragenden Schenkel. Nach Abzug des Leerwertes konnte somit das eigentliche Tumorvolumens bestimmt werden.

Solange der wachsende Tumor annähernd eine Kugel bildete, wurde nur eine Achse gemessen. Sobald der Tumor nicht mehr als Kugel darstellbar war (die 3 Achsen liefern unterschiedliche Messwerte), wurde der Tumor als Ellipsoid betrachtet. Damit mussten die Durchmesser aller 3 Achsen (d1–d3) in die Berechnung mit einbezogen werden.

Ausgehend von der Formel zur Volumenberechnung eines Ellipsoids berechnete sich das Tumorvolumen wie folgt:

$$V_{Tumor} = \frac{4}{3}\pi \frac{d1 \times d2 \times d3}{2 \times 2 \times 2} = 4,187 \frac{d1 \times d2 \times d3}{8} = 0,523 \times d1 \times d2 \times d3$$

2.2.5 Narkosen

Eingriffe wie Tumorimplantationen oder NP-Applikationen fanden in der vorliegenden Arbeit, wie von der Gesellschaft für Versuchstierkunde empfohlen, unter Narkose statt [77]. Hierzu wurden Rompun[®] (2 % Injektionslösung) und Ketavet[®] (100 mg/ml) im Verhältnis 1:1 unter einer Sterilbank gemischt und mit einer Dosis von 100 µl pro 100 g Maus eingesetzt. Das Narkosegemisch wurde in einer 1 ml Tuberkulinspritze (Injekt[®]-F) aufgezogen und mit einer Injektionskanüle (27G 3/4", 0,4 mm x 20 mm) intraperitoneal injiziert. Das Gemisch konnte nach dem Ansatz noch bis zu 48 h im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

2.2.6 NP-Applikation i.v./i.t.

Nach der Tumorimplantation wurde das Wachstum der daraus resultierenden Tumoren mit einem Messschieber, wie in 2.2.4 beschrieben, kontrolliert. Sobald ein Tumorvolumen von $0.55 \pm 0.05 \, \mathrm{cm}^3$ erreicht war, konnten die entsprechenden NP-Arten wie folgt appliziert werden. Zuerst mussten die NP je nach Art z. B. durch Sonifizierung oder aufschütteln, für die Applikation vorbereitet werden.

Die Versuchstiere wurden für die intratumorale NP-Applikation narkotisiert (vgl. 2.2.5). Für die intravenöse Applikation von NP war dies nicht notwendig. Die Applikationsstelle wurde vorher mit Hautdesinfektionsspray gesäubert und $100\,\mu l$ der jeweiligen Nanopartikel intratumoral appliziert. Die i.t. Applikation erfolgte mit Hilfe eines Venenverweilkatheters (22G 1", 0,9 x 25 mm) der nach Entfernung der Kanüle für die Einführung der Temperatursonde bei der Hyperthermie genutzt werden konnte (siehe Abbildung 2.2-2). Für die i.v. Applikation wurde die Maus in einer dafür entwickelten Halterung fixiert, wodurch es möglich war $100\,\mu l$ der PEGylierten NP mittels einer Injektionskanüle (27G 1/2", 0,4 mm x 13 mm) in die Schwanzvene zu applizieren.

Zur genaueren Bestimmung des Applikationsvolumens wurde die Spritze vor und nach der Applikation gewogen. Um exaktere Werte zu erhalten, kam hierbei ein Ionisator zum Einsatz. Dieser wurde zum Neutralisieren von elektrostatischer Aufladung verwendet.

Nach der NP-Applikation folgte, noch unter Narkose, die 30-minütige Hyperthermiebehandlung im Tierapplikator (siehe 2.3.1). Im Anschluss blieben die Tiere bis zum Aufwachen aus der Narkose unter Beobachtung und konnten später wieder in ihren ursprünglichen Käfig zurückgesetzt werden.

Nach Versuchsende oder nach Erreichen eines entsprechenden Abbruchkriteriums (siehe 7.2) [78] wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und bei Bedarf der jeweilige Tumor sowie Lunge, Leber, Niere und Milz für die analytischen Untersuchungen entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

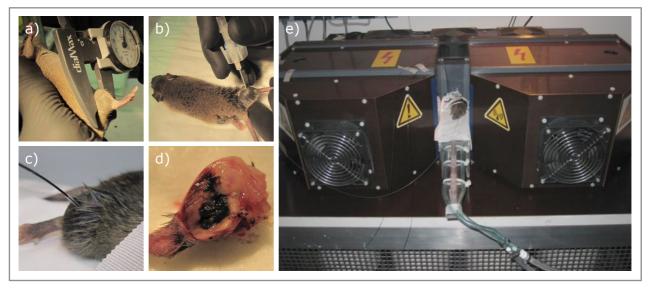


Abbildung 2.2-2: Intratumorale Applikation von FeOx-NP im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus. a) Bestimmung des Tumorvolumens mit Hilfe eines Messschiebers. b) intratumorale Applikation der NP über einen Venenverweilkatheter. c) intratumorale Temperaturmessung mit einer fiberoptischen Sonde. d) FeOx-NP Depot in einem post mortem präparierten Tumor. e) Tierapplikator MFH®-12-TS mit einer C3H-Maus auf einem temperierten Fixator.

2.3 Hyperthermie

2.3.1 MFH (Magnetic Fluid Hyperthermia)

Die Hyperthermie erfolgte in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich im magnetischen Wechselfeld und wird im Folgenden als MFH bezeichnet. Zur Optimierung der passiven Anreicherung von PEGylierten NP wurde die Hyperthermie im Wasserbad (WBH) durchgeführt. Dies ist unter 2.3.2 genauer beschrieben. Für die MFH war eine vorherige intratumorale Applikation von FeOx-NP erforderlich (vgl. 2.2.6), da diese für die Erwärmung obligatorisch sind.

Sollte das Versuchstier nicht bereits in Narkose gelegen haben, (z.B. durch eine vorherige NP-Applikation) wurde eine Narkose eingeleitet (vgl. 2.2.5). In der Zwischenzeit konnten die Geräte (MFH-12-TS, Luxtron, Computer) eingeschaltet und die fiberoptischen Sonden kalibriert werden. Die narkotisierte Maus wurde auf einen temperierbaren Fixator gelegt und mit medizinischen Pflastern (3M, DuraporeTM, 1,25 cm x 9,1 m) befestigt. Die Maus wurde hierbei so ausgerichtet, dass der Tumor möglichst mittig im magnetischen Feld lag (siehe Abbildung 2.2-2 e). Über den im Tumor verbliebenen Katheter konnte eine fiberoptische Sonde zur Aufzeichnung der intratumoralen Temperatur eingeführt werden (Abbildung 2.2-2 c). Eine rektale Temperaturmessung diente als Kontrolle und Referenz. An dem Tierapplikator (MFH-12-TS) konnte die gewünschte Feldstärke eingestellt werden, und nach dem Starten des Magnetfeldes (100 kHz) wurde die geplante Behandlungslänge durchlaufen (30 min). Die Eisenoxid-Nanopartikel erhitzten sich aufgrund der Relaxation des magnetischen Momentes nach Rotation in den Partikeln (Néel) oder der Rotation des gesamten Partikels (Brown) im magnetischen Wechselfeld, was ein Anstieg der intratumoralen Temperatur zur Folge hatte (Hyperthermie) [38]. Die hierbei entstehenden Temperaturen konnten mit Hilfe einer Software (MFH Hyperthermiesysteme, MT MedTech Engineering) aufgezeichnet werden. Während der Behandlung war auf die Atmung und die Narkosetiefe des Tieres zu achten.

Nach der Behandlungszeit wurde das Magnetfeld heruntergefahren und das Therapiegerät ausgeschaltet. Die Maus wurde von den Sonden und dem Katheter befreit und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose unter einer Rotlichtlampe warmgehalten.

2.3.2 WBH (Water Bath Hyperthermia)

Zur Optimierung der passiven Anreicherung von PEGylierten NP wurde die Hyperthermie im Wasserbad (WBH) durchgeführt. Hierzu mussten die Tiere narkotisiert werden (vgl. 2.2.5). Unmittelbar vor der WBH wurden den Tieren die PEGylierten NP in die Schwanzvene

appliziert. Wie oben beschrieben, mussten zuvor die Geräte (Wasserbad, Luxtron, Computer) eingeschaltet und die fiberoptischen Sonden kalibriert werden.

Die narkotisierte Maus wurde in einer präparierten, 25 cm²-Zellkulturflasche so fixiert, dass das tumortragende Bein aus der Flasche in das 43 °C warme Wasserbad hing und der Tumor somit regional erwärmt werden konnte. Die Kulturflasche enthielt ein Stück einer Kühlmanschette (COOL Bandage®, selbstkühlende Kompressionsbandage), auf die das Tier gelegt wurde, um es gegen Überhitzung zu schützen. Falls erforderlich, wurden die fiberoptischen Temperatursonden, wie unter 2.3.1 beschrieben, intratumoral bzw. rektal angebracht. Die Maus wurde mit Hilfe eines Gestells so in das Wasserbad gelegt, dass der Tumor komplett vom Wasser umschlossen war, der restliche Körper aber möglichst trocken blieb (Abbildung 2.3-1). Nach der Behandlungszeit von 30 min wurde das Tier aus dem Wasserbad genommen, von der Fixierung, den Sonden und dem Katheter befreit und bis zum vollständigen Ende der Narkose unter einer Rotlichtlampe warmgehalten.

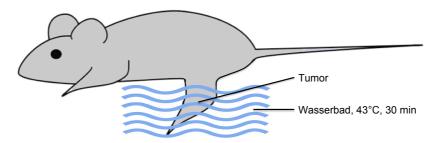


Abbildung 2.3-1: Schematische Darstellung der regionalen Erwärmung eines Tumors im Hinterbein einer C3H-Maus mit Hilfe der Wasserbadhyperthermie.

2.4 Analytik

2.4.1 Aufschluss Säure/Mikrowelle

Um die systemische Verteilung der FeOx-NP bzw. des Eisens im Versuchstier nach der intravenösen NP-Applikation bestimmen zu können, mussten die Tumoren, sowie Lungen, Lebern, Nieren und Milzen nach der Termination entnommen und aufgeschlossen werden. Dieser Aufschluss fand mit Hilfe von Säuren und Mikrowellen in dem Gerät "MARS Xpress" statt.

Die zuvor gewogenen, eingefrorenen Organe wurden in einen Aufschlussbehälter überführt und mit 2 ml 65 %iger Salpetersäure versetzt um für mindestens 1 h angedaut zu werden. Zu den angedauten Proben kamen weitere 4 ml 65 %ige Salpetersäure und 1 ml 30 %iges Wasserstoffperoxid. Das Überdruckventil wurde aufgesetzt und nach 5 Minuten mit dem Deckel handfest verschlossen. Die Aufschlussbehälter kamen in den dafür vorgesehenen

Drehteller, welcher in die Mikrowelle eingesetzt wurde. Die Proben wurden mit folgendem Programm aufgeschlossen (Tabelle 2.4-1).

Nach dem Aufschluss ließ man die Proben noch weiter unter einem Abzug abkühlen, bevor sie vorsichtig geöffnet werden konnten. Die Proben waren vollständig aufgeschlossen, wenn eine klare Lösung vorhanden war. Wenn dies nicht der Fall war, mussten die Probe erneut aufgeschlossen werden. Für die spätere Eisenbestimmung bzw. für die Berechnung der sytemischen Verteilung des Eisens musste das genaue Volumen mit Hilfe einer serologischen Pipette bestimmt werden. Die Proben wurden bis zur weiteren Eisenbestimmung fest verschlossen bei Raumtemperatur gelagert.

Chufo	Leistung		Rampe	Kontrolle	Halten
Stufe	Watt	%	Minuten	°C	Minuten
1	400	100	10	110	3
2	800	100	10	150	5
3	1600	100	10	190	10

Tabelle 2.4-1: Programm mit den jeweiligen Stufen zum Mikrowellenaufschluss im MARS Xpress

2.4.2 Bestimmung des Eisengehaltes

Nachdem die Tumoren bzw. die Organe vollständig aufgeschlossen waren, folgte die Bestimmung des Eisengehaltes der jeweiligen Proben, um Aussagen darüber treffen zu können, wie viel der FeOx-NP im Tumor bzw. in welchem Organ wiederzufinden war.

Die Eisenbestimmung erfolgte mit Hilfe des Eisen-Küvettentest Spectroquant[®] (Merck, Deutschland). Hierbei wurden sämtliche Eisen-Ionen zu Eisen(II)-Ionen reduziert. Diese bildeten in Thioglycolat gepuffertem Medium mit einem Triazin-Derivat einen rotvioletten Komplex [79], der im Photometer (SPECORD[®] 200 PLUS) bei einer Wellenlänge von 565 nm bestimmt werden konnte.

Vorab wurden, entsprechend der Angaben des Herstellers, zwei Standardgeraden für unterschiedliche Messbereiche hergestellt:

- Standardgerade 1: (0,050–5,000) μg Fe/ml
- Standardgerade 2: (0,005–1,000) μg Fe/ml

Für die Messungen mussten die Proben mit Hilfe eines Citronensäure/Phosphat (CP)-Puffers verdünnt werden. Das Probenmaterial musste so verdünnt werden, dass die Probenlösung einen pH-Wert zwischen 3,2 und 4,5 aufwies und die zu erwartende Eisen-Konzentration von der gewählten Standardgerade abgebildet wurde. Jeweils 5 ml der Proben wurden mit 6 Tropfen des Reagenz Fe-1 (Eisen-Küvettentest Spectroquant®) versetzt und für

mindestens 30 min, maximal 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe des Reagenz Fe-1 und unmittelbar vor der Messung wurde jede Probe mit einem Vortexer gemischt. Um sicherzustellen, dass der Eisentest auch funktionierte, wurde zu jeder Standardgerade eine Referenz mit einem Eisenstandard für AAS (1000 mg/l) gemessen. Alle Proben wurden gegen einen Nullwert (5 ml Puffer) gemessen.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung fand mit dem Programm Prism 5 (GraphPad Software) statt. Um die Signifikanzen zu berechnen wurde ein zweiseitiger T-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Es wurde mit einem Konfidenzniveau von 95 % gerechnet. Wenn der Signifikanzwert (p-Wert) kleiner 0,05 war, wurden die Proben als signifikant unterschiedlich gewertet.

2.6 PEGylierte NP

2.6.1 in vitro Versuche

Partikelsynthese

Die Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel sowie deren PEGylierung wurde von der MagForce AG nach den dort geltenden Verfahrensanweisungen durchgeführt und mit freundlicher Genehmigung für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Nanopartikel bestanden aus einem Gemisch von Magnetit (Fe₃O₄) und Maghemit (γ-Fe₂O₃) und waren superparamagnetisch. Allgemein konnten die Nanopartikel durch die Formel FeOx wiedergegeben werden, worin X eine Zahl von 1 bis 2 bedeutete [80]. Die Synthese der FeOx-NP erfolgte nach der Methode von Massart's, ausgehend von Eisen(II)- und Eisen(III)chlorid [81]. Nach einem Waschschritt mit deionisiertem Wasser wurden die Primärpartikel in einem modifizierten Stöber-Prozess mit Hilfe von Tetraethylorthosilicat von einer SiO₂ Schale umhüllt [82]. Die daraus resultierenden FeOx-NP waren aus 12−15 nm großen Fe₂O₃ Kernen mit 5 nm dicken SiO₂ Schalen aufgebaut. Die SiO₂ Schicht erhöhte die Stabilität der Partikel in wässriger Umgebung und bot freie OH-Gruppen, an welche in einem nasschemischen Verfahren in Ethanol ein PEG modifiziertes Silan (2-[Methoxy(Polyethyleneoxy)propyl] Trimethoxysilan) gekoppelt werden konnte. Die daraus erhaltenen PEGylierten NP konnten anschließend getrocknet und als Pulver gelagert werden. Bei Bedarf ließ sich das Pulver in Wasser, Medium oder Puffer redispergieren wobei sich selbst unter physiologischen Bedingungen eine stabile Dispersion bildete.

Eine schematische Darstellung der PEGylierten FeOx-NP ist in Abbildung 2.6-1 zu finden.

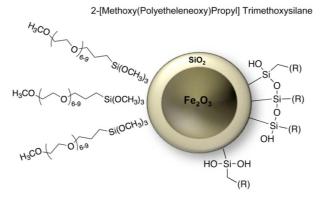


Abbildung 2.6-1: Schematische Darstellung eines FeOx-NP mit einem Fe_2O_3 Kern von 15 nm und einer SiO_2 Schale von 5 nm, die durch die Kopplung von PEG-Gruppen an die OH-Gruppen der Oberfläche modifiziert wurde.

Zelluläre Aufnahme von PEGylierten NP (TEM)

Die Auflösung eines Mikroskops ist abhängig vom minimalen Abstand zweier Punkte, die in der Abbildung noch unterschieden werden können. Das Auflösungsvermögen steigt mit kleiner werdender Wellenlänge der verwendeten Strahlung. Da schnelle Elektronen eine deutlich kürzere Wellenlänge als Licht aufweisen, können mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sehr viel höhere Auflösungen erreicht werden als mit konventionellen Lichtmikroskopen. Um die intrazelluläre Verteilung der PEGylierten FeOx-NP untersuchen zu können, ist solch eine hohe Auflösung erforderlich.

Hierzu wurden 2.5×10^5 Zellen/Well (C3H-Zellen) in einer 6-Well-Kulturplatte ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch neues Medium ersetzt, das die FeOx-NP mit einer Fe-Konzentration von 0.1 mg/ml enthielt.

Die Zellen wurden erneut im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min, 30 min und 24 h wurden die Zellen mit 2,5 ml frischem Medium zweimal gewaschen, mit Trypsin von der Oberfläche gelöst und hinterher für 5 min mit 125 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml vorgewärmtem Fixativ (20–24 °C) resuspendiert, für 10 min bei 37 °C inkubiert und schließlich bis zur Untersuchung bei 4 °C gelagert. Das Eindecken und das Anfertigen der Semi- sowie Ultradünnschnitte (70 nm) wurden an der Charité in der Abteilung für Elektronenmikroskopie von Frau Petra Schrade (AG Prof. Dr. Sebastian Bachmann) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden am Elektonenmikroskop EM 906 von Zeiss angefertigt.

Zytotoxizität von PEGylierten NP in vitro

Die Toxizität der PEGylierten NP wurde mit Hilfe eines MTT-Tests getestet. Zu diesem Zweck wurden C3H-Zellen, wie unter 2.1.7 beschrieben, vorkultiviert und für 24 h mit PEGylierten NP in Konzentrationen von 0,01–3 mg Fe/ml bei 37 °C inkubiert, bevor die MTT-Lösung zugegeben wurde. Als Referenz wurden aminosilanbeschichtete Eisenoxid Nanopartikel ohne PEGylierung verwendet. Die Ansätze zu den jeweiligen Fe-Konzentrationen erfolgten als Triplikate. Die entstandenen Verfärbungen konnten photometrisch bei einer Wellenlänge von 690 nm und 540 nm im Tecan Reader bestimmt werden und stellten ein Maß der Vitalität der Zellen dar.

2.6.2 in vivo Versuche

Systemische Verteilung von PEGylierten NP

Die systemische Verteilung der PEGylierten NP nach intravenöser Applikation wurde im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus untersucht. Hierzu wurden, wie unter 2.2.3 beschrieben, 1×10^6 C3H-Zellen intramuskulär in den rechten Oberschenkels einer Maus (C3H/HeNHsd) implantiert. Das Tumorwachstum wurde mittels eines Messschiebers kontrolliert (vgl. 2.2.4). Sobald die Tumoren ein Volumen von 0.65 ± 0.1 cm³ erreicht hatten, wurden den Tieren $100 \, \mu l$ der PEGylierten NP ($0.61 \, mol \, Fe/l$) intravenös in die Schwanzvene appliziert (siehe 2.2.6). Die Tiere wurden randomisiert in vier Gruppen ($1 \, h$, $6 \, h$, $24 \, h$, $72 \, h$) mit jeweils vier Mäusen pro Gruppe eingeteilt. Nach den jeweiligen Zirkulationszeiten wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Tumoren sowie Lungen, Lebern, Nieren und Milzen für die weiteren Untersuchungen (Fe-Analytik) entnommen und entsprechend aufgearbeitet (siehe 2.4).

NP-Anreicherung im Tumor durch regionale Erwärmung

Durch eine regionale Erwärmung des Tumors in einem Wasserbad (WBH) sollte getestet werden, ob die passive Anreicherung der PEGylierten NP im Tumor erhöht werden kann. Um die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren, wurde für die Studie nur die Versuchsgruppe gewählt, mit der die höchste passive Anreicherung im Tumor (ohne Wasserbadhyperthermie) erreicht werden konnte. Dies nach 72 h der Fall. Daher wurde eine weitere Gruppe mit vier C3H-Mäusen eingesetzt, deren Tumoren unmittelbar nach i.v. Applikation der PEGylierten NP im Wasserbad für 30 min bei 43 °C erwärmt wurden (siehe 2.3.2). Nach einer Zirkulationszeit von 72 h wurde die Tierstudie beendet. Die restliche Durchführung erfolgte analog zu 2.6.2.

2.7 CisPt-NP

2.7.1 in vitro Versuche

Partikelsynthese

Die Synthese der mit Cisplatin kunjugierten FeOx-NP erfolgte ebenfalls durch die MagForce AG. Zur Kopplung des Zytostatikums Cisplatin an die aminosilanstabilisierten FeOx-NP wurden die Nanopartikel zuerst mittels Aminopropyltriethoxysilan derivatisiert. Dazu wurde eine Suspension unbeschichteter FeOx-NP (hergestellt aus Eisen(II)Chlorid und Eisen(III)-Chlorid durch Fällung mit Natriumhydroxid) mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt. Aminopropyltriethoxysilan wurde im molaren Verhältnis, bezogen auf die theoretisch maximale Anzahl an Hydroxygruppen, tropfenweise zugesetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit einer equimolaren Menge an Cisplatin versetzt, welches eine nukleophile Substitutionsreaktion mit der Aminogruppe des Silans einging [83].

Es wurde angenommen, dass das Cisplatin durch Dissoziation der beiden Chloroliganden und der Substitution mit H_2O ein hydrolysiertes Intermediat in wässrigen Lösungen bildete, wodurch es an die SiO_2 -Hülle binden konnte. Die Bindung war reversibel, wodurch die Freisetzung des Platinkomplexes bei erhöhten Temperaturen möglich war.

Für die Beladung der FeOx-NP mit dem Zytostatikum inkubierte man die NP in einer wässrigen CisPt-Lösung für 12 h. Das ungebundene CisPt wurde anschließend durch mehrere Waschschritte mit Wasser entfernt.

Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von CisPt

In diesem Versuchteil sollte getestet werden, ob eine thermosensitive Freisetzung des CisPt stattfand und ob diese vom pH-Wert des Mediums abhing. Hierzu wurden 50 μ l der CisPt-NP (27,7 mmol Pt/I; 3,6 mol Fe/I) in 550 μ l PBS (pH 5, 6 und 7) bzw. FBS pipettiert und nach vortexen in 3 Aliquots unterteilt. Die Proben wurden im Thermoschüttler bei 37 °C und 43 °C unterschiedlich lange inkubiert (siehe Abbildung 2.7-1).

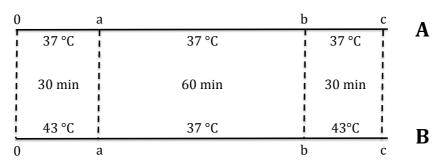


Abbildung 2.7-1: Schema zum Versuch "Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von CisPt". Gruppe A wurden durchgehend bei 37 °C inkubiert. Gruppe B beinhaltete zwei Wärmezyklen mit 43 °C.

Proben der Gruppe A wurden durchgehend bei 37 °C inkubiert, wohingegen die Proben der Gruppe B zwei Wärmezyklen mit 43 °C beinhaltete, die von einer einstündigen Inkubation bei 37 °C unterbrochen waren. Zu den jeweiligen Zeitpunkten (a, b oder c) wurden die Proben aus dem Thermoschüttler entnommen, für 20 min bei 21 100 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die CisPt-Konzentration des Überstandes wurde mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) von Herrn Basler (Abteilung DCT, MagForce AG) ermittelt.

Zytotoxizität von CisPt-NP

Die Zytotoxizität des Platinkomplexes musste nach seiner thermosensitiven Freisetzung überprüft werden um sicherzugehen, dass durch die Assoziation an die Silica-Hülle der FeOx-NP die toxische Wirkung nicht eingebüst wurde. Die Überprüfung fand anhand eines MTT-Assays statt. Hierzu wurden die CisPt-NP nach 10-minütiger Sonifizierung im Verhältnis 1:1 mit PBS pH 5 gemischt und für 20 h bei 60 °C im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 20 °C und 21 100 g für 20 min, bevor der Überstand abgenommen werden konnte. Ein Teil des Überstandes wurde für die Messung der Pt-Konzentration am ICP (A. Basler, Abteilung DCT, MagForce AG) benötigt, der Rest wurde zur Toxizitätsprüfung im MTT-Assay eingesetzt. Der Überstand wurde in Konzentrationen von 0,01-10 mg Pt/I verdünnt und wie unter 2.1.7 beschrieben, im MTT-Assay getestet. Als Referenz diente frisch eingewogenes CisPt, gelöst in H_2O .

2.7.2 in vivo Versuche

therapeutischer Effekt der CisPt-NP in vivo

Anhand eines C3H-Mammakarzinom-Modells der Maus wurde der therapeutische Effekt der CisPt-NP *in vivo* untersucht. Hierfür wurde, nach der intramuskulären Tumorimplantation (vgl. 2.2.3) in den Oberschenkel des rechten Hinterbeines, das Tumorwachstum mit einem Messschieber überprüft (vgl. 2.2.4). Sobald die Tumoren ein Volumen von $0,55 \pm 0,05 \text{ cm}^3$ erreicht hatten, wurden den Tieren $100 \,\mu\text{l}$ der Nanopartikel (3 mol Fe/l) intratumoral appliziert (2.2.6); je nach Gruppe mit oder ohne assoziiertem CisPt (830 μ g Pt/100 μ l). Für eine der Gruppen (Gruppe 2) wurde das Cisplatin mit einer Dosis von 5 mg/kg intravenös verabreicht.

Die Versuchstiere wurden in 5 Gruppen mit jeweils 10 Tieren (+2 Reservetiere) unterteilt:

- Gruppe 1 (TI-SiS-1) diente als Referenz und betrachtete das reine Wachstum des Tumors
- Gruppe 2 (TI-SiS-2) untersuchte die Wirkung der Hyperthermie in Kombination mit dem intravenös applizierten Wirkstoff (Cisplatin 10 mg, HEXAL® PI)
- Gruppe 3 (TI-SiS-3) beschäftigte sich mit der Wirkung der lokal applizierten CisPt-NP alleine, ohne den Einfluss der Hyperthermie
- In Gruppe 4 (TI-SiS-4) wurde nur die Wirkung der Hyperthermie, ohne den Einfluss des Wirkstoffes überprüft
- Gruppe 5 (TI-SiS-5) betrachtete die Kombination aus Thermotherapie mit dem an die Nanopartikel immobilisierten Cisplatin

Im direkten Anschluss an die NP-Appliktion folgte die erste Hyperthermie (8 kA/m, 100 kHz, 30 min) im magnetischen Feld (siehe 2.3.1), wobei die CisPt-NP soweit erwärmt werden sollten, dass zum einen der Platin-Komplex thermosensitiv freigesetzt und zum anderen eine Sensibilisierung der Zellen für das Zytostatikum durch die Hyperthermie erzielt werden konnte. Nach 48 h wurde die Behandlung im Magnetwechselfeldfeld, ohne erneute NP-Applikation, wiederholt. Die therapeutische Wirkung dieser Kombinationstherapie wurde anhand der Tumorgröße bestimmt (siehe 2.2.4). 17 Tage nach der NP-Applikation oder beim Erreichen eines Abbruchkriteriums (siehe 7.2) [78] wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

Intratumorale Temperatur im Magnetwechselfeld

Um sicherzustellen, dass die intratumorale Tempereratur während der Behandlung im Magnetwechselfeld auch hoch genug war, so dass der Platinkomplex von den CisPt-NP freigesetzt werden konnte, wurde die intratumorale Temperatur, wie in 2.3.1 beschrieben, mit einer fiberoptischen Sonde gemessen und aufgezeichnet. Als Referenz wurde die Kerntemperatur über eine rektale Sonde mit aufgezeichnet. Diese Untersuchung wurde mit jeweils 2 Tieren pro NP-Art durchgeführt, wobei die Messungen jeweils nur bei der ersten Hyperthermie erfolgten. Die Versuchstiere wurden anschließend dem Versuch zurückgeführt und wie unter 2.7.2 beschrieben, behandelt.

2.8 DOX-NP

2.8.1 in vito Versuche

Partikelsynthese

Für die Partikelsynthese der DOX-NP wurden FeOx-SiO₂ Grundpartikel mit einer Kerngröße von 20 nm verwendet, an deren Oberfläche ca. 550 Aminogruppen gebunden waren, über die dsDNA immobilisiert werden konnte. Die Kopplung zwischen den mit Thiolgruppen modifizierten Oligonukleotiden und den Aminogruppen der NP fand über einen Crosslinker (Sulfo-SMCC) statt. Sulfo-SMCC ist ein Crosslinker, der in einer zweistufigen Reaktion (unter verschiedenen pH Bedingungen) Thiolgruppen und Aminogruppen tragende Moleküle konjugieren kann. Das genaue Kopplungsprotokoll sowie die Beladung mit Doxorubicin ist in der Dissertation von Jiang Gao zu finden [84].

Die Sequenz der dsDNA wurde von Alexander et al. übernommen, da diese mehrere hoch affine Bindungsstellen für Doxorubicin besaß [85]. An die dsDNA konnte das Doxorubicin über Interkalation gebunden werden. Hierzu wurde das Doxorubicin im Überschuss zu den dsNDA-NP-Konjugaten gegeben und für 18 h bei 20 °C gerührt. Das nicht gebundene Doxorubicin wurde über Zentrifugation entfernt. Die Partikelsynthese erfolgte durch die MagForce AG (J. Gao, Abteilung DCT). Ziel war es die DOX-NP so zu entwickeln, dass das Doxorubicin bei Körpertemperatur in der dsDNA interkaliert blieb und erst bei ausreichender Erwärmung durch Denaturierung der dsDNA freigesetzt werden konnte (siehe Abbildung 3.2-6). Dies konnte durch den Einsatz von LNA (locked nucleic acid) umgesetzt werden. LNAs sind modifizierte Nukleotide, bei denen die Ribose bzw. die Desoxyribose über eine zusätzliche Methylenbrücke stabilisiert wird. Dies führt neben einer erhöhten thermischen Stabilität auch zu einer Resistenz gegen Exo- und Endonukleasen, wodurch eine verbesserte Stabilität in vivo erreicht werden kann.

Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von DOX

In ihrer Dissertation konnte Jiang Gao bereits zeigen, dass eine thermosensitive Freisetzung des Doxorubicins aus den DOX-NP möglich war [84]. Da in dem Tierversuch eine zweimalige Thermotherapie geplant war, sollte zum einen untersucht werden, ob bei einer zweiten Erwärmung erneut Doxorubicin freigesetzt werden konnte und zum anderen, ob diese vom pH-Wert abhängig war.

Um die Freisetzung zu testen, wurden $25~\mu l$ der Dox-NP ($280~\mu g$ Dox/ml) mit $325~\mu l$ PBS (pH 5, pH 6 oder pH 7) gemischt, in 3 Aliquots unterteilt und im Thermoschüttler bei $37~^{\circ}$ C bzw. $45~^{\circ}$ C inkubiert. Ein Schema zu den Inkubationszeiten ist unter Abbildung 2.8-1 dargestellt. In Gruppe A wurden die Proben durchgehend bei $37~^{\circ}$ C geschüttelt. Die

Gruppe B beinhaltete zwei Wärmezyklen mit 45 °C, unterbrochen von einer einstündigen Inkubation bei 37 °C. Mit dieser Gruppe sollte getestet werden, ob es bei der zweiten Wärmephase zu einer erneuten Freisetzung von Doxorubicin kam. Die Proben der Gruppe A dienten als Kontrolle. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Proben aus dem Thermoschüttler entnommen und für 10 min bei 21 100 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die spätere Bestimmung der DOX-Konzentration abgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 470 nm und 553 nm am Tecan Reader.

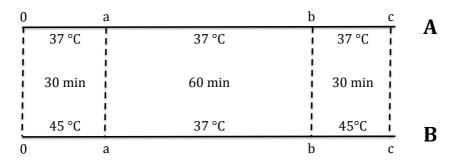


Abbildung 2.8-1: Schema zum Versuch "Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von DOX". Gruppe A wurden durchgehend bei 37 °C inkubiert. Gruppe B beinhaltete zwei Wärmezyklen mit 45 °C.

2.8.2 in vivo Versuche

Therapeutischer Effekt von DOX-NP

Die Untersuchung des therapeutischen Effektes der DOX-NP *in vivo* wurde im Rahmen einer Pilotstudie getestet. Mit ihr sollte vorab, ohne jegliche Kontrollen und daher mit geringerer Tierzahl überprüft werden, ob durch die intratumoral applizierten DOX-NP, in Kombination mit einer Hyperthermie im extern angelegten Magnetwechselfeld, eine Tumorreduktion erreicht werden konnte. Im Falle eines therapeutischen Effektes war eine Wiederhohlung des Versuchs mit allen dazugehörigen Kontrollen geplant. Grund für die Pilotstudie war das Verhindern von unnötigen Leiden, Schäden oder Schmerzen der Tiere bei einem negativen Studienergebnis und damit einer Reduzierung der Versuchstierzahl.

Für die Studie wurden, wie unter 2.2.3 beschrieben, C3H-Zellen intramuskulär in die Oberschenkel von C3H-Mäusen implantiert, das Tumorwachstum mit einem Messschieber überwacht (siehe 2.2.4) und bei einem Tumorvolumen von 0,55 \pm 0,05 cm 3 100 μ l der DOX-NP (0,9 mol Fe/I, 180 μ g DOX/mI) intratumoral appliziert (vgl. 2.2.6). Die erste Hyperthermie im Magnetwechselfeld (15 \pm 1 kA/m, 100 kHz, 30 min) fand unmittelbar nach der NP-Applikation statt und wurde 48 h später unter denselben Bedingungen (ohne NP-Applikation) wiederholt (siehe 2.3.1). Die hohen Feldstärken in den Pilotstudien wurden gewählt, um intratumoral eine höchst mögliche, thermosensitive Wirkstofffreisetzung zu

gewährleisten. Durch die Erwärmung im Magnetwechselfeld sollte das Doxorubicin thermosensitiv freigesetzt werden und somit eine therapeutische Wirkung hervorrufen. Diese wurde über die Messung des Tumorvolumens kontrolliert. Der Versuch wurde mit einer Gruppengröße von 5 Tieren durchgeführt. Nach einem Beobachtungszeitraum von 9 Tagen oder beim Eintreten eines Abbruchkriteriums (siehe 7.2) [78] wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

2.9 MTX-NP

2.9.1 in vitro Versuche

Partikelsynthese

Die MTX-NP basierten auf FeOx-SiO₂ Grundpartikeln, an die über Sulfo-SMCC Oligonukleotide immobilisiert wurden. Die Grundpartikel wurden von der MagForce AG wie in Patent EP 1871423 B1 beschrieben synthetisiert. Die genaue Kopplungschemie zur Bindung der Oligonukleotide an die Nanopartikel ist in der Dissertation von Jiang Gao [84] zu finden (vgl. 2.8.1). Ein zweites, zum ersten komplementäres Oligonukleotid wurde kovalent an den Wirkstoff Methotrexat gebunden. Hierzu wurde die Carboxylgruppe des Methotrexats genutzt, um mittels DCC/NHS ein aktives Intermediat zu bilden, das wiederum an ein aminofunktionalisiertes Oligonukleotid binden konnte [84]. Beide Komponenten wurden zusammengebracht und kurz auf 95 °C erhitzt, um die Oligonukleotide zu denaturieren. Durch anschließende Inkubation bei einer Temperatur knapp unter dem Schmelzpunkt des Oligonukleotids, paarten sich beide Stränge zu einem Doppelstrang [86]. Nach Hybridisierung der beiden Einzelstränge erhielt man ein dsDNA-NP-Konjugat, an das das modifizierte Methotrexat gebunden war (MTX-NP). Durch ausreichende Erwärmung im extern angelegten magnetischen Wechselfeld konnte die entstandene dsDNA denaturieren und der Wirkstoff zusammen mit dem anhängenden Oligonukleotid freigesetzt werden. Die ssDNA sollte, wenn sie ins Innere einer Zelle gelangte, schnell abgebaut werden, so dass der Wirkstoff frei vorlag und seine zytotoxische Wirkung ausüben konnte (vgl. Abbildung 3.2-9).

Zytotoxizität von MTX-NP

Die Zytotoxizität des modifizierten Methotrexats nach der thermosensitiven Freisetzung wurde mit Hilfe eines MTT-Assays in der Arbeit von Jiang Gao überprüft. Der Test wurde mit Zellen einer Adenokarzinom-Zelllinie des Dickdarms (WiDr, ATCC® CCL- 218^{TM}) [40], durchgeführt, da diese Zellen besonders sensitiv für Methotrexat sind. Abweichungen von der in 2.1.7 beschrieben Durchführung bestanden lediglich in der Zelllinie und im Aussaattiter von 2,5 x 10^3 Zellen. Eine detaillierte Durchführung ist in der Dissertatin von Jiang Gao zu finden [84].

2.9.2 in vivo Versuche

Therapeutischer Effekt von MTX-NP

Neben den DOX-NP wurden auch die MTX-NP auf ihren therapeutischen Effekt hin in einer Pilotstudie untersucht (vgl. 2.8.2). Den Versuchstieren wurde, wie oben beschrieben, ein Tumor intramuskulär appliziert und dessen Wachstum regelmäßig kontrolliert. Bei einem Tumorvolumen von $0.55 \pm 0.05 \, \mathrm{cm}^3$, wurden $100 \, \mu l$ der MTX-NP (1 mol Fe/I, 79 μg MTX/mI) intratumoral appliziert (siehe 2.2.6). Auch die folgenden Hyperthermien, sowohl die erste als auch die zweite ($15 \pm 1 \, \mathrm{kA/m}$, $100 \, \mathrm{kHz}$, $30 \, \mathrm{min}$), wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Im magnetischen Wechselfeld wurden die MTX-NP aufgrund der Brown und Néel Relaxatation erhitzt, wodurch die dsDNA denaturieren und die MTX-modifizierte ssDNA lokal freigesetzt werden sollte. Der therapeutische Effekt in Form einer Tumorreduktion, sollte mittels Messchieber nachweisbar sein. Der Versuch wurde mit 5 Tieren durchgeführt, ohne jegliche Kontrollgruppen (siehe 2.8.2). 9 Tage nach der NP-Applikation oder beim Eintreten eines Abbruchkriteriums (siehe 7.2) [78], wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

2.10 PCX-NP

2.10.1 in vitro Versuche

Partikelsynthese am Hochdruckhomogenisator

Die PCX-NP bestanden aus zwei Komponenten. Komponente eins war das NanoTherm[®] (FeOx-NP beschichtet mit Aminosilan (DIAMO, 3-(2-Aminoethylamino)-propyl-trimethoxysilan), das man für die Thermotherapie im magnetischen Wechselfeld benötigte und das von der MagForce AG zur Verfügung gestellt wurde. Komponente zwei war eine Paclitaxel-Nanosuspension (PCX-NS), die mittels Hochdruckhomogenisation produziert wurde und als Zytostatikum diente. NanoTherm[®] agglomeriert im Tumorgewebe, wodurch sich ein stabiles Depot ausbildet [50]. Dieser Effekt sollte genutzt werden, um die PCX-NS in dem Depot mit einzuschließen, so dass der Wirkstoff langsam freigesetzt werden konnte.

Die Formulierung der PCX-NS wurde aus der Dissertation von Bernhard Böhm entnommen, da er in seiner Arbeit die Nanosuspension bereits soweit optimiert hatte, dass sie für *in vivo* Studien einsetzbar war [87]. Sie setzte sich wie folgt zusammen:

- 1,2 % Paclitaxel
- 0,5 % Poloxamer 188
- 98,3 % H₂O

Damit die Nanosuspension für den Tierversuch eingesetzt werden konnte, ohne eine inflammatorische Reaktion bei den Versuchstieren auszulösen, mussten die Partikel unter sterilen Bedingungen produziert werden. Daher fanden alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte unter einer Sterilwerkbank statt. Der Hochdruckhomogenisator wurde in Einzelteilen autoklaviert und unter einer Sterilbank erneut zusammengebaut. Das Poloxamere 188 wurde in Wasser unter vorsichtigem Rühren gelöst, bevor das Paclitaxel zugegeben wurde. Poloxamer 188 ist ein Blockcopolymer mit sehr niedriger Toxizität [88], das der Nanosuspension zur besseren Benetzung der Feststoffpartikel und zur Verhinderung der Aggregation zugesetzt wurde. Das Gemisch wurde bei unterschiedlichen Drücken vorhomogenisiert und anschließend 10 Zyklen lang mit 1500 bar unter Kühlung homogenisiert. Die entprechenden Zyklen und Drücke waren wie folgt:

- 2 x 100 bar
- 2 x 500 bar
- 2 x 1000 bar
- 10 x 1500 bar

Die PCX-NS wurde bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor dem Einsatz im Tierversuch wurden die beiden Komponenten (NanoTherm[®] und PCX-NS) gemischt und anschließend gemeinsam intratumoral appliziert.

Bei der hier verwendeten Hochdruckhomogenisaton (Kolben-Spalt-Homogenisator) wurde die Flüssigkeit mit hohem Druck durch einen engen Spalt gepresst. Dieser Homogenisation lag das Prinzip nach Bernoulli zu Grunde, welches aussagt, dass die Summe der dynamischen und statischen Drücke in einem durchströmten System immer konstant ist. Sobald die Flüssigkeit mit hohem Druck durch den Spalt gepresst wird, steigt der dynamische Druck, was zu einer entsprechenden Abnahme des statischen Druckes führt. Sinkt dieser unterhalb des Dampfdruckes der Flüssigkeit, beginnt diese zu sieden. Beim Austritt aus dem Spalt implodieren die Gasblasen durch den plötzlichen Anstieg des statischen Drucks (Kavitation). Hierbei können die in der Umgebung befindlichen Partikel zerstört und somit zerkleinert werden [89].

Sterilität der PCX-NP

Unmittelbar nach der Produktion der Nanosuspension wurde ein Aliquot in Zellkulturmedium gegeben und für 96 h bei 37 °C inkubiert um die Sterilität der Suspension zu überprüfen. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung mittels Hefeextrakt- und Malzextrakt-Agar. 250 µl der PCX-NS wurden hierfür auf den Platten ausgestrichen und für 96 h bei 30 °C inkubiert. Die anschließenden Überprüfungen erfolgten sowohl makro- als auch mikroskopisch.

PCX-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der PCX-NS wurde mittels RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography) von Inge Volz (Pharmazeutische Technologie, FU Berlin) bestimmt. Die verwendete Anlage, bestehend aus HPLC-Pumpe, Detektoren, Autosampler und Software, war von Kontron Instruments. Die zu messende Probe wurde mithilfe eines Eluenten (mobile Phase) zu einer Trennsäule (stationäre Phase) gebracht. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus MeOH: H_2O im Verhältnis 13:7 mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 25 °C eingesetzt. Die Probenschleife betrug 20 μ l. Die Säule (Lichrospher 60 RP select B, 125 x 4 mm) bestand aus Kieselgel mit einer Korngröße von 5 μ m, welches mit funktionellen Gruppen beschichtet war. Die Substanzen der zu messenden Probe wurden unterschiedlich lange von den Gruppen gebunden und konnte so aufgetrennt werden. Nach einer Retentionszeit von 4,2 min konnte das Paclitaxel vom nachgeschalteten Detektor bei 230 nm erfasst werden. Mit Hilfe der Software (KromaSystem 2000) wurde die AUC (Area Under the Curve) des Chromatogramms bestimmt.

Lagerstabilität der PCX-NS

Um Rückschlüsse auf die Lagerstabilität der Nanosuspension ziehen zu können, wurde die Partikelgröße zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen und mit den Werten unmittelbar nach der Produktion verglichen. Die Lagerung fand bei Raumtemperatur und 4 °C statt.

Eine Größenbestimmung mittels Photonenkorrelationsspekroskopie (PCS) war nicht möglich, da die Proben sowohl in Wasser als auch in Poloxamer 188 beim Verdünnen sofort ausfielen. Eine Messung am Laserdiffraktometer kam aus Sicherheitsgründen nicht in Frage, da das Gerät ansonsten mit Zytostatika verunreinigt worden wäre. Daher erfolgte die Überprüfung der Partikelgröße am Lichtmikroskop.

Hierzu wurde nach entsprechenden Lagerzeiten (1–47 Tage), ein Objektträger mit einem Tropfen der Nanosuspension beträufelt, auf den ein Deckglas gelegt wurde. Um das Mikroskop vor einer Verunreinigung mit Zytostatika zu schützen, wurden die Ränder des Objektträgers und dem darauf liegenden Deckglas mit Tesafilm verschlossen, so dass kein Paclitaxel austreten konnte. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit 100-, 200-und 400-facher Vergrößerung.

Da sich die Lagerstabilität für den therapeutischen Einsatz nicht eignete, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Nanosuspension vor ihrer Anwendung zuverlässig zu resuspendieren. Dies konnte durch eine Ultraschallbehandlung verwirklicht werden. Die Suspension wurde für eine Minute sonifiziert und anschließend nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1–5 h) am Lichtmikroskop untersucht. Zum Einsatz kamen Proben, die nach der Produktion für 8 und 47 Tage gelagert wurden.

Sättigungslöslichkeit der PCX-NS

Die Sättigungslöslichkeit ist neben der Temperatur und dem Lösungsmittel auch von der Partikelgröße abhängig. Sobald Partikel kleiner als $1-2~\mu m$ sind, haben sie, bedingt durch die steigende Krümmung der Partikeloberfläche und dem daraus resultierenden erhöhten Lösedruck, einen Einfluss auf die Sättigungslöslichkeit [89, 90]. Die Sättigungslöslichkeit der Nanosuspension wurde bestimmt, indem 1~ml der PCX-NS (1,2 % PCX) in 20~ml Wasser verdünnt und anschließend bei $37~^{\circ}$ C geschüttelt wurde. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde jeweils 1~ml entnommen und für 15~min bei 25~524~g zentrifugiert. Die PCX-Konzentration des Überstandes wurde mit Hilfe der HPLC (vgl. 2.10.1) gemessen. Als Referenz diente eine äquivalente Menge Paclitaxel als Feststoff, der in Wasser geschüttelt wurde.

Aggregationsverhalten von PCX-NS + FeOx-NP

Für die *in vivo* Studien wurde die PCX-NS mit NanoTherm[®] gemischt und anschließend gemeinsam intratumoral appliziert. Das Aggregationsverhalten dieses Gemisches wurde in verschiedenen Medien getestet und mit dem Aggregationsverhalten von NanoTherm[®] alleine verglichen.

Für die Untersuchung wurde das NanoTherm[®] auf Raumtemperatur erwärmt und auf einem Rüttler für 30 min geschüttelt. Anschließend wurden 20,8 μ l der PCX-NS (\triangleq 0,25 mg PCX) mit 79,2 μ l NanoTherm[®] (6 M) gemischt, dieses in 5 ml vorgewärmtes Medium (37 °C) geträufelt und das visuelle Aggregationsverhalten zu den jeweiligen Zeitpunkten dokumentiert. Nach 5 min wurden die Proben aufgeschüttelt und das Aggregationsverhalten weiter aufgezeichnet.

Als Medien kamen natives FBS, Zellkulturmedium RPMI 1640 mit Zusätzen, PBS pH 7 und $\rm H_2O$ zum Einsatz.

Ausbreitung der PCX-NS im Fleischwürfelmodell

Die Ausbreitung der PCX-NS im Gewebe testete man an einem Tumormodell nach der Methode von Shikanov *et al.* [91]. Es sollte untersucht werden, ob die PCX-NS zeitabhängig ins Gewebe diffundieren konnte. Als Modell diente ein Fleischwürfel (Pute) mit einer Größe von ca. 1 cm x 2 cm x 1 cm. In diesen Fleischwürfel wurden zentral 50 µl der Nanosuspension injiziert (Abbildung 2.10-1 a). Nach einer Inkubationszeit von 6 h, 23 h und 4 Tagen wurde der Fleischwürfel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in 9 Scheiben (je 1 mm dick) geschnitten (Abbildung 2.10-1 b). Die Scheiben wurden jeweils in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem sie dann mit einer Mikropistille homogenisiert wurden, bevor man sie mit 1 ml Ethylacetat versetzte. Das Ethylacetat ließ man unter einem

Abzug abdampfen. Die getrockneten Proben wurden erneut homogenisiert und nochmals mit 1,5 ml Ethylacetat versetzt, mit dem das Paclitaxel während einer 4-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur eluiert werden konnte. Abschließend wurden die Proben für 10 min bei 21 100 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und dieser in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator (Speed Vac) für 90 min eingedampft. Vor der Konzentrationsbestimmung des PCX-Gehaltes der verschiedenen Scheiben (untersch. Entfernung zur Injektionsstelle) mit Hilfe der HPLC (vgl. 2.10.1), wurde das eingedampfte Paclitaxel in 0,5 ml Ethanol gelöst.

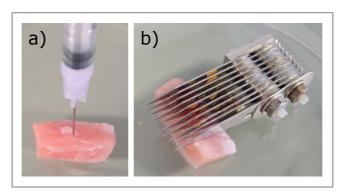


Abbildung 2.10-1: Fleischwürfelmodell zur Verteilung von PCX-NS im Tumor. a) Applikation von PCX-NS in einen Fleischwürfel, b) Schneiden des Fleischwürfels in 9 gleichmäßige Scheiben

2.10.2 in vivo Versuche

Therapeutischer Effekt von PCX-NP

Auch diese Partikelart sollte im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus untersucht werden. Wie bereits beschrieben, bestanden die zu untersuchenden PCX-NP aus zwei Komponenten, der PCX-Nanosuspension und NanoTherm[®] (6 M), die unmittelbar vor der Applikation gemischt wurden. Der therapeutische Effekt dieser Kombinationstherapie, nach zweimaliger Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld, wurde ebenfalls im Rahmen einer Pilotstudie untersucht.

Den Versuchstieren (Gruppengröße von 5) wurde, wie bereits beschrieben, intramuskulär ein Tumor in den Oberschenkel implantiert (siehe 2.2.3). Man ließ die Tumoren bis auf ein Volumen von $0.55 \pm 0.05 \, \mathrm{cm^3}$ wachsen, bevor das PCX-NP Gemisch appliziert wurde. Die PCX-NS wurde sonifiziert, das NanoTherm® auf Raumtemperatur temperiert und für 30 min geschüttelt. $20.8 \, \mu l$ der PCX-NS ($\triangleq 0.25 \, \mathrm{mg}$ PCX) wurden mit $79.2 \, \mu l$ NanoTherm® (6 M) gemischt und zusammen intratumoral appliziert (siehe 2.2.6). Dies entsprach bei einer 25 g schweren Maus einer PCX-Dosis von $10 \, \mathrm{mg/kg}$. Wie oben bereits beschrieben, folgten zwei Thermotherapien im magnetischen Wechselfeld (vgl. 2.3.1) bei $15 \pm 1 \, \mathrm{kA/m}$ und $100 \, \mathrm{kHz}$ für 30 min, wodurch die Tumorzellen für das Zytostatikum sensibilisiert werden sollten. Der

therapeutische Effekt wurde über 9 Tage mit Hilfe des Tumorvolumens verfolgt. Anschließend, oder beim Auftreten eines Abbruchkriteriums (siehe 7.2) [78], wurden die Tiere, wie oben beschrieben, terminiert.

3. Ergebnisse

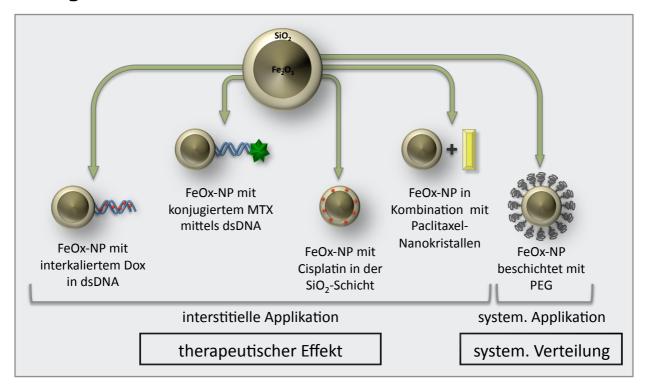


Abbildung 3.1: Überblick der untersuchten FeOx-NP. Dox: Doxorubicin, MTX: Methotrexat, dsDNA: DNA als Doppelstrang

In der vorliegenden Arbeit wurden FeOx-NP mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen untersucht. Die jeweiligen NP-Arten basierten alle auf denselben superparamagnetischen Grundpartikeln, deren Kerne aus einem Gemisch von Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit (γ - Fe_2O_3) bestanden. Die Kerne waren darüber hinaus durch kolloidale Schutzhüllen aus SiO_2 stabilisiert. Die primäre Funktion der Hüllen bestand darin, eine kolloidale Verteilung in wässrigem Medium zu erreichen und die Nanopartikel vor Agglomerationen zu schützen. Die Grundpartikel waren aus 12-15 nm großen FeOx-Kernen aufgebaut, die von einer 5 nm dicken SiO_2 Schale umhüllt wurden.

In wässriger Umgebung erhöhte die SiO₂ Schicht die Stabilität der Partikel und bot freie OH-Gruppen, wodurch eine Anbindung der therapeutisch wirksamen Substanzen ermöglicht wurde. Die Konjugate aus magnetischen Nanopartikeln und therapeutisch wirksamen Substanzen waren durch die Art der Bindung so konstruiert, dass eine gezielte Freisetzung der therapeutisch wirksamen Substanz mittels eines externen Magnetwechselfeldes möglich war. Es wurden vier wirkstoffassoziierte NP-Konjugate für die interstitielle Applikation hergestellt und deren therapeutischer Effekt geprüft. Des Weiteren wurde eine Oberflächenmodifizierung mit PEG getestet, mit der die systemische Verteilung der NP nach intravenöser Applikation untersucht wurde. Alle hier verwendeten FeOx-NP wurden von der MagForce AG

unter den dort geltenden Verfahrensanweisungen hergestellt und mit freundlicher Genehmigung für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. In Abbildung 3.1 sind die getesteten NP-Arten mit den entsprechenden Applikationswegen als Übersicht zusammengefasst. Im Folgenden sind die Ergebnisse der jeweiligen Studien aufgezeigt, die zum Teil auch schon dort diskutiert werden. Die Diskussion zu den *in vivo* Ergebnissen findet sich im Diskussionsteil der Arbeit unter Punkt 4.

3.1 Systemische Verteilung von FeOx-NP nach i.v. Applikation

3.1.1 PEGylierte NP

Die FeOx-SiO₂ Grundpartikel wurden wie unter 2.6.1 beschrieben hergestellt und mit PEG modifiziertem Silan gekoppelt. Die NP werden durch das PEG abgeschirmt, wodurch das Aggregationsverhalten der Partikel vermindert wird. In der Blutbahn verringern sich durch die PEGylierung die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Proteinen, was einen geringeren Abbau durch phagozytierende Zellen zur Folge hat. Hierdurch steigt die Zirkulationszeit in der Blutbahn an.

In Abbildung 3.1-1 a) ist eine TEM Aufnahme der FeOx-SiO₂ Grundpartikel gezeigt. Die FeOx-Kerne mit einem Durchmesser von 12–15 nm lassen sich gut als dunkle Gebilde erkennen, die von einer helleren Schicht umgeben sind. Diese helle Schicht ist die SiO₂ Schale, mit einer durchschnittlichen Dicke von 5 nm. In Abbildung 3.1-1 b) sind die Partikel nach der Kopplung mit PEG modifiziertem Silan gezeigt.

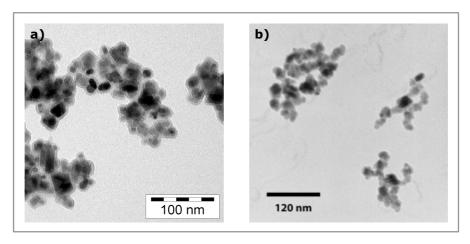


Abbildung 3.1-1: TEM Aufnahme von $FeOx-SiO_2$ Grundpartikeln a) ohne und b) mit gekoppeltem PEG Silan.

In der TEM Aufnahme unterscheiden sich diese PEGylierten NP in Form und Größe nicht von den Grundpartikeln, da die Präparate für die TEM Untersuchung getrocknet und fixiert werden müssen. Beim hydrodynamischen Durchmesser, also dem Durchmesser des Teilchens samt der fest gebundenen Hydratschicht, sind hier allerdings deutliche Unterschiede zu erwarten. Der hydrodynamische Durchmesser der PEGylierten NP sollte aufgrund der hydratisierten PEG-Ketten deutlich größer sein, als jener der Grundpartikel.

3.1.1.1 in vitro Versuche

Stabilität der PEGylierten NP in Medium

Die Stabilität der PEGylierten NP wurde sowohl in Zellkulturmedium RPMI 1640 mit Zusätzen (Vitaminen, Pyruvat und 10 % FBS) als auch in FBS alleine getestet. Weder in dem Ansatz mit Zellkulturmedium, noch in dem mit FBS, konnten Anzeichen einer Aggregation und einer damit verbundenen Sedimentation der Partikel beobachtet werden.

Zelluläre Aufnahme von PEGylierten NP

Um die zelluläre Aufnahme von PEGylierten NP zu bestimmen, wurden die Partikel zusammen mit C3H-Zellen bei 37 °C unterschiedlich lange inkubiert und anschließend mittels TEM betrachtet (vgl. 2.6.1). Mit dieser Methode konnte nur eine qualitative Aussage über das Aufnahmeverhalten der NP gemacht werden. Für eine quantitative Bestimmung der zellulären Aufnahme von NP wurde ein kolorimetrischer Test (Eisen-Küvettentest Spectroquant®) genutzt, mit dem der Eisengehalt der Zellsuspension ermittelt wurde (vgl. 2.4.2).

Repräsentative TEM Aufnahmen nach einer Inkubationszeit von a) 10 min, b) 30 min and c) 24 h sind in Abbildung 3.1-2 dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, findet bereits nach 10 min eine Internalisierung der PEGylierten NP statt. Die Partikel werden in vesikulären Strukturen im Zytoplasma angereichert. Einzelne kleine Vesikel, gefüllt mit wenigen Partikeln, sind im Zytoplasma in Abbildung 3.1-2 a) erkennbar (roter Pfeil). Nach 30 min hat sich die Anzahl dieser Vesikel entsprechend erhöht und nach 24 h sind große Vesikel, gefüllt mit vielen NP, deutlich sichtbar (Abbildung 3.1-2 c). Bei genauerer Betrachtung der PEGylierten NP in den großen Vesikeln kann man erkennen, dass die internalisierten Partikel ihre ursprüngliche Form behalten haben. Trotz der Internalisierung liegen sie nur schwach aggregiert in den Vesikeln vor.

Quantitativ konnte die Aufnahme der NP nur bei Proben ermittelt werden, die länger als 1 h inkubiert wurden. Bei Inkubationszeiten unter 1 h war der Eisengehalt zu gering, um ihn mit dieser Methode von dem Hintergrundrauschen unterscheiden zu können. Es zeigte sich, dass nach 24 h eine maximale Aufnahme mit einem Fe-Gehalt von 10 pg/Zelle erreicht wurde.

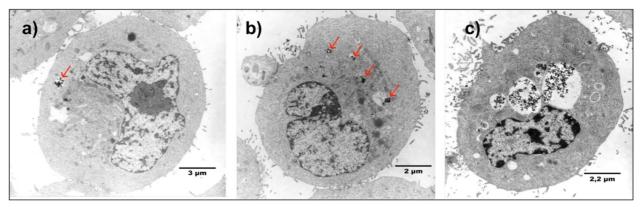


Abbildung 3.1-2: Zeitabhängige Aufnahme von PEGylierten NP in C3H-Zellen. a) Zellen mit PEGylierten NP nach 10 min, b) nach 30 min, c) nach 24 h. Mit freundlicher Genehmigung von Nils Bohmer.

Zytotoxizität von PEGylierten NP

Die Toxizität der PEGylierten NP wurde mit Hilfe eines MTT-Tests auf C3H-Zellen getestet. Als Referenz wurden aminosilanbeschichtete Eisenoxid-Nanopartikel ohne PEGylierung getestet. Die Zellen wurden zusammen mit den NP in Konzentrationen von 0,01–3 mg Fe/ml für 24 h bei 37 °C inkubiert, bevor die MTT-Lösung zugegeben wurde. Das MTT wird in Zellen zu Formazan reduziert, welches nach Zugabe von DMSO photometrisch bestimmt werden kann und ein Maß für die Vitalität der Zellen darstellt (siehe 2.1.7).

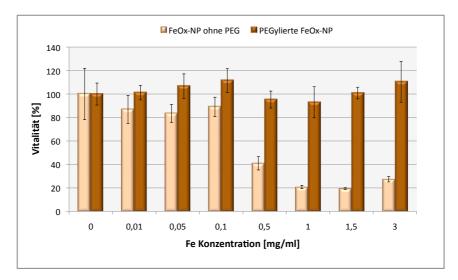


Abbildung 3.1-3: Untersuchung der Zytotoxizität von PEGylierten FeOx-NP auf C3H-Zellen mit Hilfe eines MTT Assays. Zellen wurden mit den NP für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die PEGylierten NP keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatten (Abbildung 3.1-3). Selbst bei Konzentrationen bis zu 3 mg Fe/ml konnte keine Zytotoxizität detektiert werden. FeOx-NP ohne PEGylierung, die als Referenz eingesetzt wurden, zeigten schon ab einer Konzentration von mehr als 0,1 mg Fe/ml eine deutliche Inhibierung des Zellwachstums.

3.1.1.2 in vivo Versuche

Systemische Verteilung von PEGylierten NP

Nachdem die Zytotoxizität der PEGylierten NP ausgeschlossen wurde, konnte die systemische Verteilung der Partikel nach intravenöser Applikation im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus untersucht werden. Ziel hierbei war es, die Anreicherung der Partikel in den Organen und im Tumor nach systemischer Applikation zeitabhängig darzustellen. Zusätzlich wurde getestet, ob es möglich ist, durch eine Erwärmung des Tumors die passive Anreicherung im Tumor zu erhöhen. Hierzu wurde, wie unter 2.2.3 beschrieben, ein Tumor intramuskulär in den Oberschenkel eines Hinterbeines implantiert. Sobald die Tumoren ein Volumen von $0.65 \pm 0.1 \, \text{cm}^3$ erreicht hatten, wurden den Tieren $100 \, \mu l$ der PEGylierten NP $(0.61 \, \text{mol Fe/l})$ intravenös in die Schwanzvene appliziert. Nach unterschiedlich langen Zirkulationszeiten $(1 \, h, \, 6 \, h, \, 24 \, h, \, 72 \, h)$ wurden die Mäuse terminiert und deren Organe, sowie der Tumor für quantitative Untersuchungen (Fe-Analytik) zur Anreicherung mit PEGylierten NP entnommen und entsprechend aufgearbeitet (siehe 2.4).

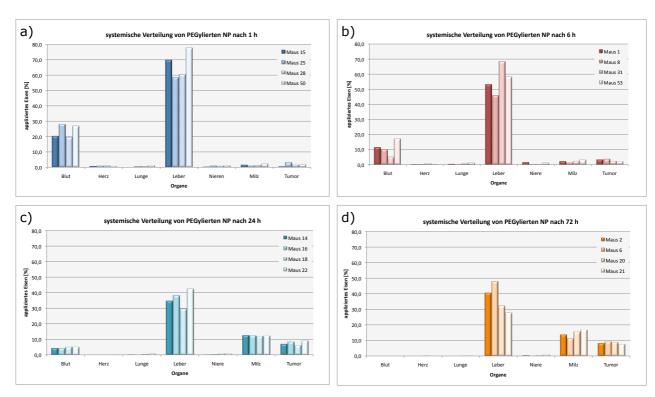


Abbildung 3.1-4: systemische Verteilung von PEGylierten NP nach intravenöser Applikation in die Schwanzvene von tumortragenden C3H-Mäusen. a) 1 h nach Applikation, b) 6 h nach Applikation, c) 24 h nach Applikation, d) 72 h nach Applikation. Verteilung in % des applizierten Eisens.

In Abbildung 3.1-4 sind die einzelnen Gruppen mit den jeweiligen Tieren aufgezeigt. In a) ist die systemische Verteilung der PEGylierten NP 1 h nach der Applikation gezeigt; in b) 6 h, in c) 24 h und in d) 72 h nach der Applikation. Die Fe-Gehalte sind auf das applizierte Eisen

normiert und in Prozent dargestellt. Aus den Fe-Gehalten kann direkt auf die NP-Menge geschlossen werden, da sie sich proportional zueinander verhalten. Die im Folgenden genannten prozentualen Fe-Werte entsprechen den Mittelwerten der einzelnen Gruppe.

Es konnte gezeigt werden, dass die NP-Verteilung in den jeweiligen Organen bzw. Tumoren zeitabhängig variierte. Der Fe-Gehalt im Blut nahm von 23,7 % (1 h nach Applikation) über 11,0 % (6 h nach Applikation) auf 4,9 % des applizierten Eisens (24 h nach Applikation) ab. 72 h nach der Applikation lag der Wert unter der Nachweisgrenze der Methode. Die Fe-Gehalte der Herzen, der Lungen und der Nieren lagen zu allen vier Zeitpunkten unter einem Prozent und damit unter der Nachweisgrenze. In den Lebern konnte der größte Anteil des applizierten Eisens wiedergefunden werden, was auf eine Aufnahme durch das RES schließen lässt. Dieser nahm von 66,4 % (1 h nach Applikation) über die Zeit bis zu 37 % des applizierten Eisens (72 h nach Applikation) ab. In den Milzen und in den Tumoren konnte eine Anreicherung der PEGylierten NP über die Zeit gezeigt werden. In den Milzen stieg der Fe-Gehalt von 1,5 % über 2,4 % und 12,4 % bis auf 14,5 % an (1 h, 6 h, 24 h und 72 h nach Applikation). Die passive Anreicherung der Nanopartikel in den Tumoren erhöhte sich dank des EPR-Effektes von 1,7 % über 3,0 % und 7,8 % bis auf 8,6 % des applizierten Eisens (1 h, 6 h, 24 h und 72 h nach Applikation).

In Abbildung 3.1-5 b) ist exemplarisch ein C3H-Tumor 72 h nach i.v. Applikation der PEGylierten NP gezeigt. In a) ist der Tumor eines Kontrolltieres (ohne NP-Applikation) dargestellt. Die Tumoren unterscheiden sich deutlich in der Färbung. Der Tumor des Kontrolltieres ist deutlich heller und rosiger. Das Tier, dem PEGylierte NP appliziert wurden, weist im Tumor hingegen eine dunkle, bräunliche Verfärbung auf, was ein erster Hinweis für eine passive Anreicherung der Partikel im Tumor war.

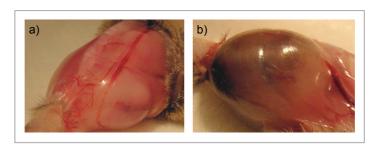


Abbildung 3.1-5: Exemplarischer Tumor einer C3H-Maus im rechten Hinterbein. a) Tumor eines Kontrolltiers, ohne Applikation von FeOx-NP. b) Tumor 72 h nach systemischer Applikation von PEGylierten NP in die Schwanzvene.

NP-Anreicherung im Tumor durch regionale Erwärmung

Neben den Untersuchungen zur systemischen Verteilung der PEGylierten NP nach i.v. Applikation war es ein weiteres Ziel, die Anreicherung der Nanopartikel im Tumor durch eine regionale Erwärmung des Tumors zu erhöhen bzw. zu testen, ob sich diese erhöhen ließ. Hierfür wurde der Tumor, unmittelbar nach der i.v. Applikation der PEGylierten NP, im Wasserbad für 30 min bei 43 °C erwärmt (siehe 2.3.2). Die Wasserbadhyperthermie wurde nur bei einer Versuchsgruppe durchgeführt, um die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren. Ausgewählt wurde der Zeitpunkt, an dem im Tumor die größte passive Anreicherung (ohne Wasserbadhyperthermie) erreicht werden konnte. Dies war 72 h nach NP-Applikation der Fall. Nach Ablauf der 72 h wurden die Tiere getötet und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Durch die Wärmebehandlung in Kombination mit der verlängerten Zirkulationszeit der PEGylierten NP, konnte der EPR-Effekt soweit verstärkt werden, dass die Anreicherung der Nanopartikel im Tumor von 8,6 % auf 12,6 % des applizierten Eisens signifikant verbessert werden konnte (p-Wert von 0,001). Dies entsprach einer Erhöhung um 46,5 %. Die Zusammenfassung der systemischen Verteilung von PEGylierten NP nach i.v. Applikation, sowie die intratumorale Anreicherung nach 72 h mit und ohne Hyperthermie, sind in Abbildung 3.1-6 dargestellt.

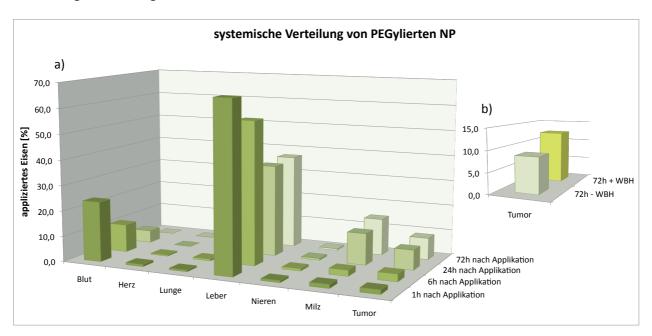


Abbildung 3.1-6: a) Zusammenfassung der systemischen Verteilung von PEGylierten NP nach intravenöser Applikation in die Schwanzvene von tumortragenden C3H-Mäusen. b) intratumorale Anreicherung von PEGylierten SPIONs 72h nach Applikation; mit und ohne Wasserbadhyperthermie (WBH). Verteilung in % des applizierten Eisens.

3.2 Therap. Effekt von wirkstoffassoziierten FeOx-NP nach i.t. Applikation

3.2.1 CisPt-NP

Die CisPt-Partikel wurden von der Firma MagForce, wie unter 2.7 beschrieben, produziert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um den gleichen Grundpartikel, der auch schon für die PEGylierten NP eingesetzt wurde, an dessen Silica-Hülle ein Platin-Komplex assoziiert werden konnte. Diese Bindung war reversibel, wodurch bei erhöhten Temperaturen eine Dissoziation des Platin-Komplexes möglich wurde. Damit konnten die Nanopartikel nach intratumoraler Applikation, im extern angelegten Magnetwechselfeld erwärmt und für eine Hyperthermie genutzt werden. Zeitgleich diente die Erwärmung der lokalen Freisetzung des Wirkstoffes im Tumor, wodurch eine hohe intratumorale Wirkstoffkonzentration erreicht werden konnte. Da der Wirkstoff nur im Tumor und nicht systemisch freigesetzt wurde, war kaum mit Nebenwirkungen zu rechnen. Diese Kombination aus lokal hohen Wirkstoffkonzentrationen und Hyperthermie in Verbindung mit geringen Nebenwirkungen machen die wirkstoffgekoppelten Nanopartikel so interessant für die Tumortherapie.

3.2.1.1 in vitro Versuche

Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von CisPt

Die temperatur- und pH-abhängige Pt-Freisetzung aus den CisPt-NP wurde in verschiedenen Medien und bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Es sollte untersucht werden, ob eine thermosensitive Freisetzung des CisPt stattfindet und ob diese pH-abhängig ist. Da der pH-Wert in Tumoren mit pH 5–6,8 niedriger als in gesundem Gewebe ist [92], wurden die Versuche in PBS im Bereich von pH 5–7 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Freisetzung in FBS getestet. Um den Einfluss der Temperatur zu ermitteln, wurden die Partikel zum einen konstant mit 37 °C und zum anderen mit zwei Wärmephasen (43 °C, 30 min) behandelt (Versuchsdurchführung siehe 2.7.1).

Aus Abbildung 3.2-1 wird ersichtlich, dass die Pt-Freisetzung pH-abhängig und thermosensitiv war. Die Proben, die in PBS pH 7 inkubiert wurden, zeigten in beiden Fällen die niedrigste Pt-Freisetzung unabhängig von den Temperaturen. Eine Verbesserung konnte durch den Einsatz von PBS pH 6 erzielt werden. Die höchste Pt-Freisetzung wurde in PBS pH 5 erreicht. Durch die Erwärmung konnten diese Werte noch verbessert werden. Nach der ersten Wärmephase (43 °C, 30 min) erhöhte sich die Pt-Freisetzung von 15 % auf 20,4 %. Nach der zweiten Wärmephase konnten anstatt 27,7 % (konstante Temperatur) 33,7 %

gemessen werden. Die Proben, die in FBS inkubiert wurden, zeigten in beiden Fällen Werte, die unter der Pt-Freisetzung von PBS pH 7 lagen.

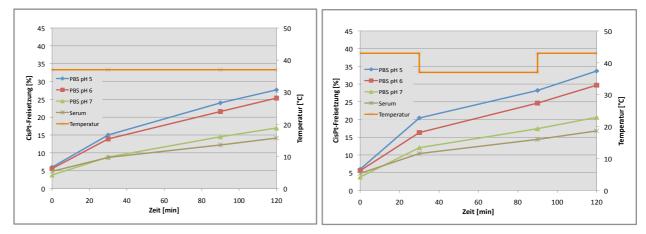


Abbildung 3.2-1: Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von CisPt aus CisPt-NP nach Erwärmung im Thermoschüttler. Links: bei 37 °C für 120 min, rechts: mit zwei Wärmephasen (43 °C für 30 min, 37 °C für 60 min, 43 °C für 30 min).

Es stellte sich die Frage ob eine Pt-Freisetzung von ca. 30 % des eingesetzten Platins ausreichend ist, um eine therapeutische Wirkung erzielen zu können. Dies wurde wie folgt berechnet:

Aus ICP-Messungen war bekannt, dass die CisPt-NP mit einer Stoffmengenkonzentration von 3,6 mol Fe/I und einem molaren Fe-Pt-Verhältnis von 130:1 vorlagen. Hieraus konnte für das Platin eine Stoffmengenkonzentration von 27,7 mmol/I errechnet werden. Multipliziert mit der molaren Masse von CisPt (300,05 g/mol) ergab sich für CisPt eine Masse von 8,3 g/I. In dem Tierversuch wurden 100 μ I der CisPt-NP intratumoral appliziert, woraus sich ein Pt-Wert von 830 μ g/Maus ergab.

Für eine intravenöse Verabreichung von *Cisplatin 10 Hexal*® *Pl* wurde die Standard-konzentration von 5 mg/kg Maus übernommen [93], da der LD₅₀-Wert (mittlere letale Dosis) bei 12–17,8 mg/kg lag [94]. Dies entspricht bei einer Maus, die 25 g wiegt, 125 μg Pt/Maus. Bei einer idealen gleichmäßigen Verteilung und einem Tumor von 0,6 g, wären das 3 μg Pt/Tumor. Vergleicht man dies mit den CisPt-NP heißt das, pro Maus würde mit den CisPt-NP eine 7-fach höhere Pt-Konzentration appliziert, als mit dem zugelassenen Produkt *Cisplatin 10 Hexal*® *Pl*. Bezieht man die Werte nur auf den Tumor, würde sich eine 278-fach höhere Pt-Konzentration ergeben. Daraus wurde geschlossen, dass eine 30 %ige Pt-Freisetzung aus den CisPt-NP ausreichend sein sollte, um einen therapeutischen Effekt *in vivo* erreichen zu können.

Zytotoxizität von CisPt-NP

Interne Studien der MagForce zeigten, dass nach sechs einstündigen Heizzyklen bei 55 °C ca. 350 Pt Atome pro Partikel freigesetzt werden konnten. Mit Hilfe eines MTT-Test sollte getestet werden, ob das freigesetzte CisPt noch zytotoxisch war oder ob durch die Assoziation an die Silica-Hülle der FeOx-NP die toxische Wirkung verloren ging. In 2.7.1 ist die detaillierte Versuchdurchführung beschrieben. Für den MTT-Test wurde das freigesetzte CisPt aus dem Überstand nach 20-stündiger Inkubation bei 60 °C verwendet, um die Zytotoxizität mit C3H-Zellen zu bestimmen. Als Referenz diente frisch eingewogenes CisPt, gelöst in Wasser. Bei dem Freisetzungversuch konnte 15,67 g Pt/l im Überstand detektiert werden. Der theoretische Sollwert lag bei 42,98 g Pt/l. Dies entsprach einer Freisetzung von 36,5 %, was auf eine stabile Bindung schließen lässt. Aus dem Pt-haltigen Überstand wurden die entsprechenden Verdünnungen für den MTT-Test hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Proben weitestgehend vergleichbar waren (Abbildung 3.2-2). Lediglich bei einer Pt-Konzentration von 1 mg/ml konnte ein Unterschied ermittelt werden, wodurch der LD₅₀-Wert des Ausgangsproduktes mit 2,4 mg Pt/l etwas niedriger ausfiel als der des freigesetzten CisPt mit 3,4 mg Pt/l.

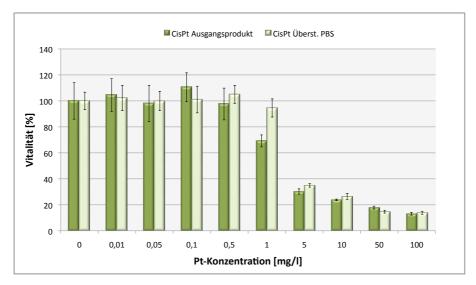


Abbildung 3.2-2: Überprüfung der Toxizität von CisPt nach thermosensitiver Freisetzung auf C3H-Zellen mit Hilfe eines MTT Assays. Zellen wurden mit dem Ausgangsprodukt bzw. dem freigesetzten CisPt für 24 h bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.2 in vivo Versuche

Therapeutischer Effekt von CisPt-NP

Nachdem die thermosensitive Freisetzung des assoziierten Platin-Komplexes *in vitro* gezeigt und dessen Zytotoxizität nachgewiesen werden konnte, wurde der therapeutische Effekt der CisPt-NP nach intratumoraler Applikation im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus unter-

sucht. Ziel der Untersuchung war, die CisPt-NP im Magnetwechselfeld zu erwärmen, so dass der Platin-Komplex thermosensitiv freigesetzt und die dadurch erreichte therapeutische Wirkung anhand der Tumorgröße bestimmt werden konnte.

Hierzu wurde wie unter 2.2.3 beschrieben ein Tumor intramuskulär in den Oberschenkel eines Hinterbeines implantiert. Sobald die Tumoren groß genug waren, wurden den Tieren die Nanopartikel intratumoral appliziert, je nach Gruppe mit oder ohne assoziiertem CisPt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die erste Hyperthermie im Magnetwechselfeld, welche nach 48 h, ohne erneute NP-Applikation, wiederholt wurde. Als Maß des therapeutischen Effektes wurde die Tumorgröße bestimmt. Eine detaillierte Versuchsdurchführung ist unter 2.7.2 zu finden.

Die Versuchstiere wurden in 5 Gruppen unterteilt. In Abbildung 3.2-3 a)-e) sind die Tumorvolumina der einzelnen Versuchstiere pro Gruppe (Ti-SiS-1 bis TI-SiS-5) über die Zeit dargestellt. Tag 0 entspricht dem Tag der NP-Applikation. Die Tumorvolumina der einzelnen Tiere an den entsprechenden Tagen, vor und nach der Applikation, sind als Einzelwerte abgebildet. Die durchgezogene schwarze Linie zeigt den Mittelwert des jeweiligen Tages an. Da es versuchbedingt nicht möglich war, die Tumorvolumina aller Tiere im selben Zyklus zu messen, variierte die Anzahl der Messwerte je nach Tag. Dadurch lassen sich die teils starken Schwankungen des Mittelwertes erklären. Die gestrichelten Linien an Tag 0 und Tag 2 symbolisieren die Thermotherapien im Magnetwechselfeld.

Gruppe 1 (TI-SiS-1) betrachtete das reine Wachstum des Tumors. Diese Gruppe diente als Referenz. Als Tag 0 wurde hier der Tag gewählt, an dem das entsprechende Tumorvolumen für eine NP-Applikation erreicht war. In Gruppe 2 (TI-SiS-2) wurde die Wirkung der Hyperthermie in Kombination mit dem intravenös applizierten Wirkstoff (Cisplatin 10 mg, HEXAL® PI) untersucht, um im Vergleich mit Gruppe 5 (TI-SiS-5) den Vorteil der lokalen Kombination aus Thermo- und Chemotherapie zu belegen. Auf eine weitere Kontrollgruppe mit intravenös verabreichten CisPt ohne Hyperthermie wurde verzichtet, da die Wirkung von CisPt i.v. ausreichend bekannt war.

Da die CisPt-NP bei der zweiten Hyperthermie erneut Platin freisetzen können (vgl. 3.2.1.1), wurde bei der Gruppe 2 zu beiden Thermotherapien intravenös CisPt verabreicht. Die FeOx-NP Applikation erfolgte hingegen nur an Tag 0. Es ist eindeutig ersichtlich, dass der Verlauf der Kurve in dieser Gruppe am flachsten ist, d. h. das Tumorwachstum wurde am stärksten gehemmt und unterscheidet sich signifikant von der Wachstumskurve (p=0,014). Die ersten Tage (bis Tag 7) konnte eine Tumorreduktion beobachtet werden, die ab Tag 8 stagnierte. An Tag 1 ist ein kleiner Peak erkennbar. Dieser ließ sich durch ein Anschwellen des Tumors

und die Volumenvergrößerung durch die NP-Applikation erklären. Dieser Effekt findet sich auch in den restlichen Gruppen wieder.

Gruppe 3 (TI-SiS-3) beschäftigte sich mit der Wirkung der lokal applizierten CisPt-NP alleine, ohne den Einfluss der Hyperthermie. Es wurde deutlich, dass die Kurve steiler verläuft, als in der Gruppe zuvor, d. h. dass das Tumorwachstum weniger gehemmt wurde. Im Vergleich zur Wachstumskurve des Tumors konnte mit einem p-Wert von 0,511 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In Gruppe 4 (TI-SiS-4) hingegen wurde nur die Wirkung der Hyperthermie, ohne den Einfluss des Wirkstoffes, untersucht. Hierfür wurden FeOx-NP ohne assoziiertes Cis-Pt eingesetzt. Die ersten 5 Tage nach der NP-Applikation konnte ein reduziertes Tumorwachstum beobachtet werden. Ab Tag 6 stieg dieses aber wieder deutlich an. Auffällig ist hierbei die große Streuung der einzelnen Tumorvolumina. Auch in diesem Fall konnte keine signifikante Verbesserung gegenüber der Tumorwachstumskurve gezeigt werden (p=0,951).

In der Gruppe 5 (TI-SiS-5) wurde die Kombination aus Thermotherapie mit dem lokal freigesetzten Platin-Komplex betrachtet. In dieser Gruppe war der Peak einen Tag nach intratumoraler NP-Applikation am deutlichsten. Ab Tag 3 nahm das Tumorvolumen aber wieder unverändert zu. Bei einem Tier (Maus 103) zeigte sich eine deutliche Tumorreduktion. Dieses Tier musste allerdings 10 Tage nach NP-Applikation wegen starkem Gewichtsverlust und Dehydration aus dem Versuch genommen werden. Im Mittel konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zur Gruppe 1 ermittelt werden (p=0,637).

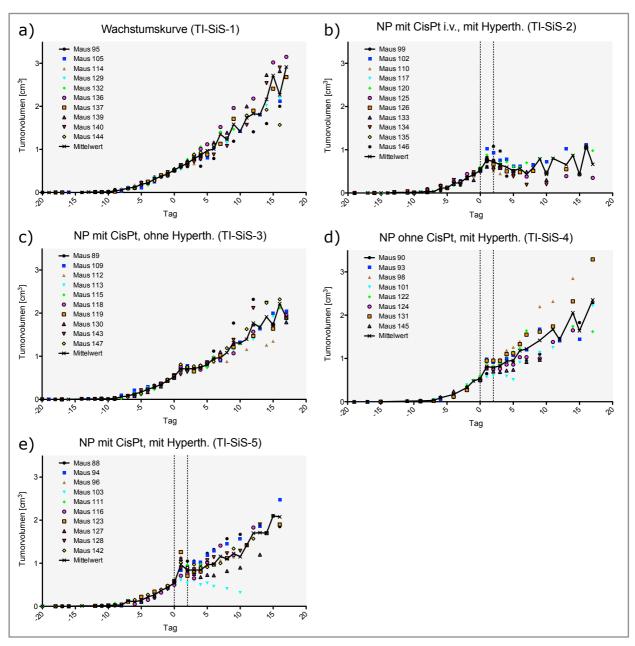


Abbildung 3.2-3: Überblick der Versuchsgruppen des Tierversuchs mit CisPt-NP. Tumorvolumen vor und nach intratumoraler Applikation der jeweiligen NP-Arten (Tag 0). Hyperthermie im Magnetwechselfeld (8 kA/m, 100 kHz, 30 min) erfolgte an Tag 0 und Tag 2 (gestrichelte Linien). Durchgezogene Linie stellt den Mittelwert der Versuchsgruppen dar. a) TI-SiS-1: Wachstumskurve Tumor, b) TI-SiS-2: NP mit CisPt i.v., mit Hyperth., c) TI-SiS-3: NP mit CisPt, ohne Hyperth., d) TI-SiS-4: NP ohne CisPt, mit Hyperth., e) TI-SiS-5: NP mit CisPt, mit Hyperth.

Betrachtet man die Zusammenfassung der einzelnen Gruppen in Abbildung 3.2-4, so wird deutlich, dass nur durch die Kombination aus Thermotherapie und intravenös verabreichtem CisPt ein therapeutischer Effekt erzielt werden konnte. Die Kurven der anderen Gruppen unterscheiden sich, unter Berücksichtigung der Fehlerbalken, nicht signifikant von der Wachstumskurve (TI-SiS-1). Das heißt, in diesen Fällen konnte keine Tumorreduktion

erreicht werden. Ab Tag 15 macht es den Anschein, als würde die Wachstumskurve steiler verlaufen als die anderen Gruppen. Über einen längeren Beobachtungszeitraum hinweg bestätigte sich dies aber nicht.

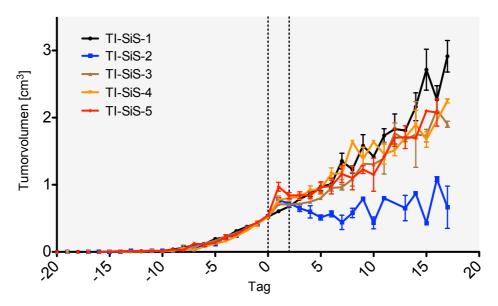


Abbildung 3.2-4: Zusammenfassung der Gruppen aus der Studie mit CisPt-NP. Dargestellt ist das Tumorvolumen von C3H-Mäusen vor und nach intratumoraler Applikation der jeweiligen NP-Arten (Tag 0). Hyperthermie im Magnetwechselfeld (8 kA/m, 100 kHz, 30 min) erfolgte an Tag 0 und Tag 2 (gestrichelte Linien). TI-SiS-1: Wachstumskurve Tumor, TI-SiS-2: NP mit CisPt i.v., mit Hyperth., TI-SiS-3: NP mit CisPt, ohne Hyperth., TI-SiS-4: NP ohne CisPt, mit Hyperth., TI-SiS-5: NP mit CisPt, mit Hyperth.

Intratumorale Temperatur im Magnetwechselfeld

Zusätzlich zu den oben genannten Untersuchungen wurde bei einzelnen Tieren die intratumorale Temperatur im Magnetwechselfeld gemessen, um zu überprüfen, dass die für eine Pt-Freisetzung benötigte Temperatur auch erreicht werden konnte. Hierzu wurde die intratumorale Temperatur, wie in 2.3.1 beschrieben, mit einer fiberoptischen Sonde gemessen und aufgezeichnet.

In Abbildung 3.2-5 sind exemplarisch die Temperaturkurven zweier Versuchstiere dargestellt. In blau wurde die intratumorale Temperatur einer Maus aus Gruppe TI-SiS-4 (NP ohne CisPt, mit Hyperthermie) aufgetragen. Passend dazu gehört die rektale Temperatur dieser Maus in rot. Die rektale Temperatur diente als Kontrolle um zu zeigen, dass der Tumor im Magnetwechselfeld lokoregional erwärmt wurde. Die intratumorale Temperatur erreichte im Laufe der Therapie bis zu 49 °C, wohingegen die rektale Temperatur nur leicht Anstieg. Letzteres lässt sich durch die Aufheizung des Applikators während des Betriebes erklären. Ein vergleichbarer Verlauf konnte auch mit einer Maus aus der Gruppe TI-SiS-5 (NP mit CisPt, mit Hyperthermie), in orange dargestellt, gezeigt werden. Bei dieser Maus

konnte nach 30-minütiger Therapie eine intratumorale Temperatur von 47 °C gemessen werden. Die rektale Temperatur blieb, wie bei der Maus zuvor, unter 35 °C. Dass die Kerntemperatur der Versuchstiere unter der normalen Körpertemperatur von 36,6–38,8 °C war [95], lag an der Tatsache, dass sie narkotisiert waren. Dies führte zu einem Abfall der Körpertemperatur [96]. Die erste gestrichelte Linie symbolisiert das "mapping". Zu diesem Zeitpunkt wurde die fiberoptische Sonde nochmals neu ausgerichtet, um die beste Position für eine Temperaturmessung zu finden. Dies führte zu dem starken Temperaturanstieg nach 3 min. Die zweite gestrichelte Linie symbolisiert das Abschalten des magnetischen Feldes und damit das Ende der Therapie. Da die Nanopartikel den Tumor somit nicht weiter erwärmen konnten und die vorhandene Wärme durch die Blutzirkulation schnell abtransportiert wurde, fiel die intratumorale Temperatur unmittelbar nach Therapieende stark ab. Bei allen untersuchten Tieren konnte eine intratumorale Temperatur zwischen 47 °C und 50 °C gemessen werden, wodurch eine thermosensitive Pt-Freisetzung gewährleistet sein sollte.

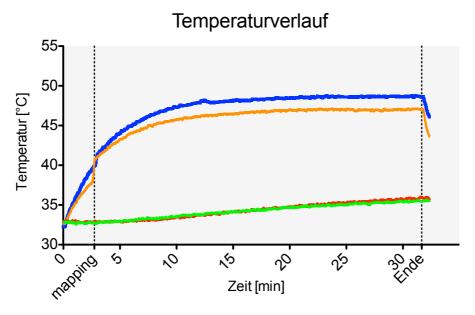


Abbildung 3.2-5: Temperaturverlauf im Magnetwechselfeld nach intratumoraler Applikation von CisPt-NP (100µl). Hyperthermie erfolgte bei 8 kA/m, 100 kHz für 30 min. blau: intratumorale Temperatur einer Maus aus Gruppe TI-SiS-4, orange: intratumorale Temperatur einer Maus aus Gruppe TI-SiS-5, rot: Temperatur im Rektum einer Maus aus Gruppe TI-SiS-4, grün: Temperatur im Rektum einer Maus aus Gruppe TI-SiS-5.

3.2.2 DOX-NP

Die DOX-NP wurden wie unter 2.8.1 beschrieben von der MagForce AG entwickelt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Die DOX-NP basierten auf FeOx-SiO₂ Grundpartikeln, an die mittels Sulfo-SMCC eine dsDNA immobilisiert wurde. In diese dsDNA konnte das Doxorubicin interkalieren. Messungen am ICP ergaben, dass 8–9 DNA-Doppelstränge pro

NP gekoppelt werden konnten, in die vermutlich jeweils 3 Moleküle Doxorubicin interkaliert waren. Bei einer ausreichenden Erwärmung kam es zur Denaturierung der dsDNA, wodurch das DOX freigesetzt wurde. In Abbildung 3.2-6 ist eine schematische Darstellung der thermosensitiven Freisetzung von DOX aus den DOX-NP zu finden.

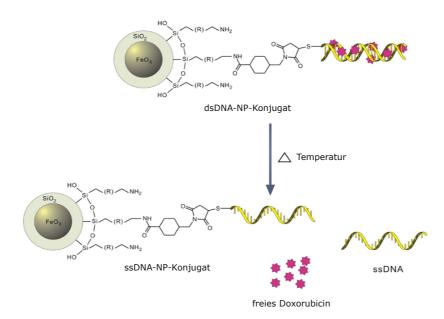


Abbildung 3.2-6: Schematische Darstellung der thermosensitiven Freisetzung von Doxorubicin. Doxorubicin interkaliert in die konjugierte dsDNA. Bei Erwärmung denaturiert die dsDNA, wodurch das Doxorubicin freigesetzt wird. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Jiang Gao; leicht modifiziert.

3.2.2.1 in vitro Versuche

Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von DOX

Doxorubicin ist, wie unter 1.6.2 beschrieben, ein Zytostatikum, das in der Krebstherapie seine Anwendung findet. In der Forschung ist es sehr beliebt, da es neben der einfachen Handhabung eine Eigenfluoreszenz besitzt, wodurch es sehr leicht nachweis- und quantifizierbar wird. In der Dissertation von Jiang Gao konnte bereits gezeigt werden, dass im Falle der DOX-NP mit steigender Temperatur die Konzentration an freiem Doxorubicin zunahm. Da in dem Tierversuch eine zweimalige Thermotherapie geplant war, sollte zum einen untersucht werden, ob bei einer zweiten Erwärmung erneut Doxorubicin freigesetzt werden konnte. Dies wäre ideal, da man auf diese Weise mit einer Partikelinstallation mehrere Therapiezyklen durchführen könnte. Zum anderen wurde untersucht, inwieweit die Freisetzung an Doxorubicin vom pH-Wert abhing. Dies war nötig, um sicherzustellen, dass eine Freisetzung auch bei niedrigeren pH-Werten, wie sie im Tumor vorliegen, stattfindet.

Hierzu wurden die DOX-NP (280 ng Dox/µl) in PBS bei pH 5, pH 6 oder pH 7 im Thermomixer inkubiert. Es wurden zwei Versuchsansätze verwendet. Im ersten Ansatz wurden die DOX-NP zwei Wärmezyklen mit 45 °C für 30 min ausgesetzt, unterbrochen von einer 60-minütigen Phase bei 37 °C. Mit diesem Versuchsansatz sollte getestet werden, ob es bei der zweiten Wärmephase zu einer erneuten Freisetzung von Doxorubicin kommt. Der andere Versuchsansatz diente als Kontrolle. In diesem Fall wurden die DOX-NP 120 min lang bei 37 °C inkubiert. Dies war wichtig, um zu sehen, ob bereits bei Körpertemperatur Doxorubicin aus den Partikeln freigesetzt wird. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist unter 2.8.1 zu finden.

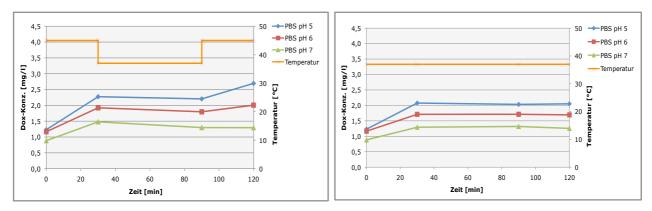


Abbildung 3.2-7: Temperatur- und pH-abhängige Freisetzung von Doxorubicin aus Dox-NP nach Erwärmung im Thermoschüttler. Links: mit zwei Wärmephasen (45 °C für 30 min, 37 °C für 60 min, 45 °C für 30 min), rechts: bei 37 °C für 120 min.

Aus der Abbildung 3.2-7 wird deutlich, dass in beiden Versuchsansätzen eine pH-abhängige Freisetzung von Doxorubicin stattfindet. Wie schon bei den CisPt-NP war die höchste Wirkstofffreisetzung in PBS pH 5 zu beobachten. In PBS pH 6 und pH 7 war die Freisetzungsrate jeweils niedriger. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung thermosensitiv war. Während der ersten Wärmephase war ein Anstieg an Doxorubicin zu verzeichnen, der während der gefolgten 37 °C Phase stagnierte. Nach der zweiten Wärmephase konnte vor allem in PBS pH 5 eine erneute Freisetzung von Doxorubicin nachgewiesen werden. Damit wurde gezeigt, dass eine Freisetzung auch bei niederem pH stattfindet und dass eine einmalige NP-Applikation für beide Thermotherapien ausreicht. Dass bei der 37 °C Kontrolle ebenfalls freies Doxorubicin nachweisbar war, lässt sich durch eine Destabilisierung der dsDNA nach der Interkalation von Doxorubicin erklären.

3.2.2.2 in vivo Versuche

Therapeutischer Effekt von DOX-NP

Der therapeutische Effekt der DOX-NP nach intratumoraler Applikation wurde ebenfalls im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus untersucht. Der Tierversuch erfolgte im Rahmen einer Pilotstudie. Daher wurden auf jegliche Kontrollen verzichtet. Es sollte ausschließlich der therapeutische Effekt von intratumoral applizierten DOX-NP in Kombination mit einer Hyperthermie im extern angelegten, magnetischen Wechselfeld untersucht werden. Durch die Erwärmung im Magnetwechselfeld sollte das Doxorubicin thermosensitiv freigesetzt werden, über freie Diffusion in die Tumorzellen gelangen und somit eine therapeutische Wirkung hervorrufen. Diese sollte dann durch eine Reduktion des Tumorvolumens messbar sein. Wie sich in Abbildung 3.2-4 gezeigt hat, ist eine Tumorremission bei einem erfolgreichen therapeutischen Ansatz sehr schnell erkennbar. Daher wurde der Beobachtungszeitraum von 9 Tagen nach Applikation gewählt. Des Weiteren werden damit unnötiges Leiden, Schäden oder Schmerzen der Tiere verhindert.

Für den Tierversuch wurden wie unter 2.2.3 beschrieben C3H-Zellen intramuskulär in die Oberschenkel von C3H-Mäusen implantiert. Bei einem entsprechenden Tumorvolumen wurden die DOX-NP intratumoral appliziert. Unmittelbar danach wurde die erste Hyperthermie bei 15 ± 1 kA/m und 100 kHz für 30 min durchgeführt. Die zweite Hyperthermie erfolgte 48 h später, unter den selben Bedingungen, allerdings ohne erneute NP-Applikation. Die im Versuch eingesetzten DOX-NP enthielten Doxorubicin in einer Konzentration von $180~\mu g/ml$, sprich $18~\mu g/T$ umor. Wenn man pro Maus ein durchschnittliches Gewicht von 25 g annimmt, dann ergibt sich hieraus eine eingesetzte Dosis von $720~\mu g/kg$. Die LD $_{50}$ von Doxorubicin ist für Mäuse (i.v.) mit $1245~\mu g/kg$ angegeben [97]. Das heißt bei einer 100~%igen Freisetzung des Doxorubicins und einer gleichmäßigen systemischen Verteilung läge man um den Faktor 2 unterhalb der LD $_{50}$.

Wie aus Abbildung 3.2-8 hervorgeht, entspricht die orangefarbene Linie der Tumorwachstumskurve der C3H-Tumoren aus 3.2.1.2. Der Mittelwert der Tumorvolumina ist als durchgezogene Linie in schwarz dargestellt. Am ersten Tag nach der NP-Applikation war ein eindeutiger Anstieg der Tumorvolumina zu verzeichnen. Dieser lässt sich durch das applizierte Volumen (100 µl) und eine mögliche inflammatorische Reaktion erklären. Am zweiten Tag nach der NP-Applikation hat das Tumorvolumen wieder deutlich abgenommen. Dieser Trend hielt noch bis zum dritten Tag an. Danach kam es zu einem kontinuierlichen Tumorwachstum. Der Einbruch des Tumorvolumens an Tag 9 ergab sich aus der Tatsache,

dass die Maus 154 an Tag 8 wegen eines zu großen Tumors aus dem Versuch genommen wurde und damit der Mittelwert nur noch aus zwei und nicht mehr aus drei Tieren gebildet wurde. Die Maus 157 wurde an Tag 5 wegen Anzeichen von Automutilation aus dem Versuch genommen und Maus 153 wurde einen Tag nach der NP-Applikation, ohne erkennbaren Grund, tot im Käfig aufgefunden. Vergleicht man den Mittelwert der Tumorvolumina aus dieser Gruppe mit der Tumorwachstumskurve von unbehandelten C3H-Tumoren, dann wird deutlich, dass der erhoffte therapeutische Effekt der DOX-NP in Kombination mit der Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld nicht erzielt werden konnte. Noch deutlicher wird dies, wenn man die Tumorvolumina dieser Gruppe mit den dazugehörigen Fehlerbalken betrachtet (Abbildung 4.2-1). Zwischen den beiden Kurven war mit einem p-Wert von 0,498 kein signifikanter Unterschied vorhanden.

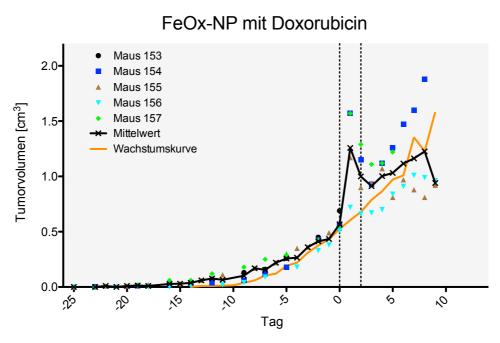


Abbildung 3.2-8: Tumorvolumen von C3H-Mäusen vor und nach intratumoraler Applikation von 100 μ l Dox-NP (Tag 0). Hyperthermie im Magnetwechselfeld (15 \pm 1 kA/m, 100 kHz, 30 min) erfolgte an Tag 0 und Tag 2 (gestrichelte Linien). In orange ist die Tumorwachstumskurve abgebildet. Durchgezogene schwarze Linie stellt den Mittelwert der Versuchsgruppe dar.

3.2.3 MTX-NP

Auch die MTX-NP wurden von der MagForce AG entwickelt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Sie basieren, wie alle bisher vorgestellten Nanopartikelarten, auf FeOx-SiO₂ Grundpartikeln. An diese Grundpartikel wurden im ersten Schritt mit Hilfe von Sulfo-SMCC ssDNA immobilisiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Kopplung von Methotrexat an aminofunktionalisierte Oligonukleotide via Sulfo-SMCC. Nach Hybridisierung der beiden

Einzelstränge erhielt man ein dsDNA-NP-Konjugat, an das Methotrexat gebunden war (MTX-NP). Eine ausreichende Erwärmung führte zur Denaturierung der dsDNA, wodurch die MTX-modifizierte ssDNA freigesetzt werden konnte (Abbildung 3.2-9). Somit eigneten sich die MTX-NP für die intratumorale Anwendung in Kombination mit einer lokalen, thermosensitiven Freisetzung durch eine Hyperthermie im extern angelegten magnetischen Feld.

Abbildung 3.2-9: Schematische Darstellung der thermosensitiven Freisetzung von Methotrexat. Das Methotrexat ist an eine ssDNA gekoppelt, welche mit einem ssDNA-NP-Konjugat hybridisiert. Die entstandene dsDNA der MTX-NP kann im Zuge einer Thermotherapie dehybridisieren, wodurch die MTX-modifizierte ssDNA lokal freigesetzt wird. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Jiang Gao; leicht modifiziert.

3.2.3.1 in vitro Versuche

Zytotoxizität von MTX-NP

Das Methotrexat wurde mit dem gekoppelten Oligonukleotid als MTX-modifizierte ssDNA freigesetzt. Majoros *et al.* beschrieb bereits 2009 dass Methotrexat seine zytotoxische Aktivität auch im konjugierten Zustand behalten kann [98]. Dies wurde mit Hilfe eines MTT-Tests in der Arbeit von Jiang Gao überprüft [84]. Es zeigte sich, dass die Vitalität der Zellen nach der Inkubation mit MTX alleine und mit MTX-modifizierter ssDNA im Vergleich zu unbehandelter ssDNA signifikant reduziert war, wodurch die Aussage von Majoros *et al.* bestätigt wurde, und die MTX-NP für eine *in vivo* Untersuchung eingesetzt werden konnten.

3.2.3.2 in vivo Versuche

Therapeutischer Effekt von MTX-NP

Nachdem die Zytotoxizität des freigesetzten Methotrexats nachgewiesen werden konnte, sollte der therapeutische Effekt der MTX-NP in Kombination mit einer Hyperthermie im extern angelegten, magnetischen Feld im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus getestet werden. Durch das magnetischen Wechselfeld wurden die MTX-NP erhitzt, was zu einer Denaturierung der gebundenen dsDNA führte, wodurch die MTX-modifizierte ssDNA lokal freigesetzt wurde und auf das umliegende Tumorgewebe wirken konnte. Der dadurch erzielte therapeutische Effekt sollte durch eine Reduktion des Tumorvolumens messbar sein. Der Tierversuch fand, wie der Versuch mit den DOX-NP, im Rahmen einer Pilotstudie statt wodurch auf jegliche Kontrollgruppen verzichtet wurde (vgl. 3.2.2.2).

Den Versuchstieren wurde intramuskulär ein Tumor in den Oberschenkel implantiert, in den die MTX-NP intratumoral appliziert wurden. Direkt im Anschluss erfolgte die erste Hyperthermie bei 15 ± 1 kA/m und 100 kHz für 30 min. Diese wurde 48 h später unter denselben Bedingungen wiederholt. Eine erneute NP-Applikation war nicht nötig, da die Partikel im magnetischen Wechselfeld mehrmals erwärmt werden können.

Die eingesetzten MTX-NP hatten eine Fe-Konzentration von 1 mol/l und eine MTX-Konzentration von 79 μ g/ml. Da für den Versuch 100 μ l intratumoral appliziert wurden, ergaben sich hieraus 7,9 μ g MTX/Maus. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 25 g pro Maus, erhielt man eine Dosis von 316 μ g/kg. Die LD₅₀ für Methotrexat nach intravenöser Applikation bei Mäusen wurde in der Literatur mit 65 mg/kg angegeben [99]. Das heißt bei einer vollständigen Freisetzung des Methotrexats aus den MTX-NP läge man ca. um den Faktor 200 unterhalb der LD₅₀. Durch die lokale, intratumorale Freisetzung des Wirkstoffes sollte die MTX-Konzentration deutlich höher liegen, als das durch eine systemische Applikation möglich wäre. Hierdurch war eine verbesserte zytotoxische Wirkung bei geringen Nebenwirkungen zu erwarten.

In Abbildung 3.2-10 ist das Ergebnis der *in vivo* Studie zusammengefasst. Hierbei wurde das Tumorvolumen vor und nach der intratumoralen Applikation der MTX-NP über die Zeit aufgetragen. Die gestrichelten Linien an Tag 0 und Tag 2 stehen wieder für die Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld. In orange ist die Tumorwachstumskurve der C3H-Tumoren aus 3.2.1.2 aufgetragen. Die durchgezogene schwarze Linie stellt den Mittelwert der Tumorvolumina dar. Wie auch schon bei den Versuchen zuvor, war am ersten Tag nach der NP-Applikation ein starker Anstieg des Tumorvolumens zu beobachten, der an Tag 2 und

Tag 3 wieder abnahm. Ab dem vierten Tag nach der NP-Applikation, nahm das Tumorvolumen leicht zu, veränderte sich für drei Tage kaum und stieg ab Tag 7 wieder stark an. Vergleicht man die Tumorvolumina mit denen der Tumorwachstumskurve, dann macht es den Eindruck, als hätte die Therapie mit den MTX-NP und der Hyperthermie einen leichten therapeutischen Effekt gehabt, wodurch die Tumorvolumina der behandelten Tiere etwas niedriger ausfielen als in der Kontrollgruppe. Betrachtet man allerdings die Tumorvolumina der untersuchten Gruppe und die der Tumorwachstumskurve mit ihren jeweiligen Fehlerbalken in Abbildung 4.2-1, dann wird deutlich, dass zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht (p=0,866) und somit auch mit den MTX-NP kein messbarer therapeutischer Effekt festgestellt werden konnte.

Wenn man die Messpunkte der einzelnen Tiere untereinander vergleicht, dann zeigt sich zum einen, dass in diesem Fall keines der Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen werden musste und zum anderen fällt auch bei dieser Studie eine breite Streuung innerhalb der Gruppe auf. Wie unter Punkt 4.2.2 diskutiert, hätte dies durch die Verwendung einer höheren Anzahl an Versuchstieren verbessert werden können. Durch die Tatsache, dass es sich hier um eine Pilotstudie handelte, war dies allerdings nicht möglich.

FeOx-NP mit Methotrexat

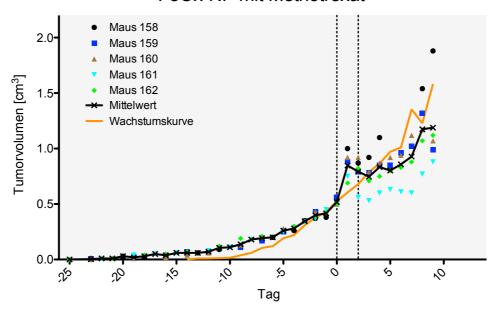


Abbildung 3.2-10: Tumorvolumen von C3H-Mäusen vor und nach intratumoraler Applikation von 100 μ l MTX-NP (Tag 0). Hyperthermie im Magnetwechselfeld (15 \pm 1 kA/m, 100 kHz, 30 min) erfolgte an Tag 0 und Tag 2 (gestrichelte Linien). In orange ist die Tumorwachstumskurve abgebildet. Durchgezogene schwarze Linie stellt den Mittelwert der Versuchsgruppe dar.

3.2.4 PCX-NP

Die PCX-NP waren aus zwei Komponenten aufgebaut. Zum einen aus FeOx-NP, die in diesem Fall mit Aminosilan (DIAMO) beschichtet waren, wodurch sich im Tumor ein stabiles Depot bilden konnten. Diese Partikel wurden von der MagForce AG entwickelt und zur Verfügung gestellt (Handelsname: NanoTherm®). Die zweite Komponente war eine Paclitaxel-Nanosuspension (PCX-NS), die mittels Hochdruckhomogenisation in der Arbeitsgruppe von Prof. Müller (Pharmazeutische Technologie, FU Berlin) produziert wurden. Details zur Produktion der PCX-NS sind unter 2.10.1 zu finden. Paclitaxel ist als Feststoff in Wasser kaum löslich. Daher wird für den klinischen Einsatz Ethanol und Cremophor® EL als Lösungsvermittler eingesetzt. Letzteres kann zu unerwünschten allergischen Reaktionen führen [100]. Um diese zu verhindern, kann mit Hilfe der Hochdruckhomogenisation aus dem PCX-Feststoff ohne den Einsatz der oben genannten Lösungsvermittler und deren Nebenwirkungen eine wässrige Nanosuspension hergestellt werden [90, 101, 102, 103]. Die beiden Komponenten wurden unmittelbar vor der Anwendung gemischt und anschließend gemeinsam intratumoral appliziert. Vorteil hiervon sollte sein, dass mit Hilfe von NanoTherm[®] im extern angelegten magnetischen Wechselfeld eine Hyperthermie durchgeführt werden kann, und die PCX-NS den therapeutischen Effekt durch ihre zytotoxische Wirkung direkt vor Ort weiter verstärken sollte. Durch die Depotbildung der FeOx-NP war zu erwarten, dass ein Teil der PCX-NS im Depot zurückgehalten wurde und im Laufe der Zeit nach und nach freigesetzt werden konnte. Dies hätte den Vorteil, dass die Wirkstoffkonzentration über einen längeren Zeitraum im Tumor aufrecht erhalten bliebe, selbst wenn das PCX aus dem Gewebe ausgeschwemmt werden sollte. Hierdurch würden auch Tumorzellen erreicht werden, die erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Mitosephase gelangen (vgl. 1.6.4). Da NanoTherm[®] für die klinische Anwendung bereits zugelassen war, wurde im Folgenden nur die PCX-NS untersucht.

3.2.4.1 in vitro Versuche

Sterilität der PCX-NS

Die Produktion der PCX-NS erfolgte unter einer Sterilbank, um eine unerwünschte Kontamination zu vermeiden. Unmittelbar nach der Produktion der Nanosuspension (siehe 2.10.1) wurde ein Aliquot in Zellkulturmedium gegeben, sowie auf Hefeextrakt- und Malzextrakt-Agar ausgestrichen, um die Sterilität der Suspension zu überprüfen. Die makround mikroskopische Überprüfung ließ keine Kontaminationen erkennen, d. h. die PCX-NS konnte für die Tierstudien eingesetzt werden.

PCX-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der PCX-NS wurde, wie unter 2.10.1 beschrieben, mittels HPLC bestimmt. Hierbei ergab sich eine PCX-Konzentration von 12,23 mg/ml, was dem erwarteten Soll-Wert von 12 mg/ml entsprach.

Lagerstabilität der PCX-NS

Um die Stabilität der Nanosuspension zu überprüfen, wurde die Größe der Nanokristalle zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Die Proben wurden zunächst versucht mit Hilfe der Photonenkorrelationsspekroskopie (PCS) zu vermessen. Hierbei trat das Problem auf, dass die Proben sowohl in Wasser als auch in Poloxamer 188 beim Verdünnen sofort ausfielen. Unverdünnt war eine Messung nicht möglich, da die Suspension für eine PCS-Messung zu dicht war. Die Verdünnungen und die Messungen erfolgten in Küvetten, die entsprechend entsorgt werden konnten. Eine Größenbestimmung mittels Laserdiffraktometrie kam nicht in Frage, da das Gerät hierbei mit dem Zytostatikum kontaminiert worden wäre. Demzufolge wurden die Messungen am Lichtmikroskop durchgeführt.

Abbildung 3.2-11 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der PCX-NS zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Produktion am Hochdruckhomogenisator. In a) ist die Mischung aus Paclitaxel, Poloxamer 188 und Wasser nach der Vorhomogenisation mit niedrigen Drücken abgebildet (als Pre bezeichnet). In b) ist die Suspension nach einem Zyklus, in c) nach 3 Zyklen, in d) nach 5 Zyklen, in e) nach 7 Zyklen und in f) nach 10 Zyklen mit 1500 bar in 100-facher Vergrößerung dargestellt. Hierbei fällt auf, dass bereits mit dem ersten Zyklus eine deutliche Verkleinerung der kristallinen Strukturen zu erkennen war. Neben einzelnen sehr kleinen Kristallen (als dunkle Punkte erkennbar), kam es zu Nahordnungen von kristallinen Strukturen mit Durchmessern von 30–50 μm. Diese schienen sich in der Größe während der folgenden 7 Zyklen bei 1500 bar kaum zu ändern. Erst im letzten Schritt, zwischen 7 und 10 Zyklen, konnte nochmals eine deutliche Verkleinerung der kristallinen Strukturen (5–10 μm) erzielt werden.

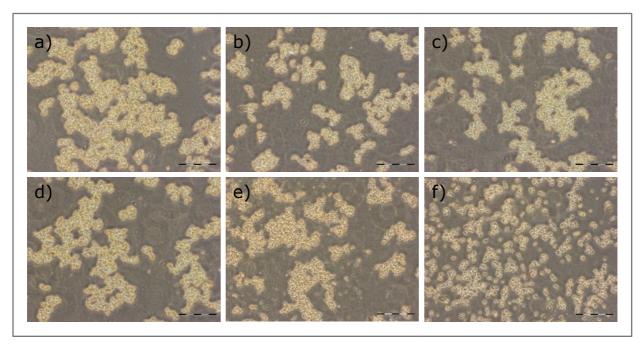


Abbildung 3.2-11: Lichtmikroskopische Aufnahme der PCX-NS zu verschieden Zeitpunkten während der Produktion am Hochdruckhomogenisator. a) Pre, b) 1 Zyklus, c) 3 Zyklen, d) 5 Zyklen, e) 7 Zyklen, f) 10 Zyklen. 100-fache Vergrößerung. Messbalken entspricht 50 µm

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, wie sich die Nanosuspension im Laufe der Zeit veränderte. Um dies zu untersuchen, wurde die PCX-NS bei Raumtemperatur und bei 4 °C gelagert. Nach 7 und 14 Tagen wurde jeweils ein Aliquot entnommen und mit der Suspension vom Tag der Produktion verglichen. Es zeigte sich, dass die PCX-NS bei der 4 °C Lagerung ausfiel. Sie ließ sich zwar wieder aufschütteln, fiel dann aber innerhalb eines Tages erneut aus. Bei Raumtemperatur war das nicht der Fall. Daher sind in Abbildung 3.2-12 die entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung nach der Lagerung bei Raumtemperatur zusammengefasst. Die Nahordnung der PCX-Kristalle nahm mit der Zeit deutlich zu. Besonders bei der 400-fachen Vergrößerung wurde ersichtlich, dass sich die kristallinen Strukturen lose aneinander ordneten. Hierdurch entstanden nach 14-tägiger Lagerung Agglomerate mit Durchmessern von 30–60 μm.

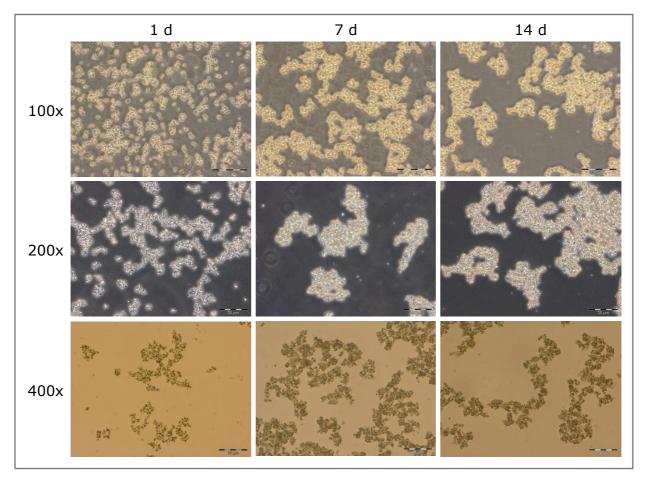


Abbildung 3.2-12: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Stabilität der PCX-NS nach einem, sieben und vierzehn Tagen. Messbalken bei 100-facher Vergrößerung: 50 μ m, Messbalken bei 200-facher Vergrößerung: 20 μ m, Messbalken bei 400-facher Vergrößerung: 10 μ m

In diesem Zustand eignete sich die PCX-NS nicht für eine therapeutische Anwendung, da die Lagerstabilität zu gering war. Es musste sichergestellt werden, dass sich die Suspension zum Zeitpunkt der Anwendung immer im gleichen Zustand befand. Daher wurde getestet, wie sich eine Ultraschallbehandlung auf die PCX-NS und ihre Lagerstabilität auswirkte. Die Suspension wurde für eine Minute sonifiziert und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (Abbildung 3.2-13). Diese Untersuchung erfolgte mit Proben 8 und 47 Tage nach der Produktion. Die zwei unterschiedlichen Alter der Proben wurden verwendet, um zu testen, ob das Alter der PCX-NS einen Einfluss auf die Zerkleinerung der Makropartikel im Ultraschallbad hatte. Hierbei hatte sich gezeigt, dass sich die Suspension nach 47 Tagen genauso effektiv zerkleinern ließ, wie nach 8 Tagen. Daraus konnte geschlossen werden, dass es jederzeit möglich war, durch Sonifizierung eine Nanosuspension mit gleichen Kristallgrößen zu erhalten.

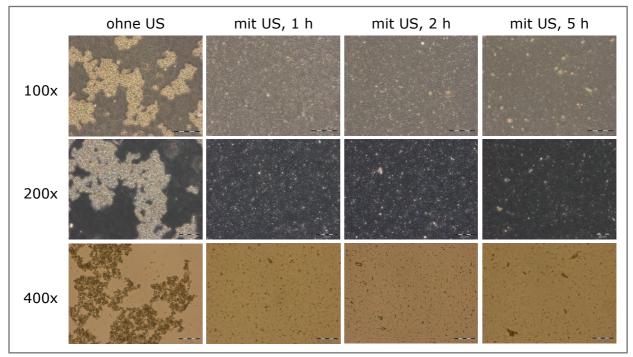


Abbildung 3.2-13: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Stabilität der PCX-NS nach einminütiger Ultraschallbehandlung (US). Messbalken bei 100-facher Vergrößerung: 50 μ m, Messbalken bei 200-facher Vergrößerung: 20 μ m, Messbalken bei 400-facher Vergrößerung: 10 μ m

In Abbildung 3.2-13 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der 47 Tage alten PCX-NS vor und bis zu 5 h nach der Ultraschallbehandlung abgebildet. Ohne die Ultraschallbehandlung lagerten sich die PCX-Kristalle zu großen Agglomeraten mit Durchmessern, zum Teil deutlich über 50 µm zusammen. Nach einminütiger Sonifizierung ergab sich ein ganz anderes Bild. Die Agglomerate lösten sich komplett auf, wodurch eine gleichmäßige Nanosuspension aus PCX-Kristallen entstand. Die Größe der nadelförmigen Kristalle ließ sich lichtmikroskopisch nicht mehr richtig bestimmen. Bei 400-facher Vergrößerung waren einzelne Kristalle mit einem Durchmesser von ca. 2 µm zu erkennen. Die restlichen Kristalle waren kleiner als 1 µm. Bis zu zwei Stunden nach der Ultraschallbehandlung waren keine Veränderungen zu erkennen. Nach 5 h traten vereinzelt die ersten kleinen Agglomerate mit einer Größe von 2–4 µm auf. Wie oben bereits erwähnt, scheint die PCX-NS bei Raumtemperatur länger stabil zu bleiben als bei einer 4 °C Lagerung. Da durch die Ultraschallbehandlung aber jederzeit wieder eine Nanosuspension erhalten werden konnte, war die Art der Lagerung nicht relevant. Wichtig war nur, dass die Probe vor der Anwendung sonifiziert und innerhalb von 2 h eingesetzt wurden.

Sättigungslöslichkeit der PCX-NS

Die Sättigungslöslichkeit der PCX-NS wurde wie unter 2.10.1 beschrieben, in Wasser bei $37\,^{\circ}$ C ermittelt und mit der Sättigungslöslichkeit des PCX Feststoffes verglichen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot entnommen, dieses zentrifugiert und die PCX-Konzentration aus dem Überstand mittels HPLC bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Sättigungslöslichkeit der PCX-NS höher als die des PCX-Feststoffes ausfiel (Abbildung 3.2-14). Ansich ist die Sättigungslöslichkeit unabhängig von der Partikelgröße. Diese spielt, durch die damit verbundene Zu- bzw. Abnahme der Oberfläche, vor allem bei der Lösungsgeschwindigkeit eine zentrale Rolle. Bei Partikelgrößen die kleiner als $1\text{-}2\,\mu\text{m}$ sind, wird die Sättigungslöslichkeit jedoch auch von der Partikelgröße beeinflusst (siehe 2.10.1).

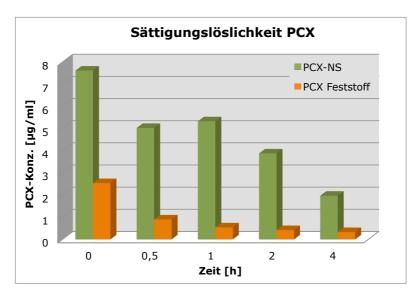


Abbildung 3.2-14: Sättigungslöslichkeit von PCX-NS und PCX Feststoff in H_2O bei 37 °C. PCX Konzentration wurde mittels HPLC bestimmt.

Dass die Sättigungslöslichkeit des Feststoffes so gering ausfiel, war zu erwarten. Abhängig vom Versuchsaufbau und der Messmethode werden Löslichkeiten von ca. 0,1 µg/ml bis zu 30 µg/ml in Wasser angegeben [104]. In beiden Fällen (Nanosuspension und Feststoff) nahm die PCX-Konzentration über die Zeit ab. Im Falle der PCX-NS geschah dies langsamer als beim Feststoff. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der PCX-Konzentration könnte sein, dass zu Beginn kleine Kristalle gelöst werden, wodurch höhere Konzentrationen messbar waren. Durch Kristallwachstum, ausgehend von Mikropartikeln (Ostwaldreifung), standen weniger kleine Kristalle zur Verfügung, die gelöst werden konnten, wodurch die folgenden PCX-Konzentrationen abnahmen.

Aggregationsverhalten von PCX-NS + FeOx-NP

Um Aussagen treffen zu können, wie sich die PCX-NS und NanoTherm[®] verhalten, wenn sie gemischt werden, wurde das Aggregationsverhalten, wie unter 2.10.1 beschrieben, untersucht. Diese Untersuchung war notwendig, da das Gemisch für den Tierversuch erst vermengt und anschließend gemeinsam intratumoral appliziert wurde. Dass NanoTherm[®] im Tumorgewebe durch Aggregation ein stabiles Depot bildet war bekannt [50]. Für ein stabiles Depot ist eine Aggregation im Tumor notwendig, damit die NP nicht ausgeschwemmt werden können. Die Depotbildung ist für die Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld essentiell (vgl. 1.5). In dem hier beschriebenen Versuchsaufbau wurde getestet, ob sich das Aggregationsverhalten von NanoTherm[®] in Anwesenheit der PCX-NS veränderte.

Der Ansatz für das Gemisch wurde wie folgt berechnet. Es wurde vom schlechtesten Fall ausgegangen, in dem die gesammte PCX-NS nach der intratumoralen Applikation auf einmal ins Blut gelangen und systemisch verteilt würde. Daher sollte die eingesetzte PCX-Konzentration unterhalb der LD $_{50}$ liegen. Die LD $_{50}$ von Paclitaxel für die intravenöse Anwendung bei der Maus liegt bei 12 mg/kg [105]. Daher wurde das Gemisch auf 10 mg/kg eingestellt, was bei einer 25 g Maus einer Masse von 0,25 mg PCX entsprach. Die PCX-NS hatte eine Konzentration von 12 mg/ml. Hieraus ergab sich ein Volumen von 21 μ l. Da in dem Versuch 100 μ l pro Maus appliziert werden sollten, wurden die 21 μ l PCX-NS ($\stackrel{\triangle}{=}$ 0,25 mg PCX) mit 79 μ l NanoTherm $^{\textcircled{@}}$ (6 M) gemischt, in das entsprechende Medium geträufelt und das visuelle Aggregationsverhalten zu den jeweiligen Zeitpunkten in Tabelle 3.2-1 dokumentiert.

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, aggregierte das Gemisch unmittelbar nach tropfenweiser Zugabe in die entsprechenden Medien (FBS nativ, Zellkulturmedium mit Zusätzen, PBS) und sank als Niederschlag, ohne erkennbare Trübung des Mediums, zu Boden. Auch nach Aufschütteln des Ansatzes setzten sich die Aggregate sofort wieder ab. In Wasser fiel das Gemisch nicht aus. Selbst nach dreitägiger Inkubation konnte kein Absetzen des Gemisches beobachtet werden. Die Kontrolle mit NanoTherm[®] alleine ist hier nicht gezeigt, da es dasselbe Verhalten wie das Gemisch zeigte. Aus der Untersuchung konnte geschlossen werden, dass sich das Aggregationsverhalten von NanoTherm[®] durch Zugabe der PCX-NS nicht änderte.

nach tropfenweiser Zugabe					
PCX-NS + NanoTherm [®] 6M	FCS (nativ)	Med +FCS	PBS	H ₂ O	
30 sek	XXX	XXX	XXX	0	
1 min	XXX	XXX	XXX	0	
2 min	XXX	XXX	XXX	0	
5 min	XXX	XXX	XXX	0	
nach aufschütteln					
PCX-NS + NanoTherm [®] 6M	FCS (nativ)	Med +FCS	PBS	H ₂ O	
0 min	XXX	XXX	XX	0	

XXX

XXX

XXX

XXX

0

	30 min	XXX	XXX	XXX	0	
	60 min	XXX	XXX	XXX	0	
	120 min	XXX	XXX	XXX	0	
	180 min	XXX	XXX	XXX	0	
	3 Tage	XXX	XXX	XXX	0	
2 2 4	A	DCV N	IC al Na			

XXX

XXX

Tabelle 3.2-1: Aggregationsverhalten von PCX-NS und NanoTherm[®] in verschiedenen Medien bei 37 °C. FBS: foetal bovine serum, Med: RPMI-1640 Zellkulturmedium, PBS: phosphate buffered saline, O: Suspension, X: teils Flocken, Medium dunkel verfärb, XX: deutliche abgesetzt, Medium verfärbt, XXX: stark aggregiert, Medium klar

Ausbreitung der PCX-NS im Fleischwürfelmodell

5 min

15 min

Wie bereits beschrieben, sollen die PCX-NS gemeinsam mit FeOx-NP als Gemisch intratumoral appliziert werden. Um vorab besser abschätzen zu können, ob und wie weit sich die PCX-NS im Gewebe ausbreitete, sollte dies an einem Tumormodell getestet werden. Hierzu applizierte man die PCX-NS in einen Fleischwürfel, der anschließend, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, in dünne Scheiben (ca. 1 mm) geschnitten wurde. Die Scheiben wurden homogenisiert und das darin enthaltene PCX in Ethylacetat aus dem Fleisch eluiert. Die PCX-Konzentrationen der verschiedenen Scheiben (untersch. Entfernung zur Injektionsstelle) wurden mittels HPLC bestimmt. Details zur Versuchsdurchführung sind unter 2.10.1 zu finden. Mit dem Versuch sollte gezeigt werden, ob die PCX-NS nach verschiedenen Inkubationszeiten unterschiedlich weit ins Gewebe diffundierte.

Die Ausbreitung nach sechsstündiger Inkubation ist in blau dargestellt (Abbildung 3.2-15) In den Schnitten 5 und 6 waren die höchste PCX-Konzentrationen messbar. In diesem Bereich wurde die PCX-NS auch injiziert. In den angrenzenden Schnitten nahmen die PCX-

Konzentrationen rapide ab. Nach 23 h wurden in den Schnitten 5 und 6 ebenfalls die höchsten Konzentrationen festgestellt. Diese lagen zwar niedriger als bei den 6 h Proben, dafür konnte aber in den benachbarten Schnitten höhere PCX-Konzentrationen gemessen werden. Der Peak flachte ab, wurde dafür aber breiter; d. h. die PCX-NS breitete sich im Gewebe aus. Nach viertägiger Inkubation flachte der Peak noch weiter ab und war leicht nach rechts verschoben. Auffällig war hierbei, dass die PCX-Konzentration in Schnitt 6 niedriger als in Schnitt 5 und 7 war. Da eine Nachmessung die Werte bestätigte, kam es entweder zu einer Vertauschung der Probe direkt nach dem Schneiden oder die PCX-NS verteilte sich unterschiedlich durch die Fleischfasern.

Bei dem Versuchsaufbau handelte es sich um ein stark vereinfachtes Tumormodell, da in dem Fleischwürfel weder eine Perfusion noch eine Retention vorhanden war. Des Weiteren ist ein Tumor, im Gegensatz zu einem Putenwürfel, in der Regel aus heterogenem Tumorgewebe aufgebaut. Dennoch eignete sich dieser Ansatz um zu zeigen, dass sich die PCX-NS im Modellgewebe ausbreitete.

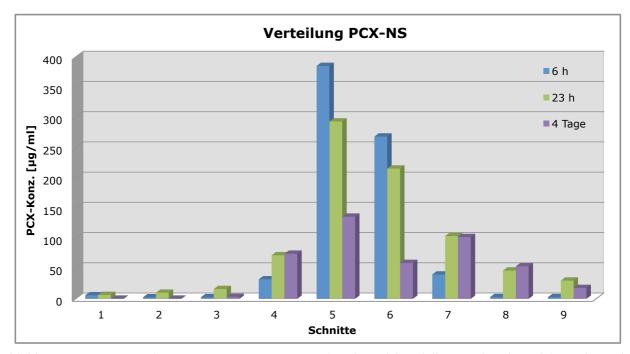


Abbildung 3.2-15: Verteilung von PCX-NS in einem Fleischwürfelmodell. Der Fleischwürfel wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in Scheiben geschnitten und die darin enthaltenen PCX-Konzentrationen mittels HPLC bestimmt.

3.2.4.2 in vivo Versuche

Therapeutischer Effekt von PCX-NP

Wie auch schon in den Studien zuvor sollte der therapeutische Effekt der FeOx-NP in Kombination mit einem Zytostatikum, in diesem Fall PCX, im Rahmen einer Pilotstudie am C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus untersucht werden. Wie bereits beschrieben, dienten die FeOx-NP der Hyperthermie im extern angelegten magnetischen Wechselfeld. Die Hyperthermie sollte die Tumorzellen für den Einsatz des Zytostatikums sensibilisieren, wodurch ein verstärkender Therapieeffekt erwartet wurde.

Die PCX-NP, bestehend aus einem Gemisch einer PCX-NS und NanoTherm $^{\otimes}$ (6 M), wurden intratumoral in einen C3H-Tumor im Oberschenkel einer Maus injiziert (vgl. 2.2.3). Unmittelbar nach der Applikation wurde die erste Hyperthermie bei 15 ± 1 kA/m und 100 kHz für 30 min durchgeführt. Diese wurde 48 h später, ohne erneute NP-Applikation, unter denselben Bedingungen wiederholt. Pro Tier wurden 100 μ l des PCX-NP Gemisches eingesetzt. Dieses bestand aus 20,8 μ l PCX-NS (\triangleq 0,25 mg PCX) und 79,2 μ l NanoTherm \oplus (6 M) und entsprach somit einer PCX-Dosis von 10 mg/kg, wodurch sie ca. 20 \oplus unterhalb der LD₅₀ lag (vgl. 2.10.1). Die PCX-NS wurde unmittelbar vor dem Einsatz für eine Minute sonifiziert.

Das Ergebnis der *in vivo* Studie zeigte, dass das Tumorvolumen nach den beiden Thermotherapien weiter zunahm (Abbildung 3.2-16). Am ersten Tag nach der NP-Applikation wurde, wie auch schon zuvor beschrieben, ein starker Anstieg des Tumorvolumens registriert, der, anders als in den bisherigen Studien, auch am zweiten Tag weiter zunahm. Dieser Trend setzte sich dann auch über die nächsten Tage weiter fort. Im Vergleich zur Negativkontrolle (Tumorwachstumskurve) war durch den Einsatz der PCX-NP, in Kombination mit der Hyperthermie, kein therapeutischer Effekt erkennbar. Besonders auffällig war in dieser Studie, dass ab dem vierten Tag nach der Applikation nur noch ein Tier in dem Versuch verblieb. Die anderen Tiere verstarben entweder direkt nach der Applikation oder mussten im Zuge der zuvor definierten Abbruchkriterien (siehe 7.2) aus dem Versuch genommen werden. Somit ist das hier gezeigte Studienergebnis zu den PCX-NP kritisch zu hinterfragen, da mit nur einem auswertbaren Tier, von ursprünglich fünf Tieren, keine allgemeingültigen Aussagen gemacht werden können.

FeOx-NP mit Paclitaxel

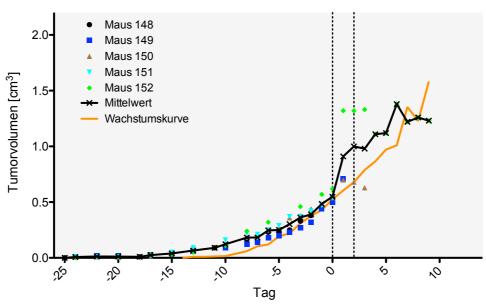


Abbildung 3.2-16: Tumorvolumen von C3H-Mäusen vor und nach intratumoraler Applikation von 100 μ l PCX-NP (Tag 0). Hyperthermie im Magnetwechselfeld (15 ± 1 kA/m, 100 kHz, 30 min) erfolgte an Tag 0 und Tag 2 (gestrichelte Linien). In orange ist die Tumorwachstumskurve abgebildet. Durchgezogene schwarze Linie stellt den Mittelwert der Versuchsgruppe dar.

4. Diskussion zu den in vivo Studien

4.1 Systemische Verteilung von FeOx-NP nach i.v. Applikation

4.1.1 PEGylierten NP

Ziel dieser Studie war die zeitabhängige Anreicherung von PEGylierten NP in den Organen und im Tumor nach systemischer Applikation (i.v.) zu untersuchen. Zusätzlich wurde getestet ob durch eine regionale Erwärmung des Tumors die passive Anreicherung im Tumor erhöht werden konnte.

Es konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass die PEGylierten NP biokompatibel und somit für eine i.v. Applikation geeignet waren. Der Tierversuch zeigte, dass die systemische Verteilung der PEGylierten NP in den untersuchten Organen zeitabhängig variierte. Der Fe-Gehalt im Blut und in den Lebern nahm mit der Zeit ab. Die der Herzen, der Lungen und der Nieren lagen unterhalb der Nachweisgrenze. In den Lebern konnte der größte Anteil des applizierten Eisens wiedergefunden werden, woraus auf eine Aufnahme durch das retikuloendotheliale System geschlossen werden kann. Das RES ist ein Überbegriff für phagozytierende Zellen des Organismus. In der Leber sind das hauptsächlich Kupffer-Zellen. Diese sind Bestandteil des Immunsystems und dienen der Abwehr und Beseitigung von Abfall- und Fremdpartikeln sowie Krankheitserregern. Ein Teil der Nanopartikel wurde vermutlich nach der Aufnahme in die Leber exkretiert und anschließend ausgeschieden, wodurch sich die Abnahme über die Zeit erklären würde. Da die Ausscheidungsprodukte der Tiere aber nicht gesammelt und untersucht wurden, können hierzu keine weiteren Angaben gemacht werden. Sowohl in den Milzen als auch in den Tumoren konnte eine Anreicherung der PEGylierten NP im Laufe der Zeit gezeigt werden. Proportional zum Anstieg in Milz und Tumor, nahm der Fe-Gehalt im Blut ab. Dies erklärt sich durch die Tatsache, dass die Milz viele Makrophagen enthält, die Fremdkörper phagozytieren und somit aus dem Blutkreislauf entfernen. Die passive Anreicherung der Nanopartikel in den Tumoren erhöhte sich, dank der verlängerten Zirkulationszeiten im Blut und des EPR-Effektes, nach 72 h auf 8,6 % des applizierten Eisens.

Durch eine regionale Erwärmung des Tumors im Wasserbad, konnte der Wert von 8,6 % des applizierten Eisens auf 12,6 % gesteigert werden. Es ist bekannt, dass aufgrund einer Hyperthermie die Durchblutung und die vaskuläre Permeabilität eines Tumors zunimmt, wodurch die passive Anreicherung eines Wirkstoffes im Tumor gesteigert werden kann [106]. Eine andere Möglichkeit die passive Anreicherung zu beeinflussen, wurde von Li und Kollegen angewandt. Sie erhöhten die Durchblutung durch den Einsatz von Angiotensin-II.

Damit erreichten sie im Tumorgewebe eine 1,3–3-fache Steigerung der Wirkstoff-Anreicherung [107]. Die in der vorliegenden Arbeit erzielte Steigerung von 8,6 % auf 12,6 % des applizierten Eisens, entsprach einer 1,5-fachen Verbesserung der passiven Anreicherung und lag damit in dem aus der Literatur bekannten Bereich.

Dennoch war die hier erzielte Anreicherung der PEGylierten NP für eine Hyperthermie-anwendung im extern angelegten magnetischen Wechselfeld nicht ausreichend. Hierfür müssten in etwa 10 % des Tumorvolumens mit FeOx-NP abgedeckt sein. Bei einem Tumorvolumen von 0,65 ml und einem applizierten NP-Volumen von 100 μ l, würde das bedeuten, dass mindesten 65 % der eingesetzten NP im Tumor angereichert werden müssten.

Eine Möglichkeit um eine höhere Anreicherung im Tumor zu erhalten wäre die Kopplung der Nanopartikel mit Liganden, welche für das Zielgewebe spezifisch sind. Hierfür könnten beispielsweise modifiziert Antikörpern bzw. Antikörper-Fragmenten zum Einsatz kommen. Beim sogenannten aktiven Targeting werden die Liganden meist kovalent, aber teilweise auch adsorptiv, an die Oberfläche der Nanopartikel gekoppelt. Es gibt viele verschiedene Liganden, die für das aktive Targeting in Betracht gezogen werden können, um einen zielgerichteten Transport von Wirkstoffen zum Tumorgewebe zu realisieren. Hierbei kann es sich um Antikörper bzw. Antikörperfragmente gegen Strukturen der Zelloberfläche oder Rezeptoren wie z. B. anti-FAP, anti-CD20, anti-HER2, Transferrin, etc. handeln [108]. Die Wahl des passenden Liganden ist vor allem abhängig von seiner Spezifität, Stabilität, Verfügbarkeit und seiner Selektivität auf den Zielzellen [109]. Bisher konnten mit Hilfe des aktiven Targetings noch nicht genug Partikel im Tumor angereichert werden, um damit eine Hyperthermie durchzuführen [110]. Daher besteht die Herausvorderung in diesem Bereich darin, die Partikel gut genug gegen das RES abzuschirmen, so dass sie länger im Kreislauf zirkulieren können um an die Zielzellen zu gelangen, von denen sie dann idealerweise internalisiert werden [111].

Unter Beachtung der oben erwähnten Punkte, könnte auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierend, in Kombination mit einem gekoppelten Zytostatikum und/oder Targeting Liganden, in der Zukunft ein vielversprechender Kandidat für die kombinierte Krebstherapie (Thermo-Chemotherapie) entwickelt werden.

Im Folgenden wurde der Schwerpunkt nicht auf das aktive Targeting, sondern auf wirkstoffassoziierte FeOx-NP in Kombination mit einer Thermotherapie im magnetischen Wechselfeld gelegt. Die wirkstoffgekoppelten Nanopartikel wurden für eine interstitielle Applikation in den Tumor entwickelt. Dies bringt den großen Vorteil mit sich, dass weder die

Nanopartikel noch der Wirkstoff systemisch verteilt, sondern direkt ins Tumorgewebe eingebracht werden. Hierdurch kann mit deutlich geringeren Dosen, als bei einer systemischen Verabreichung, gearbeitet werden. Zeitgleich kann aber lokal eine deutlich höhere Wirkstoffkonzentration eingesetzt werden. Da der Wirkstoff nicht erst systemisch verteilt werden muss, um das Zielgewebe zu erreichen und somit auch nur in deutlich geringerem Maße mit gesundem Gewebe in Kontakt kommt, können die systemischen Nebenwirkungen erheblich reduziert werden.

4.2 Therap. Effekt von wirkstoffassoziierten FeOx-NP nach i.t. Applikation

4.2.1 CisPt-NP

Die folgende in vivo Studie wurde durchgeführt, um den therapeutischen Effekt von CisPtassoziierten FeOx-NP in Kombination mit einer Hyperthermie im extern angelegten magnetischen Wechselfeld zu untersuchen. Die Thermotherapie übernahm hier zwei Aufgaben. Zum einen wurde die erhöhte Temperatur benötigt, um den am FeOx-NP assoziierten Wirkstoff freizusetzen. Zum anderen sensibilisierte sie die Tumorzellen, wodurch die zytotoxischen Eigenschaften des Wirkstoffes verstärkt werden sollten. Dieser potenzierende Effekt der Hyperthermie konnte für verschiedene Zytostatika gezeigt werden [43, 112]. Alvarez-Berriós und Kollegen veröffentlichten 2013 eine Studie mit CisPt, die diesen potenzierenden Effekt belegte. Des Weiteren untersuchten sie, ob dieser Effekt von der Art der Hyperthermie beeinflusst wird. Sie stellten die Hypothese auf, dass eine Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld durch den zusätzlichen thermalen oder physikalischen Stress zu einer erhöhten Membranfluidität führt, wodurch intrazellulär mehr CisPt akkumuliert wird, als nach einer Hyperthermie im Wasserbad. Mit ihren Ergebnissen konnten sie eine erhöhte Membranfluidität der Zellen nach der Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld und eine damit verbundene, stärkere passive Anreicherung an CisPt in Tumorzellen nachweisen [44].

Der beschriebene potenzierende Effekt der Hyperthermie in Kombination mit einer Chemotherapie konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Aus der *in vivo* Studie mit den CisPt-NP wurde deutlich, dass die intratumoral applizierten CisPt-NP, kombiniert mit einer Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld, keine verbesserte Tumorreduktion im Vergleich zur Tumorwachstumskurve erzielen konnten (vgl. Abbildung 3.2-4). Ein einzelnes Tier (Maus 103) zeigte zwar eine deutliche Tumorreduktion, musste allerdings 10 Tage nach der NP-Applikation wegen starkem Gewichtsverlust und Dehydration aus dem Versuch genommen werden. Das geringe Tumorvolumen ließ sich hier durch die

starke Dehydration erkären. Lediglich durch die Kombination aus Thermotherapie und intravenös verabreichtem CisPt konnte ein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden. Das verwunderte nicht, da CisPt bereits 1978 von der FDA zugelassen wurde und inzwischen ein sehr häufig eingesetztes Zytostatikum in der Tumortherapie ist. Die restlichen Kontrollgruppen zeigten im Vergleich zur Tumorwachstumskurve ebenfalls kein vermindertes Tumorwachstum.

Die zum Teil großen Schwankungen des Mittelwertes lassen sich durch die Gegebenheit erklären, dass die Tumorvolumina der Tiere nicht täglich gemessen werden konnten, da jede Untersuchung bzw. Messung bei den Versuchstieren den Stresslevel erhöht. Die dadurch ausgeschütteten Stoffe (z. B. Glucose, Corticosteroide) können den Stoffwechsel empfindlich stören und damit die Versuchsergebnisse beeinflussen [113]. Dies wurde durch entsprechende Ruhephasen minimiert. Das unterschiedliche Tumorwachstum führte zu versetzten Messzyklen wodurch die Anzahl der Messwerte pro Tag variierten, was zu den Schwankungen des Mittelwertes führte.

Wie sich in den *in vitro* Versuchen bereits gezeigt hatte, war die maximale Wirkstofffreisetzung zwar relativ gering (36,5 %), aber wie unter 3.2.1.1 berechnet, dennoch theoretisch ausreichend für einen therapeutischen Effekt. Die hierbei gesteigerte Freisetzung im sauren Milieu kommt der Anwendung entgegen, da die pH-Werte im Tumor in der Regel bei pH 5–6,8 liegen [92]. Des Weiteren wurde der Erhalt der Zytotoxizität des freigesetzten Wirkstoffes erfolgreich nachgewiesen. Dass die für die Hyperthermie erforderliche intratumorale Temperaturerhöhung im extern angelegten magnetischen Wechselfeld erreicht werden konnte, wurde in Abbildung 3.2-5 demonstriert.

Für eine mögliche Erklärung des ausbleibenden therapeutischen Effektes der CisPt-NP in Kombination mit der Hyperthermie muss die Pharmakokinetik von CisPt näher betrachtet werden. Es wird vermutet, dass die CisPt-Freisetzung aus den NP langsam stattfand, das freigesetzte CisPt direkt aus dem Tumor ausgeschwemmt und durch eine dreiphasige Elimination aus dem Blutkreislauf abgebaut wurde. Hierbei betrifft die erste Phase die Elimination der nicht plasmaproteingebundenen Substanz ($t_{1/2}$ $\alpha = 20-30$ min). Dieser folgt eine zweite Eliminationsphase von ebenfalls nicht plasmaproteingebundenem Cisplatin ($t_{1/2}$ $\beta = 48-67$ min). Die dritte Phase der Elimination von Cisplatin ($t_{1/2}$ γ) betrifft die Entfernung des plasmaproteingebundenen Cisplatin und erstreckt sich über ca. 24 Stunden [114]. Daher kann es sein, dass die benötigte Wirkkonzentration im Tumor nicht erreicht werden konnte. Bei der i.v. Applikation wird zwar in Relation weniger CisPt eingesetzt,

allerdings wird dies auf einmal ins System gegeben, womit für einen kurzen Moment eine hohe CisPt-Konzentration vorhanden ist.

Ein weiterer Punkt könnte sein, dass durch die Aggregation der NP im Tumor ein anderes Freisetzungsverhalten des Wirkstoffes stattfindet, als dies *in vitro* im Thermoschüttler getestet wurde. Durch das enge Zusammenlagern der NP könnte es sein, dass weniger CisPt freigesetzt werden konnten. Beide Effekte zusammen könnten eine Erklärung dafür sein, dass in dieser *in vivo* Studie kein therapeutischer Effekt der CisPt-NP erkennbar war.

4.2.2 DOX-NP

Nachdem mit den CisPt-NP kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden konnte, wurde nach einem anderen Wirkstoff gesucht, der für die Tumortherapie relevant war und sich an FeOx-NP assoziieren ließ. Wegen seines breiten Anwendungsspektrums fiel die Wahl auf das Doxorubicin. Mit den neu entwickelten DOX-NP wurde eine weitere *in vivo* Studie durchgeführt, um den therapeutischen Effekt in Kombination mit einer Hyperthermie im extern angelegten magnetischen Wechselfeld zu untersuchen. In diesem Fall wurden FeOx-NP mit immobilisierter dsDNA verwendet, in die DOX interkalierte. Das DOX konnte nach ausreichender Erwärmung wieder freigesetzt werden, was durch die Denaturierung der dsDNA möglich wurde.

In einem *in vitro* Versuch konnte erneut die pH-abhängige Freisetzung demonstriert werden. Wie unter 4.2.1 diskutiert, kam die erhöhte Wirkstofffreisetzung bei pH 5 der Anwendung sehr entgegen. Auch die Tatsache, dass bei wiederholter Erwärmung erneut DOX freigesetzt wird ist von Vorteil, da sich die Partikel somit nach einmaliger Applikation für mehrere Wärmezyklen nutzen lassen.

Die *in vivo* Untersuchung wurde im Rahmen einer Pilotstudie durchgeführt. Nach den Erfahrungen mit den CisPt-NP wurde beschlossen, vorab einen Vorversuch mit kleiner Gruppengröße und ohne die dazugehörigen Kontrollen durchzuführen, um bei ausbleibendem therapeutischen Effekt so wenig Tiere wie möglich eingesetzt zu haben. Bei einem erfolgreichen Therapieergebnis in der Pilotstudie wäre ein großer Tierversuch mit den entsprechenden Kontrollen durchgeführt worden. Aus der Pilotstudie wurde deutlich, dass der erhoffte therapeutische Effekt der DOX-NP in Kombination mit der Hyperthermie im extern angelegten magnetischen Wechselfeld nicht erzielt werden konnte. Im Vergleich zur Tumorwachstumskurve konnte keine Tumorreduktion nachgewiesen werden. Zwar liegen zwei der Tiere ab Tag 5 unterhalb der Tumorwachstumskurve (Maus 155, Maus 156), aber

im Gegenzug liegen Maus 154 und Maus 157 darüber. Generell zeigte sich, dass die Streuung zwischen den einzelnen Tieren hoch war. Bei der Arbeit mit lebenden Organismen zeigt sich dies als häufig auftretendes Problem. Daher empfiehlt es sich Gruppen mit größeren Tierzahlen zu wählen. Da es sich bei dem Versuch aber um eine Pilotstudie handelte, wurden nicht mehr Tiere eingesetzt. Bei erfolgreicher Pilotstudie wären für das Versuchsvorhaben Gruppen mit größeren Tierzahlen geplant gewesen.

Die ausbleibende Tumorreduktion könnte mit folgender Ursache zusammenhängen: Freies Doxorubicin kann leicht durch die Zellmembran diffundieren und auf diesem Wege zur DNA gelangen, an der es durch Interkalation seine zytotoxische Wirkung ausübt. Da der Diffusion aber immer ein Konzentrationsgradient zu Grunde liegt und kleine Moleküle leichter aus dem Tumor diffundieren, als große Partikel, [115], könnte das DOX wieder aus den Zellen und anschließend aus dem Tumor diffundiert sein, ohne die benötigte Wirkkonzentration erreicht zu haben. Im Falle einer intravenösen DOX-Verabreichung steigt die systemische Konzentration an DOX stark an, wodurch der Konzentrationsgradient in Richtung der Zellen verschoben wird. DOX diffundiert in die Zellen und kann dort in die DNA interkalieren. Nach intratumoraler Applikation und thermosensitivem Release verteilt sich das Doxorubicin vermutlich im Interstitium, von wo aus es in die Zellen diffundieren kann. Sobald das interstitielle DOX aus dem Tumor geschwämmt wird, verändert sich der Konzentrationsgradient, wodurch das freie DOX die Zellen wieder per Diffusion verlässt. Dies könnte unter Umständen sehr schnell passiert sein, noch bevor Doxorubicin in ausreichend vielen Tumorzellen interkalieren konnte, um eine messbare Tumorreduktion zu erhalten.

Eine Verbesserung der Tumorreduktion könnte eventuell durch den Einsatz von Transportersystemen erreicht werden, die die DOX-NP erst nach Internalisierung in Tumorzellen und externem Stimuli intrazellulär freisetzen. Denkbar wäre auch, dass die FeOx-NP mit freiem Doxorubicin gemeinsam in ein Transportersystem verpackt würden. Hierbei würde man sich die Kopplung des Doxorubicins an die NP sparen. Es müsste allerdings sichergestellt werden, dass der Wirkstoff erst bei entsprechender Erwärmung mit Hilfe der FeOx-NP, freigesetzt würde. Es wurde bereits eine Vielzahl an Transportersystemen entwickelt, die für solch eine Anwendung in Frage kommen könnten. Als Beispiele hierfür sind Mizellen, Liposomen, Dendrimere oder auch Polymere zu nennen [116].

Eine weitere Möglichkeit wäre die Kopplung eines zusätzlichen Liganden an die wirkstoffassoziierten FeOX-NP, über den die Partikel aktiv in die Zellen transportiert werden können. Hierbei würde es sich anbieten einen Liganden zu wählen, der die NP-Konjugate spezifisch an ein Protein bindet, mit dessen Hilfe sie anschließend internalisiert werden

können. Der Ligand sollte in Tumorzellen überexprimiert werden um sicherzustellen, dass die NP-Konjugate selektiv nur an Tumorzellen binden und von ihnen internalisiert werden. Mögliche Proteine die hierfür in Frage kommen würden sind z.B. der Transferrin Rezeptor, der Folat Rezeptor oder auch der EGF-Rezeptor (Epidermal growth factor). Der Transferrin Rezeptor wird in Tumorzellen bis zu 100-fach stärker exprimiert, als in normalen Zellen [117]. Der Folatrezeptor wird in 40 % der humanen Tumoren überexprimiert [118] und der EGF-Rezeptor wird ebenfalls in einer Vielzahl von Tumoren wie z. B. Brust-, Pankreas- oder Prostatatumoren überexprimiert [119].

Vorteil der intarzellulären Wirkstofffreisetzung wäre, dass durch die Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld sowohl die Sensibilisierung der Tumorzellen als auch die thermosensitive Freisetzung des Wirkstoffes direkt am Zielort stattfinden würde. Bedingt durch die kürzeren Diffusionsstrecken, wäre daher mit einer verbesserten zytotoxischen Wirkung zu rechnen.

4.2.3 MTX-NP

Die MTX-NP waren ebenfalls Bestandteil einer Pilotstudie, d.h. auch in diesem Fall gab es keine Kontrollgruppen sondern nur die Gruppe mit den intratumoral applizierten MTX-NP deren therapeutischer Effekt in Kombination mit einer Hyperthermie im magnetischen Wechselfeld getestet wurde.

Während der *in vivo* Studie zeigte sich, wie auch schon bei den Versuchen zuvor, dass am ersten Tag nach der NP-Applikation ein starker Anstieg des Tumorvolumens zu beobachten war, der an den darauffolgenden Tagen wieder abnahm. 2–3 Tage später nahm das Volumen der Tumoren wieder zu (Abbildung 3.2-10). Ob der Peak durch das zusätzliche Volumen, das in Form von NP appliziert wurde, zu Stande kam oder ob das Tumorvolumen exponentiell weitergewachsen wäre, aber durch die Therapie abgeschwächt wurde, lässt sich leider nicht definitiv klären, da keine Kontrollapplikation mit PBS durchgeführt wurde. Vergleicht man allerdings den Kurvenverlauf mit dem der Tumorwachstumkurve, dann lässt sich vermuten, dass der Peak nur auf das zusätzlich eingebrachte Volumen zurückzuführen ist, da die Wachstumskurve keinen derart steilen Volumenzuwachs zeigte. Da die NP in wässriger Form appliziert wurden und die NP unmittelbar danach agglomerierten, könnte die restliche Flüssigkeit im Laufe der Zeit aus dem Tumor diffundiert sein, womit sich die damit verbundene kurzzeitige Abnahme des Tumorvolumens erklären ließe. Dieses stieg im Anschluss wieder bis zum Versuchsende hin an, womit kein therapeutischer Effekt der MTX-NP in Kombination mit einer Hyperthermie nachgewiesen werden konnte.

Eventuell hätte durch eine höhere MTX-Konzentration ein besseres Ergebnis erzielt werden können. Da die Dosis mit 316 μ g/kg um den Faktor 200 unterhalb der LD₅₀ lag, könnte man die Dosis bedenkenlos weiter erhöhen. Aus sterischen Gründen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht mehr als 12 Oligonukleotide pro Partikel gebunden werden, wodurch die Wirkstoffkonzentration begrenzt war. Um diese zu erhöhen müssten die MTX-NP entsprechend optimiert werden, so dass mehr Oligonukleodite pro Partikel gebunden werden könnten.

Ein weiterer Punkt könnte sein, dass die Denaturierung der dsDNA nicht effizient genug war um genügend MTX-modifizierte ssDNA freizusetzten. Dies könnte eventuell durch eine andere Zusammensetzung der Oligonukleotide (Basenfolge, Nukleotidanzahl) verbessert werden.

Oder aber man versucht wie unter 4.2.2 bereits erwähnt, Wirkstoff und FeOx-NP intrazellulär in Tumorzellen zu bekommen, um den Wirkstoff in räumlicher Nähe des Zielortes thermosensitiv freizusetzen. Ein Punkt, der hierbei bisher noch nicht diskutiert wurde, ist die erforderliche Anpassung der FeOx-NP. Die Partikel müssten so weiterentwickelt werden, dass ihre SAR hoch genug wäre um auch mit geringeren NP-Konzentrationen eine ausreichende Erwärmung zu erzielen. Des Weiteren müsste gewährleistet sein, dass die erforderlichen Temperaturen auch ohne die Bildung eines großen Agglomerates erreicht werden könnten, da keine vergleichbaren Mengen an NP-Konjugaten internalisiert werden können, um analoge Konzentrationen zu erhalten, wie dies nach einer interstitiellen Applikation der Fall ist.

4.2.4 PCX-NP

Der therapeutische Effekt der PCX-NP in Kombination mit einer Hyperthermie im Magnetwechselfeld wurde ebenfalls im Zuge einer *in vivo* Pilotstudie untersucht. Hierzu wurde mittels Hochdruckhomogenisation eine PCX-Nanosuspension hergestellte und vorab *in vitro* charakterisiert. Die hierbei erhaltenen Resultate wurden bereits im Ergebnisteil diskutiert, weshalb im Folgenden nur die *in vivo* Daten betrachtet werden. Die PCX-NS wurden zusammen mit NanoTherm® intratumoral appliziert und unmittelbar im Anschluss in einem magnetischen Wechselfeld erwärmt. Die Ergebnisse dieser Kombinationstherapie wurde in Form einer Grafik in Abbildung 3.2-16 zusammengefasst. Aus ihr geht hervor, dass mit dieser Wirkstoff-NP Kombination ebenfalls kein therapeutischer Effekt im Vergleich zu einer unbehandelten Tumorwachstumskurve nachweisbar war.

Zu beachten ist hierbei, dass nur eines von fünf Tieren bis zum Ende im Versuch verblieb (Maus 152). Zwei Tiere verstarben unmittelbar nach der Applikation mit Schnappatmung, was auf eine Lungenembolie schließen ließ. Vermutlich wurden Aggregate der PCX-NS oder des NanoTherms® oder auch beides aus dem Tumor in die Lunge transportiert, in der es durch Verschluß von Lungengefäßen zu einer Embolie kam. Es könnte sein, dass bei der intratumoralen Applikation ein Gefäß des Tumors verletzt wurde, wodurch die NP bzw. die NS in den Blutkreislauf gelingen konnten. An sich sollte dies durch das schnelle Aggregationsverhalten von NanoTherm® im Tumorgewebe nicht passieren. Möglicherweise wurde dieses, obwohl vorab *in vitro* getestet, durch die Mischung mit der PCX-NS so verändert, dass ein Austritt aus dem Tumor erfolgen konnte. Um solche Zwischenfälle künfig zu verhindern, sollte das Aggregationsverhalten der Mischung nochmals genauer untersucht werden und gegebenenfalls das Mischungsverhältnis entsprechend angepasst werden.

Die anderen beiden Versuchstiere mussten wegen starkem Gewichtsverlust und eindeutigen Anzeichen von Leiden, Schäden oder Schmerzen vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Dies wiederum deutete auf ein Problem mit der Dosierung von Paclitaxel hin. Mit der eingesetzten PCX-Dosis von 10 mg/kg stand dies im Wiederspruch zu den Dosen die in der Arbeit von Bernhard Böhm angegeben waren [87]. Er applizierte intravenös eine PCX-NS mit bis zu 100 mg/kg und konnte damit zeigen, dass die Toxizität der PCX-NS deutlich geringer war als die des Handelproduktes Taxol®. Es ist nicht auszuschließen, dass die PCX-NS direkt nach der Applikation aus dem Tumor diffundierte und über die Blutbahn systemisch verteilt wurde. In Kombination mit der zweimaligen Hyperthermie und den damit verbundenen Narkosen könnten die Tiere so geschwächt gewesen sein, dass die starken Nebenwirkungen entstehen konnten. In der Arbeit von Bernhard Böhm gab es vor und nach der Applikation keine weitere Behandlung, die das Versuchstier geschwächt hätte. Damit könnten sich die unterschiedlichen PCX-Dosen ansatzweise, wenn auch nicht befriedigend, begründen lassen. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die PCX-NS an sich oder in Verbindung mit FeOx-NP kleinere Agglomerate bildetete, die sich nach Austritt aus dem Tumor systemisch verteilten und in verschiedenen Organen (Lunge, Leber, Niere, etc.) ablagerten. Dort könnten sie Embolien verursacht haben, die die Organe teilweise schädigten und damit die Nebenwirkungen hervorriefen.

Für weiterführende Studien sollte die Formulierung der PCX-NS nochmals überarbeitet werden, so dass sie auch nach intratumoraler Applikation noch stabil bleibt, ohne Agglomerate zu bilden. Ein weiterer Lösungsansatz wäre die Bindung des Wirkstoffes an den Tumor, so dass eine Diffusion und eine damit einhergehende systemische Verteilung über

die Blutbahn verhindert würde. Dies könnte wieder über die bereits oben diskutierten Ansätze verwirklicht werden. Dass die gemeinsame Verkapselung von Paclitaxel und FeOx-NP in Blockcopolymeren realisierbar ist, konnte von Filippousi *et al.* bereits erfolgreich demonstriert werden [120]. In diesem speziellen Fall müsste der Anteil an FeOx-NP zwar noch drastisch gesteigert werden, um für eine Hyperthermie anwendbar zu werden, aber die grundsätzliche Machbarkeit konnte damit erfolgreich demonstriert werden.

Durch eine Weiterentwicklung der FeOx-NP könnte ebenfalls eine Verbesserung der Therapie erreicht werden. Die NP müssten so verändert werden, dass sie auch in Verbindung mit der PCX-NS ein stabiles Depot bilden, in dem sich das PCX einlagert und nur bei Erwärmung austritt.

Da in der vorliegenden Studie nur ein Tier bis zum Versuchsende gemessen werden konnte, ist die Studie nicht repräsentativ, aber für erste Hinweise und Erfahrungen mit den PCX-NP dennoch dienlich. Um zuverlässige Aussagen über die therapeutische Wirkung machen zu können, sollte die Studie mit optimierten PCX-NP und damit deutlich reduzierten Nebenwirkungen wiederholt werden.

4.2.5 Zusammenfassung der Studien

In der vorangegangenen Diskussion wurden bereits die einzelnen Studien mit den jeweiligen wirkstoffassoziierten Nanopartikeln hinsichtlich des therapeutischen Effektes besprochen. Im Folgenden sollen diese Studien nochmals zusammenfassend betrachtet werden. Abbildung 4.2-1 zeigt zum einen die Einzelergebnisse der Gruppen nach intratumoraler Applikation der wirkstoffassoziierten NP und zweimaliger Thermotherapie (a–d). Zum anderen sind die Tumorvolumina dieser Gruppen in einer Graphik mit den dazugehörigen Fehlerbalken zusammengefasst (e). Hieraus lässt sich klar erkennen, dass mit keiner der hier eingesetzten NP-Arten ein therapeutischer Effekt gegenüber der Tumorwachstumskurve erzielt werden konnte.

Wie oben bereits diskutiert, gibt es für das Ausbleiben des therapeutischen Effektes verschiedene mögliche Erklärungen. Ein Punkt der bei den Lösungsansätzen bisher noch nicht beleuchtet wurde, war das Tumormodell ansich. Das in den Studien eingesetzte C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus wurde in erster Linie gewählt, da es bei der MagForce AG seit vielen Jahren in Hyperthermiestudien verwendet wurde und somit auf langjährige Erfahrungswerte zurückgegriffen werden konnte [121]. In dem Tiermodell werden Zellen einer murinen Mammakarzinomzelllinie intramuskulär in den Oberschenkel eines Hinterbeines von weiblichen C3H/HeNHsd Mäusen implantiert (isogenes Modell). Dort wachsen sie

invasiv und bilden gut vaskularisierte Tumoren aus. Für die Hyperthermie ist das ein sehr wichtiger Punkt, da man mit dem Modell näher an der humanen Anwendung ist, als z.B. mit einem subkutanen Xenograft Modell. Die während der Hyperthermie entstehende Wärme wird über das zirkulierende Blut sehr schnell abtransportiert. Daher würde man in einem schlecht vaskularisierten Tumormodell deutlich höhere Temperaturen erreichen, als das in der Realität der Fall wäre. Andersherum betrachtet: Wenn in dem C3H-Modell eine ausreichende Erwärmung erzielt werden kann, dann steigt damit die Wahrscheinlichkeit, dass es für die humane Anwendung eingesetzt werden kann.

Als weiterer Vorteil ist die einfache Wachstumskontrolle des Tumors zu nennen. Das Tumorvolumen kann problemlos mit einem Messschieber bestimmt werden, ohne dass die Tiere dabei übermäßigem Stess ausgesetzt sind. Ein zusätzlicher Punkt der für das Modell spricht ist die Tatsache, dass die C3H-Mäuse ein intaktes Immunsystem haben und damit sowohl in der Anschaffung als auch in der Haltung deutlich kostengünstiger sind als z.B. Mäuse mit einer SCID-Mutation (ohne T-Zellen und B-Zellen). Die sogenannten SCID-Mäuse müssen wegen ihrem stark eingeschränkten Immunsystem in speziellen Käfigen gehalten, mit Spezialnahrung gefüttert, sowie ausschließlich unter Sterilbänken behandelt werden, um Erkrankungen der Tiere zu vermeiden. Auf diese Punkte kann bei C3H-Mäusen verzichtet werden, wodurch geringere Kosten entstehen.

Die gute Vaskularisierung bringt neben dem oben genannten Vorteil den Nachteil mit sich, dass dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Gefäßverletzung während der NP-Applikation steigt, wodurch es passieren kann, dass NP über die Verletzung in die Blutbahn gelangen und systemisch verteilt werden. Je nach Menge und Partikelart kann dies zu Embolien und im schlimmsten Fall zum Tod des Versuchstieres führen. Ein weiterer Schwachpunkt des Tumormodells ist, dass wegen des intramuskulären Tumorwachstums das Volumen des Muskels und der Knochen bei der Tumormessung abgezogen werden muss. Dies kann, vor allem bei kleinen Tumoren, zu Fehlern bei der Volumenbestimmung führen, da im Anfangsstadium zwischen Tumor und Muskel nicht unterschieden werden kann.

Die C3H-Tumoren zeigen ein sehr schnelles und aggressives Wachstum bei dem es zur Ausbildung von Nekrosen kommen kann. Dies kann teilweise dazu führen, dass die applizierten NP wieder aus dem Einstichkanal geschwämmt werden.

Durch das schnelle Wachstum könnte es passieren, dass ein therapeutischer Effekt nicht erkannt wird da Tumorzellen, bei denen die erste Therapie keine Wirkung zeigt, durch ihr schnelles Wachstum eine Tumorreduktion vereiteln. Dies könnte ein weiterer möglicher Grund für das Ausbleiben eines therapeutischen Effektes mit den hier getesteten wirkstoffassoziierten Nanopartikeln sein. Es sollte getestet werden, ob diese Problematik durch eine frühere NP-Applikation bei geringeren Tumorvolumina umgangen werden kann.

Dass mit dem Tumormodell eine Tumorremission erzielt werden kann, ist in Abbildung 3.2-4 zu sehen. Dort wurde nach intravenöser Applikation von CisPt eine Reduktion des Tumorvolumens nachgewiesen. Das steht der Kritik des schnellen und agressiven Tumorwachstums gegenüber. Möglicherweise kommt es durch intravenöse Applikation des Wirkstoffes zu einer gleichmäßigeren Verteilung im Tumor, als dies nach thermosensitiver Freisetzung aus den wirkstoffassoziierten NP der Fall ist, wodurch weniger Zellen die erste Therapie überleben. Dies könnte zu der erfolgreichen Tumorremission geführt haben. Aufgrund dessen, sollten weitere Sudien zur Optimierung der Wirkstofffreisetzung gemacht werden, damit die wirkstoffassoziierten NP-Konjugate für künftige Kombinationstherapien in der Onkologie eingesetzt werden können.

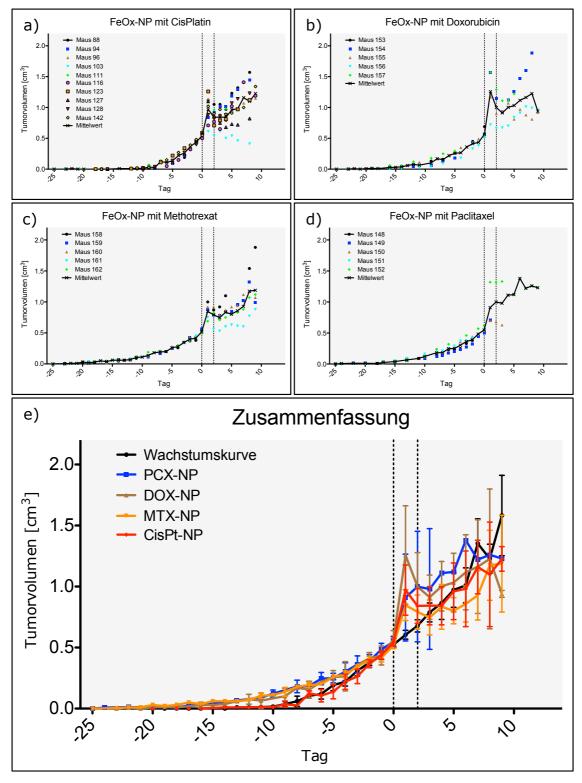


Abbildung 4.2-1: Zusammenfassung der getesteten, mit Wirkstoff gekoppelten NP-Arten. a) CisPt-NP, b) DOX-NP, c) MTX-NP, d) PCX-NP, e) Zusammenfassung. Dargestellt ist das Tumorvolumen von C3H-Mäusen vor und nach intratumoraler Applikation von den jeweiligen NP-Arten (Tag 0). Hyperthermie im Magnetwechselfeld erfolgte an Tag 0 und Tag 2 (gestrichelte Linien).

5. Zusammenfassung in Deutsch und Englisch

In der vorliegenden Arbeit wurden Eisenoxid-Nanopartikel (FeOx-NP) mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen untersucht. Die jeweiligen NP-Arten basierten alle auf den selben superparamagnetischen Grundpartikeln, die aus 12–15 nm großen FeOx-Kernen aufgebaut wurden, welche von einer 5 nm dicken SiO₂ Schale umhüllt waren. Die SiO₂ Schicht bot freie OH-Gruppen, an die verschiedene Oberflächenmodifikationen gebunden werden konnten.

Es wurden vier wirkstoffassoziierte NP-Konjugate für die intratumorale Applikation hergestellt und deren therapeutischer Effekt im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus geprüft. Als Wirkstoffe kamen hierbei folgende Zytostatika zum Einsatz: Cisplatin, das an die Silica-Hülle der NP assoziiert war; Doxorubicin, das in eine gebundene dsDNA interkalierte; Methotrexat, das über eine ssDNA konjugiert wurde und Paclitaxel, das als Nanosuspension mit den NP gemeinsam appliziert wurde. Die Konjugate aus superparamagnetischen Nanopartikeln und Zytostatika wurden durch die Art der Bindung so konstruiert, dass eine thermosensitive, lokale Freisetzung der therapeutisch wirksamen Substanz mittels eines externen Magnetwechselfeldes möglich war. Leider konnte mit keiner der hier getesteten wirkstoffassoziierten NP-Konjugate, anhand des Tumorvolumens, ein positiver therapeutischer Effekt nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden PEGylierte Eisenoxid-Nanopartikel eingesetzt, mit der die Anreicherung der Partikel in den Organen und im Tumor nach systemischer Applikation im C3H-Mammakarzinom-Modell der Maus untersucht wurde. Hierbei zeigte sich, dass die systemische Verteilung der PEGylierten NP in den untersuchten Organen zeitabhängig variierte. In der Leber konnte der größte Anteil des applizierten Eisens wiedergefunden werden. Der Fe-Gehalte im Blut und in der Leber nahm mit der Zeit ab, wohingegen in der Milz und im Tumor eine Anreicherung an Eisen zu verzeichnen war. Zusätzlich wurde getestet, ob es möglich war, diese passive Anreicherung im Tumor durch eine regionale Erwärmung des Tumors weiter zu steigern. Dank der verlängerten Zirkulationszeiten im Blut und des EPR-Effektes konnte nach 72 h eine 1,5-fache Verbesserung der passiven Anreicherung nachgewiesen werden.

Die Erkenntnisse dieser Studien können für kommende Therapieformen mit Eisenoxid-Nanopartikeln in Kombination mit einem gekoppelten Zytostatikum und/oder Targeting Liganden sehr nützlich sein. In the present work iron oxid nanoparticles (FeOx-NP) with different surface modifications were investigated. The respective NP-types were all based on the same basic superparamagnetic nanoparticles. They were composed of 12–15 nm FeOx cores, which were covered with a 5 nm thick SiO_2 shell. The SiO_2 layer provided free OH-groups, which could be used to bind various surface modifications.

Four different drug-associated NP-conjugates were manufactured and designed for the intratumoral application. Their therapeutic effect were tested in an C3H mammary carcinoma mouse model. The following cytotoxic drugs were used: cisplatin, which was associated to the silica shell of the NP; doxorubicin, which was intercalated in a bound dsDNA; methotrexate, which was conjugated via an ssDNA and paclitaxel, which were applied as a nanosuspension together with the NP. The conjugates of FeOx-NPs and cytostatics were constructed so that a thermosensitive, local release of the therapeutically active drugs were feasible by using an external alternating magnetic field. However, with none of the drug associated NP conjugates a positive therapeutic effect on the basis of the tumor volume could be demonstrated.

Furthermore, the accumulation of PEGylated FeOx-NP in the organs and in the tumor after systemic application was studied in an C3H mammary carcinoma mouse model. The results revealed that the systemic distribution of PEGylated NP varied time-dependent in the examined organs. In the liver, the largest percentage of the administered iron could be recovered. The iron content in the blood and in the liver decreased over time, whereas in the spleen and the tumor an accumulation of iron was observed. In addition, it was tested whether it was possible to increase this passive accumulation in the tumor by regional heating of the tumor. Due to the prolonged circulation time in the blood and the EPR effect a 1.5-fold improvement of the passive accumulation in the tumor could be detected after 72 h. The findings of these studies can be very useful for future therapies with iron oxide nanoparticles in combination with coupled cytostatics and/or targeting ligands.

6. Publikationen

Poster

Scale Down Ability of Aseptic Drug Nanocrystal Production. Deigner, T., Jordan, A., Müller, R. H. DPhG Jahrestagung 2010, 04–07. Oktober 2010. Braunschweig, Deutschland

Biodistribution of PEGylated SPIONs in a Tumor Bearing Mouse Model. Deigner, T., Fischler, M., Scholz, R., Jordan, A. ESF-UB Conference in Biomedicine, 23.–28. Oktober 2010. Sant Feliu de Guixols, Spanien

Cellular Uptake of PEGylated SPIONs and their Biodistribution in Tumor Bearing Mice. Deigner, T., Bohmer, N., Fischler, M., Jordan, A. NanoMed 2010, 02.–04. Dezember 2010, Berlin, Deutschland

Vorträge

FeOx-NP in animal experiments: C3H model. Deigner, T. Magnifyco Meeting, 25.–27. März 2012. Turin, Italien

Intratumoral temperature measurement. Deigner, T. Magnifyco Meeting, 27.–28. September 2012. Brindisi, Italien

Paper

Early functions of Abutilon mosaic virus AC2 ORF. Krenz, B., Deuschle, K., Deigner, T., Wege, C., Kleinow, T., Jeske, H. Manuskript in Arbeit.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

AUC area under the curve

CisPt Cisplatin

CO₂ Kohlenstoffdioxid

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol

DCC Dicyclohexylcarbodiimid

DCT Development of Combined Therapy

DHFR Dihydrofolat-Reduktase

DIAMO 3-(2-Aminoethylamino)-propyl-trimethoxysilan

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

DOX Doxorubicin

dsDNA double stranded DNA

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EGF-Rezeptor Epidermal growth factor receptor

EPR-Effekt enhanced permeability and retention-Effekt

FBS foetal bovine serum

FDA Food and Drug Administration

Fe Eisen

Fe₃O₄ Magnetit

FeOx Eisenoxid

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPLC high performance liquid chromatography

HSP heat shock protein

i.m. intramuskulär

i.t. intratumoral

i.v. intravenös

ICP-MS Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma

IFP Interstitial fluid pressure

LD₅₀ mittlere letale Dosis

LM Lichtmikroskop

LNA locked nucleic acid

MeOH Methanol

MFH magnetic fluid hyperthermia

MRT Magnetresonanztomographie

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid

MTX Methotrexat

NADH Nikotinamidadenindinucleotidhydrid

NADPH Nicotinamidadenindinukleotidphosphathydrid

NHS N-Hydroxysuccinimid

NNI National Nanotechnology Initiative

NP Nanopartikel

PBS Phosphate buffered saline

PCS Photonenkorrelationsspekroskopie

PCX Paclitaxel

PCX-NS Paclitaxel Nanosuspension

PDT Population Doubling Time

PEG Polyethylenglycol

PEG-Silan $(2-[Methoxy(ethylenoxy)_n-propyl]trimethoxysilan)$ mit n=6-9

RES retikuloendothelialen System

RNA Ribonukleinsäure

ROS reactive oxygen spezies

RP-HPLC reversed phase high performance liquid chromatography

RT Raumtemperatur

SAR spezifische Absorptionsrate

SCID severe combined immunodeficiency

SiO₂ Siliciumdioxid

SPION Superparamagnetic iron oxide nanoparticle

ssDNA single stranded DNA

Sulfo-SMCC Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate

TEM Transmissionselektronenmikroskop

u. U. Unter Umständen

ÜN Über Nacht

UV Ultraviolett

vgl. vergleiche

WBH Wasserbad-Hyperthermie

 γ -Fe₂O₃ Maghemit

7.2 Abbruchkriterien Pilotstudie

Tiernummer:

Anweisungen	

Α	Bei nur einem Symptom der Kategorie A: das Tier täglich (ggf. auch mehrmals) beobachten. Spätestens bei Kombination von zwei oder mehr Symptomen der Kategorie A muss das Tier dem Tierarzt oder dem Projektleiter vorgestellt werden.
В	Bei einem Symptom der Kategorie B: das Tier muss dem Tierarzt oder dem Projektleiter vorgestellt werden. Bei Kombination eines B mit Torkeln, Schmerz, Blässe oder Blut ist das Tier unverzüglich schmerzlos zu töten!
С	Bei einem Symptom der Kategorie C: Unverzüglich schmerzlos töten!

Symptome	Anweisung				
Tier isoliert sich	A				
Struppiges Fell, ungepflegtes Fell, Augenränder, Piloerektion	l A				
Augenränder	Α				
Fier vermeidet Bewegungen	Α				
Teilnahmslosigkeit	A				
Ruhelosigkeit	A				
Stereotype Bewegungen im Kreis (circling)	Α				
Geringfügig verstärkte Atmung	Α				
Pfote leicht geschwollen	A				
Stelzgang	В				
Schmerz (Gesichtsausdruck, Haltung gekrümmt oder Leib aufgezogen)	В				
Eingesunkene, trübe Augen	В				
Blässe (Augen, Ohren, Haut)	В				
Deutlich verstärkte Atmung / Keuchen	В				
Kurzzeitige Krampfanfälle, Torkeln, vorübergehende Apathie	В				
Kopfschiefhaltung	В				
Verminderte Futter- bzw. Wasseraufnahme	В				
Anzeichen von Infektionen	В				
Pfote stark geschwollen	В				
Anhaltende Apathie	С				
Auffällige Atembeschwerden	С				
Unphysiologische, abnormale Körperhaltung	С				
Automutilation (z.B. Annagen von Zehen)	С				
a Brita Handa					
2. Beim Umsetzen	1 , 1			1	
Verletzungen, Hautveränderungen	A				
Fehlstellung der Zähne	A				
Lokale Infektion(en)	В				
Hautfalten bleiben stehen, Dehydratation	В				
Lautäußerungen beim Ergreifen	В	-	-		
Zähneknirschen	В				
3. Beim Wiegen					
Ungewöhnliche Zunahme	В				
10 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des	1				
gleichen Stamms und Alters.	В				
20 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des					
gleichen Stamms und Alters.	С				
4. Beim Tumormessen	-			-	
Infektion des Einstichkanals	В				
Auffallende Abw.reakt. u./o. Aggr. beim Palpieren der Tumoren	С				
Erreichen eines Tumordurchmessers von 1,5 cm	С				
Tumorlast beträgt 10% des Körpergewichts	C				

7.3 Chemikalien

Cisplatin Sigma-Aldrich, Deutschland

Citronensäure-Monohydrat Carl Roth, Deutschland

DAPI Carl Roth, Deutschland

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat Sigma-Aldrich, Deutschland

DMSO (Dimethylsulfoxid) Carl Roth, Deutschland

Doxorubicin Sigma-Aldrich, Deutschland

Eisenstandard für AAS von Fluka Sigma-Aldrich, Deutschland

Essigsäure 100 % (Eisessig) Merck Millipore, Deutschland

Ethanol, 96 % Carl Roth, Deutschland

Ethylacetat Carl Roth, Deutschland

FBS, Gibco[®] Life Technologies, USA

Hefeextrakt-Agar Carl Roth, Deutschland

HEPES Sigma-Aldrich, Deutschland

Kaliumchlorid Merck Millipore, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat Carl Roth, Deutschland

Ketavet[®] Pharmacia, Deutschland

Malzextrakt-Agar Carl Roth, Deutschland

MEM Vitamine (100 x) Biochrom, Deutschland

Methanol, 99 % Carl Roth, Deutschland

Methotrexat Sigma-Aldrich, Deutschland

Mounting Solution Merck Millipore, Deutschland

MTT Carl Roth, Deutschland

Natrium-Pyruvat PAA, USA

Natriumchlorid Carl Roth, Deutschland

Paclitaxel LC Laboratories, USA

PEG-Silan ABCR, Deutschland

Poloxamer 188 BASF, Deutschland

Reagenz Fe-1 Merck Millipore, Deutschland

Rompun[®] Bayer HealthCare, Deutschland

Salpetersäure, 65 % Carl Roth, Deutschland

Salzsäure rauchend 37 % Carl Roth, Deutschland

Trypanblau Sigma-Aldrich, Deutschland

Trypsin/EDTA Biochrom, Deutschland

Wasserstoffperoxid, 30% Carl Roth, Deutschland

Zellkulturmedium RPMI 1640, Gibco[®] Life Technologies, USA

7.4 Puffer und Lösungen

Carnoy's Reagenz

Essigsäure 100 % (Eisessig) und Methanol im Verhältnis 1:2

Carnoy's Reagenz musste bei Bedarf frisch angesetzt werden.

CP-Puffer

0.5 M Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7*H_2O$)

1,0 M di-Natriumhydrogenphospat-Dihydrat (Na₂HPO₄ x 2 H₂O)

DAPI-Eindeckmediums

995 µL Mounting Solution

5 μL DAPI-Stammlösung

 \rightarrow Endkonzentration DAPI = 5 µg/mL.

Der Ansatz erfolgte in einem abgedunkelten Reaktionsgefäß

DAPI-Stammlösung

1 mg DAPI in 1 ml Reinstwasser lösen.

10 ml-Ansatz steril filtrieren, in 1mL Aliquots abfüllen und bei −20 °C lagern

Einfriermedium

10 % DMSO in FBS

Hefeextrakt-Agar

24 g Trockenmedium in 1 l VE-Wasser aufkochen 15 min bei 121 °C autoklavieren

in Petrischalen gießen und abkühlen lassen

PBS

137 mM Natriumchlorid (NaCl)

2,7 mM Kaliumchlorid (KCI)

8,1 mM Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ x 2 H₂O)

1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

entsprechender pH-Wert mit HCL einstellen

Malzextrakt-Agar

33,6 g Trockenmedium in 1 l VE-Wasser lösen

10 min bei 118 °C autoklavieren

in Petrischalen gießen und abkühlen lassen

mobile Phase, HPLC

Methanol und Wasser im Verhältnis 13:7 (pH 7,15)

Gemisch für 30 min durch Sonifizierung entgasen

MTT-Lösung

5 mg MTT

1 ml PBS (pH 7,4)

Trypanblau

0,5 g Trypanblau

100 mL NaCl-Lösung, 0,9 %

Ansatz für 15 min rühren, über einen Faltenfilter filtrieren.

Zellkulturmedium für C3H-Zellen

500 ml RPMI 1640

50 mL FBS

5,5 mL MEM Vitamine (100 x)

1,3 mL Natrium-Pyruvat

FBS für 30 min bei 40 °C inaktiviert

7.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alleinfuttermittel für Mäuse ssniff, Deutschland

Aufschlussmikrowellensystem, MARS Xpress CEM Corporation, USA

Autoklav, Modell 3850 EL Systec, Deutschland

Brutschrank, cytoperm 2 Heraeus, Deutschland

Brutschrank, FUNKTION line Heraeus, Deutschland

Brutschrank, HERA cell Heraeus, Deutschland

Cryoröhrchen Nunc, Dänemark

Durchflussthermostat, FC600S Julabo, Deutschland

Eichsonde, Temperatur, INFT-1001 Newport, Omega, Deutschland

Einstreu, Lignocel JRS, Deutschland

Eismaschine, ZBE 30-10 Ziegra, Deutschland

Feinwaage, ABT 120-5DM Kern, Deutschland

Filterhauben für Käfig 1284L TECNIPLAST, Italien

Fluoreszenz-Mikroskop, IX50-S8F Olympus, Japan

Gitterdeckel zu Käfig 1284L TECNIPLAST, Italien

Hochdruckhomogenisator, Micron Lab 40 APV Gaulin, Deutschland

HPLC Autosampler, HPLC 560 Kontron Instruments, USA

HPLC Detektor, HPLC 540 Kontron Instruments, USA

HPLC Pumpe, System 522 Kontron Instruments, USA

HPLC Säule, Lichrospher 60 RP Select B, 5 μm Knauer, Deutschland

HPLC Software, KromaSystem 2000 Kontron Instruments, USA

ICP-MS Thermo Fisher, Deutschland

Injektionskanüle, 27G, 3/4" B. Braun, Deutschland

Injektionskanüle, 27G, 1/2"

Injektionskanüle, 30G, 1/2" B. Braun, Deutschland

Käfige, 1284L Eurostandard Typ II L TECNIPLAST, Italien

B. Braun, Deutschland

Kühl/Gefrierschrank-Kombination, cooler Bosch, Deutschland

Kühlmanschette, COOL Bandage[®] Medtirol, Österreich

Kühlschrank, 4 °C, Kirsch Bosch, Deutschland

Kühltruhe, -80 °C, HERA freeze Heraeus, Deutschland

Kühlzentrifuge, Fresco 21 Thermo Fisher (Heraeus), Deutschland

Laborabzug, Modell 7173 Hohenloher, Deutschland

Laborspülmaschine, G7783 CD Miele, Deutschland

Laborwaage, PM4600 Mettler-Toledo, Deutschland

Lichtmikroskop, CK 2 Olympus, Japan

Magnetfeld-Applikator, MFH-12TS MedTech, Deutschland

Magnetrührer, VARIOMAG MONO H+P Labortechnik, Deutschland

Maushaus, ACRE011 TECNIPLAST, Italien

Messschieber, dialMax Wiha, Schweiz

Mikroplatten-Reader, infinite M200 Tecan, Österreich

Mikrotiterplatte, 96 well Becton Dickinson, USA

Operationsbesteck Eickemeyer, Deutschland

pH-Elektrode, BlueLine Schott Instruments, Deutschland

pH-Meter, Calimatic 766 Knick, Deutschland

Photometer, SPECORD 200 plus Analytik Jena, Deutschland

Pipetten, Research, 10–5000 μl Eppendorf, Deutschland

Pipetten, serologisch, 5–50 ml FALCON Becton Dickinson, USA

Pipettenspitzen, 10–5000 µl Eppendorf, Deutschland

Pipettierhilfe, accu-jet[®] pro Brand, Deutschland

Reaktionsgefäße, safe-lock, 2 ml Eppendorf, Deutschland

Rotations-Vakuum-Konzentrator, SVC100H SAVANT, USA

Rundbodenröhrchen, FALCON, 8 ml Becton Dickinson, USA

Sicherheitswerkbank, Captair Flex Erlab Group, Frankreich

Sterilwerkbank, HERA safe HS 12

Thermometriemessgerät, Luxtron

Thermomixer, compact

Tierwaage, BP2100S

Tränkeflaschen und Kappen

Tuberkulinspritze (Injekt®-F), 1 ml

Ultraschallbad, Elma, TI-H-20

VE-Wasseranlage, euro 20-80

Venenverweilkatheter, 22G, 1"

Vortexer, MS1 Minishaker

Wasserbad (Pumpe), polystat 35

Wasserbad, Modell 1092

Wasserbad, MP-5

Zellkulturflasche, 25 cm², FALCON

Zellkulturflasche, 75 cm², FALCON

Zentrifuge, Megafuge 1.0

Zentrifuge, Megafuge 16

Zentrifugengefäße, 15 ml

Zentrifugengefäße, 50 ml, FALCON

Heraeus, Deutschland

Polytec, Deutschland

Eppendorf, Deutschland

Sartorius, Deutschland

TECNIPLAST, Italien

B. Braun, Deutschland

G. Heinemann, Deutschland

SG-Wasseraufbereitung, Deutschland

B. Braun, Deutschland

IKA-Works, USA

Bioblock Scientific, Frankreich

GFL, Deutschland

Julabo, Deutschland

Becton Dickinson, USA

Becton Dickinson, USA

Heraeus, Deutschland

Thermo Fisher (Heraeus), Deutschland

VWR, USA

Becton Dickinson, USA

8. Literaturverzeichnis

Pressemitteilung des Robert Koch-Instituts, 2012. Krebs in Deutschland. URL: http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2012/2012_node.html (20.05.13)

- Weber, J., Spring, A., Czarnetzki, A. 2002. Parasagittal meningioma in a skull dated 32500 years before present from southwestern Germany. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **127**: 2757-2760.
- Hiddemann, W., Huber, H., Bartram, C. 2004. Die Onkologie. Teil 1. Springer-Verlag, Heidelberg, S.6
- Wagener, C. 1996. Einführung in die molekulare Onkologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.1
- 5 Grundmann, E. 2007. Das ist Krebs. W. Zuckschwerdt Verlag, Germering
- 6 LaRocque, J., Bharali, D. J., Mousa, S. A. 2009. Cancer detection and treatment: the role of nanomedicines. *Mol. Biotechnol.* **42**: 358–366.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**: 27–31.
- 8 Skinner, S. A., Tutton, P. J., O'Brien, P. E. 1990. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res.* **50**: 2411–2417.
- 9 Torchilin, V. P. 2000. Drug targeting, Eur. J. Pharm. Sci. 11 Suppl 2: 81-91.
- Matsumura, Y. and Maeda, H. 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and antitumor agent SMANCS. *Cancer Res.* **46**: 6387–6392.
- Maeda, H. and Matsumura, Y. 1989. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **6**: 193–210.
- Greish, K. 2006. Enhanced permeability and retention (EPR) effect and tumor selective delivery of anticancer drugs. In: Torchillin, V. P. (Hrsg.): Delivery of protein and peptide drugs in cancer. Imperial College Press, London, S. 37-52
- Maeda, H., Bharate, G. Y., Daruwalla, J. 2009. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**: 409–419.
- 14 Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J., Maeda, H. 2006. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, *Drug Discov. Today* **11**: 812–818.
- Malam, Y., Loizidou, M., Seifalian, A. M. 2009. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**: 592–599.
- Gullotti, E., Yeo, Y. 2009. Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Mol. Pharm.* **6:** 1041–1051.
- Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., Ostman, A. 2004. High interstitial fluid pressure an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 806–813.
- Bouzin, C., Feron, O. 2007. Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. *Drug Resist. Updat.* **10**: 109–120.
- 19 Pirollo, K. F., Chang, E. H. 2008. Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake? *Trends Biotechnol.* **26**: 552–558.

- Goya, G. F., Berquo, T. S., Fonseca F. C. 2003. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **94**: 3520–3528.
- 21 McNeil, S. E. 2005. Nanotechnology for the biologist. J. Leukoc. Biol. 78: 585–594
- Morawski, A. M., Winter, P. M., Crowder, K. C., Caruthers, S. D., Fuhrhop, R. W., Scott, M. J., Robertson, J. D., Abendschein, D. R., Lanza, G. M., Wickline, S. A. 2004. Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI. *Magn. Reson. Med.* **51**: 480–486.
- Briley-Saebo, K., Bjornerud, A., Grant, D., Ahlstrom, H., Berg, T., Kindberg, G. M. 2004. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell Tissue Res.* **316**: 315–323.
- Barry, S. E. 2008. Challenges in the development of magnetic particles for therapeutic applications. *Int. J. Hyperthermia*. **24**: 451-66
- Moghimi, S. M., Szebeni, J. 2003. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* **42**, 463–478.
- Allen, T. M., Hansen, C., Rutledge, J. 1989. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **981**: 27-35.
- Wei, W., Quanguo, H., Changzhong, J. 2008. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **3**: 397–415
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**: 24–46
- Gupta, A. K., Gupta, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. **26**: 3995-4021.
- Wadajkar, A. S., Menon, J. U., Kadapure, T., Tran, R. T., Yang, J., Nguyen, K. T. 2013. Design and Application of Magnetic-based Theranostic Nanoparticle Systems. *Recent Pat. Biomed. Eng.* **6**: 47–57.
- Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O., Mahmoudi, M. 2011. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **166**: 8-23
- Hans, M. L., Lowman, A. M. 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Curr. Opon. Solid. St. M.* **6**: 319–327.
- Pollert, E., Veverka, P., Veverka, M., Kaman, O., Závěta, K., Vasseur, S., Epherre, R., Goglio, G., Duguet, E. 20009. Search of new core materials for magnetic fluid hyperthermia: preliminary chemical and physical issues. *Prog. Solid State Chem.* **37**: 1–14.
- Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E., Lyer, S. 2010. Pharmakotherapie mittels Nanomedizin: Magnetische Nanopartikel für Drug Delivery und Hyperthermie neue Chancen für die Krebsbehandlung. *Bundesgesundheitsbl.* **53**: 839–845.
- Gilchrist, R. K., Shorey, W. D., Hanselman, R. C., Parrott, J. C., Taylor, C. B. 1957. Selective inductive heating of lymph. *Ann. Surg.* **146**: 596–606.
- 36 Seegenschmiedt, M. H. 1995. Thermoradiotherapy and Thermochemotherapy. Vol. 1, Springer Verlag, Heidelberg

- Kumar, C. S. S. R. 2006. Nanomaterials for Cancer Therapy. 1st Edition. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 282–283.
- Jordan, A., Wust, P., Fähling, H., John, W., Hinz, A., Felix, R. 1993. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: Physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **9**: 51–68.
- 39 Chan, D. C. F, Kirpotin, D. B., Bunn, P. A. 1993. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *J. Magn. Magn. Mater.* **122**: 374–378.
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Schirra, H., Schiestel, T., Schmidt, H, Felix, R. 1999. Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro. *J. Magn. Magn. Mater.* **194**: 185–196.
- 41 Moroz, P., Jones, S. K., Gray, B. N. 2002. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int. J. Hyperthermia* **18**: 267–84.
- Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., Dobson, J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **36**: 167–181.
- 43 Storm, F. K. 1989. Clinical hyperthermia and chemotherapy. *Radiol. Clin. North Am.* **27**: 621-627.
- Alvarez-Berriós, M. P., Castillo, A., Mendéz, J., Soto, O., Rinaldi, C., Torres-Lugo, M. 2013. Hyperthermic potentiation of cisplatin by magnetic nanoparticle heaters is correlated with an increase in cell membrane fluidity. *Int. J. Nanomedicine* 8: 1003–1013.
- Landon, C. D., Park, J. Y., Needham, D., Dewhirst, M. W. 2011. Nanoscale drug delivery and hyperthermia: The materials design and preclinical and clinical testing of low temperature-sensitive liposomes used in combination with mild hyperthermia in the treatment of local cancer. *The Open Nanomedicine J.* **3**: 38-64.
- 46 Rau, B., Wust, P., Tilly, W., Gellermann, J., Harder, C., Riess, H., Budach, V., Felix, R., Schlag, P. M. 2000. Preoperative radiochemotherapy in locally advanced or recurrent rectal cancer: regional radiofrequency hyperthermia correlates with clinical parameters. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 48: 381–391.
- Johannsen, M., Gneveckow, U., Eckelt, L., Füssner, A., Waldöfner, N., Scholz, R., Deger, S., Wust, P., Loening, S. A., Jordan, A. 2005. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int. J. Hyperthermia* **21**: 637–647.
- Johannsen, M., Thiesen, B., Jordan, A., Taymoorian, K., Gneveckow, U., Waldöfner, N., Scholz, R., Koch, M., Lein, M., Jung, K., Loening, S. A. 2005. Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *Prostate*. **64**: 283–292.
- Johannsen, M., Thiesen, B., Gneveckow, U., Taymoorian, K., Waldöfner, N., Scholz, R., Deger, S., Jung, K., Loening, S. A., Jordan, A. 2006. Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer. *Prostate.* **66**: 97–104.
- Jordan, A., Scholz, R., Maier-Hauff, K., van Landeghem, F. K., Waldöfner, N., Teichgräber, U., Pinkernelle, J., Bruhn, H., Neumann, F., Thiesen, B., von Deimling, A., Felix, R. 2006. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J. Neurooncol.* **78**: 7–14.

- Wust, P., Gneveckow, U., Johannsen, M., Böhmer, D., Henkel, T., Kahmann, F., Sehouli, J., Felix, R., Ricke, J., Jordan, A. 2006. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int. J. Hyperthermia* **22**: 673–685.
- Maier-Hauff, K., Rothe, R., Scholz, R., Gneveckow, U., Wust, P., Thiesen, B., Füssner, A., von Deimling, A., Waldöfner, N., Felix, R., Jordan, A. 2007. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J. Neuro. Oncol.* **81**: 53–60.
- Johannsen, M., Gneveckow, U., Thiesen, B., Taymoorian, K., Cho, C. H., Waldöfner, N., Scholz, R., Jordan, A., Loening, S. A., Wust, P. 2007. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *Eur. Urol.* **52**: 1653–1661.
- Johannsen, M., Gneveckow, U., Taymoorian, K., Thiesen, B., Waldöfner, N., Scholz, R., Jung, K., Jordan, A., Wust, P., Loening, S. A. 2007. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: results of a prospective phase I trial. *Int. J. Hyperthermia* **23**: 315–23.
- Jordan, A., Maier-Hauff, K. 2007. Magnetic nanoparticles for intracranial thermotherapy. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7**: 4604–4606.
- Thiesen, B., Jordan, A. 2008. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **24**: 467–474.
- Johannsen, M., Thiesen, B., Wust, P., Jordan, A. 2010. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *Int. J. Hyperthermia* **26**: 790–795.
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., Jordan, A. 2011. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **103**: 317-24.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**: 987-96.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Mirimanoff, R. O. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. 10: 459-66
- Jung, H., Dikomey, E. 1988. Some basic effects in cellular thermobiology. In: Issels, R. D. und Wilmanns, W. (Hrsg.). Hyperthermia and radiation: biological and clinical studies. Springer-Verlag, Heidelberg, S. 104-112.
- Voigt, W., Dietrich, A., Schmoll, H. J. 2006. Cisplatin und seine Analoga. *Pharm. Unserer Zeit* **35**: 134–143.
- Rao, W., Deng, Z. S., Liu, J. 2010. A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **38**: 101–116.

- Wang, D., Lippard, S. J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**: 307–320.
- Safaei, R., Howell, S. B. 2005. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**: 13–23.
- Jamieson, E. R., Lippard, S. J. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* **99**: 2467–2498.
- Patel, D. J., Kozlowski, S. A., Rice, J. A. 1981. Hydrogen bonding, overlap geometry, and sequence specificity in anthracycline antitumor antibiotic. DNA complexes in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3333-3337.
- 68 Singal, P. K., Iliskovic, N. 1998. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **339**: 900–905.
- Majoros, I. J., Williams, C. R., Becker, A., Baker, J. R. Jr. 2009. Methotrexate delivery via folate targeted dendrimer-based nanotherapeutic platform. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **1**: 502-510.
- Rajagopalan, P. T., Zhang, Z., McCourt, L., Dwyer, M., Benkovic, S. J., Hammes, G. G. 2002. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 13481–1346.
- Deacon, R., Chanarin, I., Lumb, M., Perry, J. 1985. Role of folate dependent transformylases in synthesis of purine in bone marrow of man and in bone marrow and liver of rats. *J. Clin. Pathol.* **38**: 1349–1352.
- 72 Bartsch, V. 2004. Das Taxol®-Buch. 2., überarb. u. aktual. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.12–14.
- Schiff, P. B., Fant, J., Horwitz, S. B. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **227**: 665–667.
- Schiff, P. B., Horwitz, S. B. 1980. Taxol stabalizes microtubules in mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1561–1565.
- Dye, R. B., Fink, S. P., Williams, Jr. R. C. 1993. Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J. Biol. Chem.* **268**: 6847–6850.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55–63.
- 77 Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren. 2010. Ausschuß für Anaesthesie, Analgesie und Schmerzprophylaxe der GV-SOLAS
- 78 Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch. 1999. Ausschuß für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT
- 79 Gebrauchsinformation Eisen-Küvettentest Spectroquant[®]. 2011. Merck KGaA, Darmstadt. URL: http://www.merckmillipore.com/chemicals /de_DE/Merck-DE-Site/EUR/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=MDA_CHEM-114549&Document Type=PI&DocumentId=3158.ProNet& DocumentSource=PRONET (24.06.2013)
- Jordan, A., Waldöfner, N., Decken, K., Scholz, R. 2012. Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugate. Patent EP 1871423 B1 **[0028]** (Patenterteilung 01.08.2012)
- Massart, R., Cabuil, V., 1987. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils. *J. Chem. Phys.* **84**: 967–973

- Sun, Y., Duan, L., Guo, Z., DuanMu, Y., Ma, M., Xu, L., Zhang, Y., Gu, N. 2005. An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application *J. Magnetism Magnetic. Mater.* **285**: 65–70.
- Jordan, A., Waldöfner, N., Decken, K., Scholz, R. 2012. Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugate. Patent EP 1871423 B1 **[0089]** (Patenterteilung 01.08.2012)
- Gao, J. 2011. A Novel Concept For Hyperthermia Induced Local Chemotherapy. Unv. Diss., Freie Universität Berlin
- Alexander, C. M., Maye, M. M., Dabrowiak, J. C. 2011. DNA-capped nanoparticles designed for doxorubicin drug delivery. *Chem. Commun.* **47**: 3418–3420.
- Jordan, A., Waldöfner, N., Decken, K., Scholz, R. 2012. Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugate. Patent EP 1871423 B1 **[0077]** (Patenterteilung 01.08.2012)
- Böhm, B. H. L. 1999. Herstellung und Charakterisierung von Nanosuspensionen als neue Arzneiform für Arzneistoffe mit geringer Bioverfügbarkeit, Unv. Diss., Freie Universität Berlin
- Moghimi, S. M., Hunter, A.C. 2000. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* **18**: 412–420.
- Keck, C. M., Müller, R. H. 2006. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **62**: 3–16.
- 90 Müller, R. H., Hildebrand, G. E. 1998. Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. 2. Auflage. Wissenschaftliche Verlags-gesellschaft mbH, Stuttgart
- 91 Shikanov, A., Shikanov, S., Vaisman, B., Golenser, J., Domb, A. J. 2008. Paclitaxel tumor biodistribution and efficacy after intratumoral injection of a biodegradable extended release implant. *Int. J. Pharm.* **358**: 114–120
- Deng, Z., Zhen, Z., Hu, X., Wu, S., Xu, Z., Chu, P. K. 2011. Hollow chitosan-silica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy. *Biomaterials*. **32**: 4976–4986.
- 93 Treskes, M., Boven, E., Holwerda, U., Pinedo, H. M., van der Vijgh, W. J. 1992. Time dependence of the selective modulation of cisplatin-induced nephrotoxicity by WR2721 in the mouse. *Cancer Res.* **52**: 2257–2260.
- 94 Sicherheitsdatenblatt Cisplatin 10 mg-Konzentrat zur Infusions-bereitung. 2004. URL: http://www.pharmazie.com/graphic/A/93/1-23393.pdf (07.06.2013)
- Doss, D., Ohnesorge, F. K. 1966. Motilität und Körpertemperatur von Mäusen in verschiedenen Umgebungstemperaturen. *Pflug. Arch. ges. Phys.* **289**: 91–97.
- 96 Cruz, J. I., Loste, J. M., Burzaco, O. H. 1998. Observations on the use of medetomidine/ketamine and its reversal with atipamezole for chemical restraint in the mouse. *Lab. Anim.* **32**:18-22
- 97 Sicherheitsdatenblatt Doxorubicin Hydrochloride Injection. 2010. Teva Parenteral Medicines. URL: http://www.bdipharma.com/MSDS/Teva/ Doxorubicin_MSDS.pdf (03.05.2013)
- 98 Majoros, I. J., Williams, C. R., Becker, A., Baker, J. R. Jr. 2009. Methotrexate delivery via folate targeted dendrimer-based nanotherapeutic platform. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **1**: 502–510.
- 99 Sicherheitsdatenblatt zu Methotrexate Injection, USP. 2012. Hospira Inc. URL: http://www.hospira.com/Images/MSDS_Methotrexate_Injection_101912_32-90735_ 1.pdf (10.06.2013)

- Dorr, R. T. 1994. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann. Pharmacother.* **28**: 11–14.
- Müller, R. H., Benita, S., Böhm, B. H. L. 1998. Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs. Medpharm. Scientific. Publishers, Stuttgart
- Müller, R. H, Gohla, S., Keck, C. M. 2011. State of the art of nanocrystals special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**: 1–9.
- Müller, R. H., Peters, K. 1998. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int. J. Pharm.* **160**: 229–237
- Liggins, R. T., Hunter, W. L., Burt, H.M. 1997. Solid-state characterization of paclitaxel. *J. Pham. Sci.* **86**: 1458–1463.
- Tarr, B. D., Sambandan, T. G., Yalkowsky, S. H. 1987. A new parenteral emulsion for the administration of taxol. *Pharm. Res.* **4**: 162–165.
- 106 Landon, C. D., Park, J. Y., Needham, D., Dewhirst, M. W. 2011. Nanoscale drug delivery and hyperthermia: The materials design and preclinical and clinical testing of low temperature-sensitive liposomes used in combination with mild hyperthermia in the treatment of local cancer. *The Open Nanomedicine J.* **3**: 38–64.
- 107 Li, C. J., Miyamoto, Y., Kojima, Y., Maeda, H. 1993. Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure. *Br. J. Cancer* **67**: 975–980.
- Sapra, P., Tyagi, P., Allen, T. M. 2005. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr. Drug Deliv.* **2**: 369–381.
- 109 Kingsley, J. D., Dou, H., Morehead, J., Rabinow, B., Gendelman, H. E., Destache, C. J. 2006. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **1**: 340–50.
- Huang, H. S., Hainfield, J. F. 2013. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. *Int. J. Nanomedicine*. **8**: 2521–2532.
- Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O., Mahmoudi, M. 2011. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **166**: 8–23.
- 112 Vanakoski, J., Seppala, T. 1998. Heat exposure and drugs. A review of the effects of hyperthermia on pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **34**: 311–322.
- Balcombe, J. P., Barnard, N. D., Sandusky, C. 2004. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp. Top Lab. Anim. Sci.* **43**: 42–51.
- Gebrauchsinformation Cisplatin 10 mg, HEXAL® Pl. 2000. HEXAL AG, Holzkirchen. URL:http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/fileadmin/media/pdf/cisplatin.pdf (20.06.2013)
- Pirollo, K. F., Chang, E. H. 2008. Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake? *Trends Biotechnol.* **26**: 552–558.
- Danhier, F., Feron, O., Préat, V. 2010. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release.* **148**: 135–146.
- Daniels, T. R., Delgado, T., Helguera, G., Penichet, M. L. 2006. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin. Immunol.* **121**: 159–176.

- Low, P. S., Kularatne, S. A. 2009. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**: 256–262.
- Scaltriti, M., Baselga, J. 2006. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* **12**: 5268–5272.
- Filippousi, M., Papadimitriou, S. A., Bikiaris, D. N., Pavlidou, E., Angelakeris, M., Zamboulis, D., Tian, H., Van Tendeloo, G. 2013. Novel core-shell magnetic nanoparticles for Taxol encapsulation in biodegradable and biocompatible block copolymers: preparation, characterization and release properties. *Int. J. Pharm.* 448: 221-30.
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fähling, H., Krause, J., Wlodarczyk, W., Sander, B., Vogl, T., Felix, R. 1997. Effects of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *Int. J. Hyperthermia*. **13**: 587–605.