

**Herstellung, *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung
oberflächenmodifizierter Nanopartikel auf der Basis
geeigneter Trägersysteme**

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

Katrin Claudia Fischer
aus Berlin

Juli 2006

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Privatdozent Dr. Ralph Lipp in der Pharmazeutischen Entwicklung der Schering AG Berlin, Abteilung Drug Delivery Systems, und am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ralph Lipp
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Bodmeier

Disputation am 8. November 2006

Das Leben ist eines der spannendsten Experimente...

Für Rudi

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....	1
2	THEORETISCHER HINTERGRUND.....	5
2.1	Nanopartikel als kolloidale Arzneistoffträger	5
2.2	Applikationswege von Nanopartikeln	6
2.2.1	Orale Anwendung.....	6
2.2.2	Parenterale Anwendung.....	9
2.2.2.1	Passives Targeting.....	10
2.2.2.2	Aktives Targeting.....	12
2.2.2.3	Aufnahme in die Zelle.....	14
2.2.3	Sonstige systemische Applikationswege	17
2.3	Kolloidale Arzneistoffträgersysteme	19
2.3.1	Polyelektrolyt-Komplexe.....	19
2.3.2	Polyelektrolyte.....	21
2.3.2.1	Polyethylenimin	21
2.3.2.2	Modifizierte Cyclodextrine	22
2.3.3	Feste Polymernanopartikel aus Polyalkylcyanoacrylaten	24
2.3.3.1	Anionische Polymerisation	25
2.3.3.2	Nanopräzipitation / SESD-Verfahren.....	27
2.4	Kolloidstabilität und Oberflächenmodifikation	28
2.4.1	Zwischenmolekulare Wechselwirkungen.....	28
2.4.1.1	Elektrostatische Wechselwirkungen / Ionenbindung	29
2.4.1.2	Wasserstoffbrückenbindungen.....	29
2.4.1.3	Van der Waals-Kräfte	30
2.4.1.4	Hydrophobe Wechselwirkungen.....	30
2.4.2	Kolloidstabilität.....	31
2.4.3	Oberflächenmodifikation.....	33
2.5	Detektion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	34
2.5.1	Fluoreszenzbasierte Detektion.....	35
2.5.1.1	Prinzip der Fluoreszenz.....	35
2.5.1.2	Zellmikroskopische Untersuchungen.....	36
2.5.2	Optical Imaging / Nahinfrarot-Fluoreszenz.....	37
2.5.2.1	Nahinfrarot - Kontrastmittel.....	39
3	ANALYTISCHE METHODEN	41
3.1	Spektroskopie	41
3.1.1	Photonenkorrelations-Spektroskopie.....	41
3.1.2	Laser-Doppler-Anemometrie und Zetapotential.....	42
3.1.3	Absorptionsspektroskopie (UV-Vis-Spektroskopie)	44
3.1.4	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie	45
3.1.5	Fluoreszenzspektroskopie.....	46
3.2	Mikroskopie.....	47
3.2.1	Rasterelektronenmikroskopie	47
3.2.2	Transmissionselektronenmikroskopie	48
3.2.3	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	49
3.3	Röntgenpulverdiffraktometrie.....	49

3.4	Dynamische-Differenzkalorimetrie	51
3.5	Chromatographie	51
3.5.1	Gel-Permeations-Chromatographie	51
3.5.2	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	52
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1	Selbstaggregierende diagnostische Systeme	55
4.1.1	Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Nanopartikel.....	56
4.1.1.1	Partikelcharakterisierung.....	57
4.1.1.2	Optische Eigenschaften der Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Nanopartikel.....	62
4.1.1.3	Oberflächenmodifikation der Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Nanopartikel	68
4.1.2	Modifikation der Polymerkomponente	84
4.1.2.1	PEG-Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Komplexe.....	84
4.1.2.2	Nanopartikel aus kationischer Stärke und Tetrasulfocyanin	89
4.1.3	Modifikation der Farbstoffkomponente	93
4.1.3.1	Verwendung eines Farbstoff-Carbonsäure-Derivates.....	93
4.1.3.2	Verwendung eines alternativen NIR-Farbstoffes	97
4.1.4	Zusammenfassung selbstaggregierende diagnostische Systeme	101
4.2	Selbstaggregierende therapeutische Systeme	104
4.2.1	Nanopartikel aus Vatalanib succinat und β -Cyclodextrinphosphat	105
4.2.1.1	Komplexcharakterisierung: Partikelgröße, Zetapotential und Partikelgestalt	106
4.2.1.2	Komplexstabilität: Einfluss der Konzentration und der verwendeten Base	109
4.2.1.3	Einfluss simulierter intestinaler Medien auf die Komplexstabilität	111
4.2.1.4	Bestimmung der Beladungsrate / Verkapselungseffizienz	113
4.2.1.5	Oberflächenmodifikation der Vatalanib- β -Cyclodextrinphosphat-Komplexe	115
4.2.1.6	Untersuchung und Charakterisierung der Komplexstruktur	117
4.2.1.7	Lyophilisationsversuche	122
4.2.2	Nanopartikel aus Vatalanib succinat und Sulfobutylether- β -Cyclodextrin.....	123
4.2.3	Zusammenfassung selbstaggregierende therapeutische Systeme.....	125
4.3	Feste Polymernanopartikel	127
4.3.1	Herstellung von PBCA-Nanopartikeln durch anionische Polymerisation	128
4.3.2	Co-Verkapselung von Aminoverbindungen in PBCA-Nanopartikel.....	129
4.3.2.1	Nanopräzipitation	129
4.3.2.2	Verkapselung von Aminoverbindungen.....	129
4.3.2.3	PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel.....	131
4.3.3	Oberflächenmodifikation von PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikeln	133
4.3.3.1	Modifikation der PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel mit Adenosintriphosphat	133
4.3.3.2	Modifikation der PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel mit Glu(10)-b-PEG(110)	134
4.3.4	PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel	135
4.3.4.1	Farbstoffbeladene PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel	136
4.3.4.2	Oberflächenmodifikationen mit Adenosintriphosphat.....	139
4.3.4.3	Oberflächenmodifikation mit Folsäure.....	142
4.3.4.4	DSC-Untersuchung	144
4.3.5	Zusammenfassung feste Polymernanopartikel.....	145
4.4	Zellkulturversuche	147
4.4.1	Einfluss der Partikelauflösung.....	148
4.4.2	Einfluss funktionalisierter Partikeloberflächen auf die Zellaufnahme.....	149
4.4.3	Zellaufnahmeverhalten Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel.....	152
4.4.4	Einfluss der Partikelkonzentration	157
4.4.5	Einfluss der Inkubationszeit.....	160
4.4.6	Zusammenfassung Zellkulturversuche	164
4.5	In vivo Untersuchung	166
4.5.1	Charakterisierung der PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel	166

4.5.1.1	Partikelgröße und Zetapotential	168
4.5.1.2	Spektroskopische Untersuchung	169
4.5.2	Tierversuch	171
4.5.2.1	Versuchsablauf, Behandlungsschema und apparativer Aufbau.....	171
4.5.2.2	Versuchsdaten und Ergebnisse des in vivo Versuches	173
4.5.3	Bewertung der Ergebnisse	176
4.5.4	Zusammenfassung des Tierversuches und Ausblick	181
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	183
6	SUMMARY	189
7	ANHANG	193
7.1	Experimenteller Teil	193
7.1.1	Herstellung / Aufarbeitung der Nanopartikel	193
7.1.1.1	Nanopartikel aus Polyethylenimin und Tetrasulfocyanin	193
7.1.1.2	Nanopartikel aus Vatalanib succinat und β -Cyclodextrin-Phosphat	193
7.1.1.3	PBCA-Nanopartikel mittels anionischer Polymerisation	193
7.1.1.4	Funktionalisierte PBCA-Nanopartikel durch Nanopräzipitation	194
7.1.2	Zellkultur	195
7.1.3	Tierversuch	195
7.2	Verwendete Geräte / Prozessparameter (Methode)	197
7.2.1	NIR-Fluoreszenz-Imaginggerät Schering AG	197
7.2.2	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	197
7.2.3	Gel-Permeations-Chromatographie (GPC).....	198
7.2.4	Geräte / Software	198
7.3	Material.....	200
7.4	Bildanhang.....	202
7.5	Abkürzungsverzeichnis.....	212
8	LITERATURVERZEICHNIS	215
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	228
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	233
11	VERÖFFENTLICHUNGEN	234
12	DANKSAGUNG	235
13	CURRICULUM VITAE	237
