

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Nanopartikel als kolloidale Arzneistoffträger

Intensive Forschung im Bereich nanopartikulärer Arzneistoffträgersysteme hat in den letzten Jahrzehnten zu einem erheblichen Wissenszuwachs auf diesem Gebiet geführt. Die Attraktivität von Nanopartikeln als Drug Delivery System beruht vor allem auf ihrer geringen Größe, welche die Überwindung unterschiedlichster physiologischer Barrieren ermöglicht [11]. Als vorteilhaft hat sich weiterhin erwiesen, dass entsprechend den Anforderungen die gewünschten physikalisch-chemischen Parameter in kolloidale Arzneistoffträgersysteme integriert werden können. Solche Anforderungen können beispielsweise durch die Arzneistoffeigenschaften, die Art der Erkrankung oder auch den Applikationsweg definiert werden.

Entwicklung und Anwendung von therapeutischen Nanopartikeln werden allgemein verknüpft mit Zielsetzungen wie: (i) gesteuerte Verteilung und Anreicherung von Wirkstoffen, (ii) regulierte Freisetzung, (iii) konstante Wirkstoffspiegel im Blut bzw. begrenzte Variation, (iv) geringere Dosis und somit Senkung von Nebenwirkungen bzw. Toxizität, (v) erhöhtes Sicherheitsprofil, (vi) verringerte Applikationshäufigkeit mit verbesserter *Compliance* und (vii) Umgehung von Resistenzmechanismen [12][13]. Für die Nutzung im diagnostischen Bereich stehen Faktoren wie Unbedenklichkeit, spezifische Anreicherung im zu kontrastierenden Gewebe sowie eine Unterstützung von therapeutischen Maßnahmen, beispielsweise im Rahmen einer chirurgischen Tumorentfernung, im Vordergrund (vgl. Kap. 2.5.2.1).

Eine Unterscheidung nanopartikulärer Systeme findet in erster Linie nach ihrem grundlegenden Aufbau statt. Im Bereich der anorganischen Nanopartikel sind vor allem Metall-Nanopartikel wie Eisenoxidpartikel, Goldpartikel oder *Quantum dots* zu erwähnen [14]. Zusätzlich steht im Bereich organischer Nanopartikel eine Vielzahl von kolloidalen Trägersystemen wie Liposomen, Polymernanopartikeln, Nanokristallen, festen Lipid-Nanopartikeln / Nanostrukturierten-Lipid-Carriern (SLN / NLC), Polyelektrolyt-Komplexen, Polymerosomen, Transferosomen u.a. zur Auswahl [15][16].

Da innerhalb der Entwicklung eines nanopartikulären Drug Delivery Systems eine Reihe komplexer Fragestellungen zu bewältigen sind, hat ein interdisziplinäres wissenschaftliches

Arbeiten in diesem Bereich einen besonders hohen Stellenwert [2]. So können unter anderem auf der Basis umfangreicher Kenntnisse über die Charakteristik der Partikel und deren Verhalten auf unterschiedlichsten Applikationswegen gezielter und effizienter optimierte nanopartikuläre Systeme entwickelt werden. Im folgenden Abschnitt wird deshalb zunächst auf mögliche Applikationswege, den damit verbundenen pharmazeutischen Vorteilen sowie Besonderheiten *in vivo* näher eingegangen. Anschließend werden die theoretischen Hintergründe der in dieser Arbeit verwendeten Systeme erläutert, wobei eine umfassende Darstellung aller existierender kolloidaler Trägersysteme und ihrer Eigenschaften nicht Teil dieser Arbeit sein soll.

2.2 Applikationswege von Nanopartikeln

2.2.1 Orale Anwendung

Die orale Applikationsroute wird für die Einnahme von Arzneimitteln bevorzugt und am häufigsten verwendet. Eine einfache, schmerzfreie und nicht-invasive Anwendung sind Gründe für eine gute Compliance beim Patienten. In bestimmten Fällen verhindern jedoch ein schlechtes pharmakokinetisches Wirkstoffprofil sowie physiologische Barrieren im Magen-Darm-Trakt eine ausreichende Wirkstoffresorption nach oraler Einnahme. Einige Ursachen dafür können sein: (i) Instabilität des Wirkstoffes (pH-Wert, Enzyme), (ii) ungenügende Löslichkeit, (iii) Refluxmechanismen und *First-Pass*-Effekt, (iv) kurze Passagezeiten und (v) lokale Gewebsschädigung [17].

Im Folgenden sollen einige Beispiele den vielfältigen Nutzen von oral applizierten Nanopartikeln veranschaulichen. So wurde z.B. gezeigt, dass Proteine und Peptide, welche normalerweise im Magen-Darm-Trakt instabil sind, mit Hilfe von kolloidalen Arzneistoffträgern intakt über das darmassoziierte Lymphgewebe in die systemische Zirkulation eingeschleust werden können. Auf dieser Grundlage wäre beispielsweise eine orale Immunisierung möglich [11][18][19][20]. Bekannt ist ebenfalls, dass sich aufgrund der großen Oberfläche von Nanopartikeln eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit ergibt und damit auch schlecht lösliche Substanzen oral verabreicht werden können [21][22]. Weiterhin ermöglicht eine nanopartikuläre Aufnahme über das darmsassoziierte Lymphsystem die Umgehung von Reflux-Transportern wie dem P-Glycoprotein (Pgp) und eine Minimierung des *First-Pass*-Effektes bestimmter Substanzen [17][23]. Allein durch Verwendung einer

nanopartikulären Formulierung wurde eine deutliche Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit von Substanzen wie Vincamin erzielt [24]. Entzündliche Darmerkrankung wie *Colitis Ulcerosa* und *Morbus Crohn* können durch verlängerte Passagezeiten des Wirkstoffes besser behandelt werden, indem der kolloidal gebundene Arzneistoff gezielt im Dickdarm angereichert wird und anschließend eine verzögerte Freisetzung durch Polymerabbau stattfindet [17][25]. Sofern eine Aufnahme der Partikel in die systemische Zirkulation erfolgt ist, verhalten sie sich wie nach parenteraler Applikation (siehe dazu auch Kap. 2.2.2).

Die Vorteile kolloidaler Arzneistoffträger für orale Formulierungen ergeben sich aus ihren besonderen Eigenschaften und dem Verhalten im Gastrointestinal-Trakt (GIT), weshalb im Folgenden auf die partikuläre Passage sowie die Resorption eingegangen wird.

Eine Aufnahme der Partikel im GIT erfolgt nicht ausschließlich wie früher angenommen durch die *Peyerschen Plaques*, sondern ebenso durch die Enterozyten und inter- bzw. parazellulär (siehe Abb. 1b) [20].

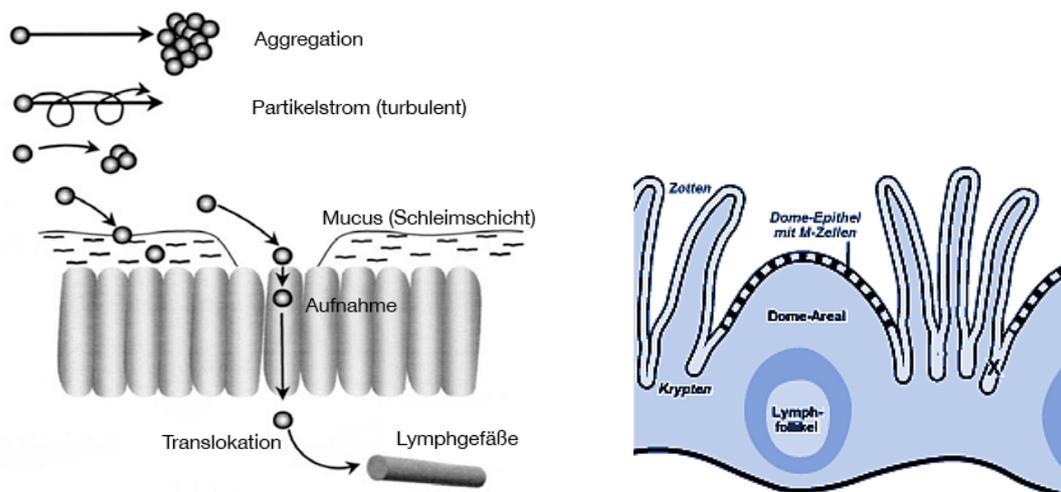


Abb. 1 a) Kolloidale Arzneistoffträger im GIT nach peroraler Applikation; modifiziert nach [26];
b) Aufbau der Darmzellen: Peyersche Plaques (Lymphoidfollikel), M-Zellen und Zotten [27]

Bei den Peyerschen Plaques handelt es sich um Anhäufungen von Lymphoid-Follikeln, welche zum darmassoziierten Lymphsystem gehören. Oberhalb dieser befinden sich M-Zellen, durch welche die Partikel mittels Transzytose geschleust werden, um anschließend über die Peyerschen Plaques in die Lymphe und von dort in die systemische Zirkulation zu gelangen (siehe Abb. 1b) [26]. Dieser Aufnahmeweg setzt allerdings voraus, dass es zuvor im GIT nicht zur Aggregation der Partikel kommt oder die Partikel gemeinsam mit der Nahrung vollständig im gastrointestinalen Strom verbleiben (siehe Abb. 1a).

Für die Aufnahme kolloidaler Arzneistoffträger über den GIT ist unter anderem der Mukus (die Schleimschicht) von Bedeutung, welcher eine schützende Barriere des Körpers darstellt. Die geringe Größe der Nanopartikel bewirkt gute adhäsive Eigenschaften auf dieser Schleimschicht, was eine Voraussetzung für die anschließende Passage ist. Diese wird allerdings durch die lokal erhöhte Viskoelastizität des Mukus erschwert. Mit Hilfe von *multiple particle tracking* (MPT) wurde festgestellt, dass kleinere Partikel bis 200 nm über Poren in der Mukusschicht diese wesentlich schneller passieren können als Partikel mit einem Durchmesser um 500 nm. Erklärt wird der Effekt durch die deutlich geringere Mikroviskosität dieser Poren, welche eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel erlaubt und somit ihre Passagezeit verringert [28]. Um die partikuläre Passage durch die Mukusschicht zu erleichtern, wurden mukolytische Substanzen in Zusammenhang mit der gastrointestinalen partikulären Aufnahme getestet. Interessanterweise konnten nur größere Partikel die Schleimschicht erleichtert überwinden, da durch entstandene Mukusfragmente die von kleineren Partikeln genutzten Transportporen blockiert wurden [28]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Verwendung mukoadhäsiver Substanzen wie Chitosan auf der Partikeloberfläche deutlich die partikuläre Aufnahme im GIT steigern kann [29]. Als eine mögliche Ursache wird die bessere Mukusadhäsion solcher Partikel genannt, welche auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräften zwischen Partikeloberfläche und Schleimschicht beruht [30]. Weiterhin sollen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen kationischen Polysacchariden und der anionischen Mukosa Grund für eine stärkere Haftung sein [29]. Für Chitosan wurde auch ein vorübergehender Öffnungsmechanismus der *tight junctions* an *Caco-2*-Zellen beschrieben, was die hohe Transferrate solcher Partikel durch diese Zelllinie erklären könnte [31]. Ebenso haben sich Lektine auf der Partikeloberfläche als vorteilhaft für die gastrointestinale Resorption herausgestellt [32].

Neben all diesen Erkenntnissen gibt es zum Teil widersprüchliche *in vitro* und *in vivo* Daten. Diese Widersprüche machen deutlich, dass die Abläufe bei oraler Aufnahme kolloidaler Arzneistoffträgersysteme *in vivo* weitaus komplexer sind, als es *in vitro* simuliert werden kann und bei der Entwicklung berücksichtigt wird [26].

Zwischen den *in vitro* erzielbaren Eigenschaften und den *in vivo* auftretenden Effekten muss deshalb genau abgewogen werden (Tab. 2).

Tab. 2 Partikuläre Eigenschaften und resultierende Effekte; zusammengestellt nach [26]

Eigenschaft	Effekt	
	VORTEIL	NACHTEIL
Größe: < 100 nm	Zellaufnahme ↑	Mukusadhäsion im GIT ↓, Stabilität ↓
	> 500 nm	Zellaufnahme ↓
Aufbau: Liposomen / Mizellen	Flexibilität an Körperbarrieren ↑	Stabilität ↓
	Polymernanopartikel	Flexibilität an Körperbarrieren ↓
Oberfläche: Antikörper	Spezifität Zielgewebe ↑	Mukusadhäsion ↓, RES-Aktivierung ↑
	PEG-Oberfläche	Mukusadhäsion ↑, Stabilität ↑, Zirkulationszeit ↑ ⇒ passives Targeting ↑

Zu viele Faktoren wie z.B. Nahrungseinflüsse, Scherkräfte im Gastrointestinal-Trakt, Speichelkontakt etc. können in vitro meist nicht ausreichend berücksichtigt werden. Hinzu kommt, dass die unterschiedlichen Methoden einen Vergleich der Daten schwierig machen [26]. Entsprechend dem partikulärem System und der Zielsetzung können deshalb vor allem durch in vivo Versuche oder verbesserte in vitro Systeme eindeutige Aussagen zur Effizienz der kolloidalen Trägersysteme gemacht werden.

2.2.2 Parenterale Anwendung

Die parenterale Applikation von kolloidalen Trägersystemen hat sich insbesondere in der Tumorthherapie als sehr vorteilhaft erwiesen. Im Vordergrund steht hier, die dosislimitierende Toxizität zytostatisch wirksamer Substanzen durch Verwendung kolloidaler Arzneistoffträger zu verringern [33]. Durch die gezielte Wirkstoffanreicherung im Tumorgewebe können Schäden an gesundem Gewebe deutlich minimiert werden und gleichzeitig lokal ausreichend hohe Wirkstoffkonzentrationen für eine Zerstörung des Tumorgewebes erreicht werden.

Mit Partikelgrößen zwischen 10 nm und 500 nm sind nanopartikuläre Arzneistoffträger für eine parenterale Applikation sehr gut geeignet, da bei entsprechender Stabilität nicht die Gefahr von Gefäßverschlüssen besteht. Nanopartikel können neben der intravenösen Injektion auch durch Resorption über den GIT, die Lymphe, Schleimhäute etc. in den Blutkreislauf gelangen. Im Blutkreislauf unterliegen sie speziellen Eliminierungs- und Abbauprozessen, welche großen Stellenwert im Hinblick auf das Partikeldesign haben und deshalb im Folgenden betrachtet werden sollen.

Während der Zirkulation der Partikel im Blutkreislauf kommt es zur Adsorption verschiedener Plasmaproteine auf der Partikeloberfläche. Diese auch als *Opsonine* bezeichneten Proteine besitzen eine Signalfunktion für Makrophagen, derartige körperfremde Partikel zu phagozytieren und damit aus dem Blutkreislauf zu eliminieren. Der Abbau erfolgt anschließend über die Organe des retikulo-endothelialen Systems (RES), wozu Leber, Milz, Lunge und Knochenmark zählen. Die Größe sowie die Oberfläche der Partikel sind Schlüsselfaktoren dafür, wie schnell ihr Abbau über das RES stattfindet. Partikel mit einer hydrophoben Oberfläche und einem Durchmesser größer als 400 nm werden extrem schnell über das RES eliminiert [34]. Unterhalb einer Größe von 5 nm oder einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa erfolgt eine renale Eliminierung kolloidale Systeme [35]. Eine langsame Eliminierung und somit ausreichend lange Zirkulationszeit im Blutkreislauf ist die Voraussetzung dafür, dass sich kolloidale Trägersysteme über Fenestrierungen der Gefäße in pathologischem Gewebe wie Tumorgewebe anreichern können. Man spricht in diesem Fall von *passivem Targeting*. Werden zusätzlich gewebes- oder zellspezifische Liganden auf der Partikeloberfläche verwendet, spricht man von einer Erweiterung des passiven Targetings durch *aktives Targeting*.

2.2.2.1 Passives Targeting

Matsumura und Maeda beschrieben bereits 1986 eine Strategie zur gezielten Arzneistoffkumulation in soliden Tumoren mittels des EPR (*enhanced permeation and retention*) Effektes [36][37]. Hierbei handelt es sich um einen passiven Anreicherungsmechanismus, welcher die strukturellen Besonderheiten von tumorösem oder auch entzündetem Gewebe ausnutzt (siehe Abb. 2) [38].

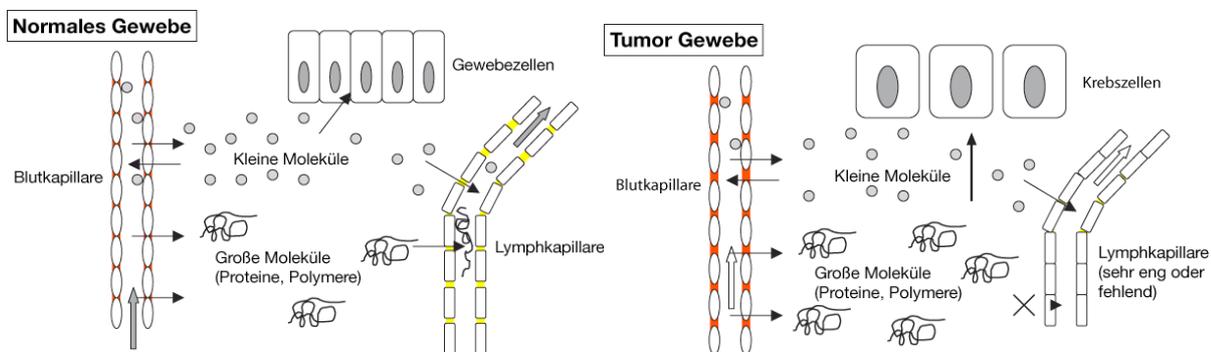


Abb. 2 a) Transportvorgänge durch das Blutgefäßsystem in gesundem Gewebe; b) EPR-Effekt durch Fenestrierungen von pathologisch verändertem Gewebe; modifiziert nach [38]

Erklärbar wird dieser pathologische Unterschied durch eine Betrachtung der Entstehung von Tumorgewebe. Stark proliferierendes Tumorgewebe zeichnet sich aufgrund der hohen Zellteilungsrate durch ein schnelles Wachstum aus. Kann der wachstumsbedingt erhöhte Nährstoffbedarf nicht mehr gedeckt werden, führt dies zu einem Versorgungsmangel im Tumorrinneren. Die häufigste Folge ist ein Absterben der Zellen und eine Nekrotisierung dieser Tumorbereiche. Ein solcher Nährstoffmangel kann im Zuge der Tumorentwicklung auch zur Aktivierung der Angiogenese führen. Infolgedessen kommt es zur Ausbildung und Migration von Endothelzellen und Gewebe, wodurch Blutgefäße in den Tumor einwachsen [39]. Der dadurch freie Zugang des Tumors zum Blutkreislauf gewährleistet eine ausreichende Nährstoffversorgung und ermöglicht Metastasenbildung. Während der Angiogenese kommt es zu einer ungehinderten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welches maßgeblich für die pathologischen Fenestrierungen (*leaky vessels*) und damit die Durchlässigkeit des Tumorgewebes verantwortlich sein soll [40]. Eine alternative Hypothese geht davon aus, dass vasodilatierende Faktoren wie Kinine die Bildung dieser löchrigen Gewebsstruktur verursachen, zumal auch entzündetes bzw. arthritisches und infektiöses Gewebe einen ähnlichen Aufbau besitzen (siehe Abb. 2a und Abb. 2b) [37][41].

Das unkontrollierte Tumorstadium führt unter anderem dazu, dass eine lymphatische Drainage kaum oder gar nicht ausgebildet wird. Die Folge ist ein erschwerter Abtransport und damit ein Zurückhalten von angereicherten Substanzen im Tumorgewebe [40][42][43]. Aufgrund der durchlässigen Gewebsstruktur und der fehlenden lymphatischen Drainage kommt es zum angesprochenen EPR-Effekt. Je nach Tumorart wird die Größe der Fenestrierungen zwischen 380 nm und 780 nm angegeben, weshalb dieser Bereich auch als *nanosize window* bezeichnet wird [44][45]. Im Gegensatz dazu besitzt normales Gewebe wie Herz, Gehirn oder Lunge so genannte *tight junctions*, welche mit weniger als 10 nm (meist 2 nm bis 4 nm) Durchmesser undurchlässig für kolloidale Arzneistoffträger sind [15]. Als weitere pathologische Besonderheiten von Tumorgewebe sind zu nennen: (i) das veränderte pH-Milieu, welches mit pH 5,8 bis pH 7,8 angegeben wird, (ii) Überexpression von Rezeptoren wie Folsäure, (iii) erhöhte Aktivität bestimmter Lipasen und Enzyme wie Phospholipase A2 [7][43][46]. Im Zusammenhang mit Drug Delivery Systemen werden diese Eigenschaften verwendet, um den Arzneistoff lokal zu aktivieren, beispielsweise durch Spaltung säurelabiler Linker.

Ein weiterer passiver Anreicherungsmechanismus nutzt den Abbau kolloidaler Arzneistoffträger über Makrophagen. Dabei ist von Interesse, die arteriosklerotische Plaquebildung nach Einsetzung eines Stents zu unterbinden. Verwendet werden z.B. mit Bisphosphonaten beladene klassische Liposomen, welche nach intravenöser Applikation im Zuge der Eliminierung durch Makrophagen phagozytiert werden. Die in den Makrophagen angereicherten Bisphosphonate führen zu deren Zerstörung, wodurch eine Plaquebildung im gewebsgeschädigten Bereich des Stents direkt nach der Operation verhindert werden kann [47].

2.2.2.2 Aktives Targeting

Der Begriff *aktives Targeting* wird verwendet, wenn gewebs- oder zellspezifische Liganden für eine gezielte Anreicherung zum Einsatz kommen. Aktive Liganden können sowohl an Arzneistoffe direkt (Ligand-Arzneistoff-Konjugate) als auch auf die Oberfläche kolloidaler Trägersysteme gekoppelt werden. Aktives Targeting kolloidaler Trägersysteme weist gegenüber Ligand-Arzneistoff-Konjugaten Vorteile auf wie: (i) lokal höhere Arzneistoffkonzentration durch Transport und Anreicherung einer Vielzahl von Arzneistoff-Molekülen, (ii) Modifikation und Kopplung des Liganden findet am Trägersystem ohne Aktivitätsverlust des Wirkstoffes statt, (iii) Verwendung mehrerer Liganden pro Partikel erhöht die Wahrscheinlichkeit der Rezeptor-Interaktion, (iv) Zellinteraktion findet hauptsächlich in fenestriertem Gewebe statt, da die Partikel in normales Gewebe aufgrund der Größe nicht eindringen können [6].

Als Zielstruktur dienende molekulare Marker wurden bereits für kardiovaskuläre, inflammatorische und infektiöse Erkrankungen, wie auch für Krebs, Thrombosen und andere Erkrankungen identifiziert [33]. Geeignete Liganden für diese Zielstrukturen können sowohl Antikörper, Peptide aber auch kleine organische Moleküle sein. Eine Auswahl beschriebener kolloidaler Trägersysteme mit aktivem Targeting sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3 Auswahl von Liganden, welche für aktives Targeting kolloidaler DDS verwendet wurden; modifiziert nach [6]

Targeting-Liganden	Targets	Beispiele für kolloidale Systeme
Folsäure	Folsäure-Rezeptor	Liposomen Albumin-Nanopartikel
Transferrin	Transferrin-Rezeptor	Liposomen Nanogel
Insulin	Insulin-Rezeptor	Magnetische Nanopartikel
Antikörper u. deren Fragmente		
Anti-HER2 und deren Fragmente	HER-2 (or ERBB2)-Rezeptor	Liposomen
OX26 (anti-Transferrin)	Transferrin-Rezeptor	Liposomen
323/A3	Epitheliales-Glycoprotein	Liposomen
Anti-Flk-1	VEGF-Rezeptor 2 (Flk-1)	Lipidnanopartikel
Anti-CD19	CD-19-Epitope	Liposomen
Peptide		
Vasoaktives Intestinales Peptid	Vasoaktives-Intestinales-Peptid: VIP-Rezeptor	Phospholipid-Mizellen, Liposomen
RGD-Peptid	Zelluläre Adhäsionsmoleküle wie Integrine	Polymernanopartikel
Luteinisierendes Hormon / Releasing Hormon	Luteinisierendes Releasing Hormon-Rezeptor	Polymernanopartikel
NGR-Peptid	Aminopeptidase N (CD13)	Liposomen
NGF-Peptid	Tyrosinkinase A (TrkA)-Rezeptor	Quantum dots
Gelatinase Inhibitorisches Peptid CTTHWGFTLC	MMP-2 and MMP-9 Gelatinase	Liposomen, Albumin-Nanopartikel
Aptamere	Proteine, Peptide, Enzyme, Antikörper, verschiedene Rezeptoren der Zelloberfläche und kleine organische Moleküle	Polymernanopartikel

Die durch aktives Targeting erzielte hohe Spezifität der Anreicherung ist vorteilhaft, muss jedoch gegen bestimmte Nachteile abgewogen werden. So verbleibt das Trägersystem unter Umständen hauptsächlich auf der Tumoroberfläche bzw. in der Peripherie, an der Bindungsstelle des Zielmoleküls. Der als *binding site barrier* beschriebene Mechanismus verhindert das Eindringen der Partikel ins Tumorrinnere und mindert dadurch den therapeutischen Effekt [48][49]. Von Barratt et al. wurden diskutiert, dass der voluminöse Antikörper auch eine Diffusion in den Tumor erschwert, zumal der erhöhte hydrostatische Druck im Innern des Tumors zusätzlich dem Trägersystem einen Auswärtsstrom entgegengesetzt [42][50]. Nachteilig ist auch eine mögliche allergische Immunreaktion auf den Antikörper. Weiterhin wurde festgestellt, dass Antikörper auf der Partikeloberfläche zu einer schnelleren Aktivierung des retikulo-endothelialen Systems (RES) und Aufnahme durch Makrophagen führen und somit die Zirkulationszeit verkürzt wird [51]. Neben dem aktiven Liganden sollte daher die Oberfläche auch eine vor Plasmaproteinen schützende Struktur wie eine PEG-Hülle aufweisen. Diese darf jedoch nicht den Liganden in seiner Affinität zum Zielorgan beeinflussen, beispielsweise durch sterische Behinderung. Die Verwendung externer physikalischer Kräfte oder Energien wie Hyperthermie oder Ultraschall am Zielgewebe ist eine weitere Möglichkeit, um aktiv die Anreicherung von Drug Delivery

Systemen zu verbessern [6]. In früheren Studien wurde vor allem der Einfluss der Tenside auf das Verteilungsmuster der Partikel *in vivo* untersucht. Deutlich wurde, dass die Reinheit der Polymere sehr entscheidend für reproduzierbare Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* ist [52]. Wichtig ist auch die Beachtung unterschiedlicher Metabolismen bei Mensch und Tier und damit die Auswahl der Tiermodelle bzw. die Bewertung der Ergebnisse.

2.2.2.3 Aufnahme in die Zelle

Es ist nicht nur erforderlich, den Arzneistoff intakt und in hoher Konzentration zum Zielgewebe zu transportieren, sondern er muss auch im Falle eines intrazellulären Wirkmechanismus in die Zelle gelangen und das entsprechende Zellkompartiment erreichen. Da partikuläre Systeme spezielle Mechanismen bei der Aufnahme in die Zelle nutzen können, kann die ansonsten für viele Arzneistoffe schwer permeable Membran besser überwunden werden [53]. Weiterhin können durch partikuläre Aufnahme in die Zelle Reflux-Transporter wie das P-Glycoprotein (Pgp) umgangen und dementsprechend Arzneistoffresistenzen vermindert werden [11][54][55]. In Abb. 3 sind die verschiedenen Möglichkeiten für eine intrazelluläre Aufnahme partikulärer Systeme dargestellt.

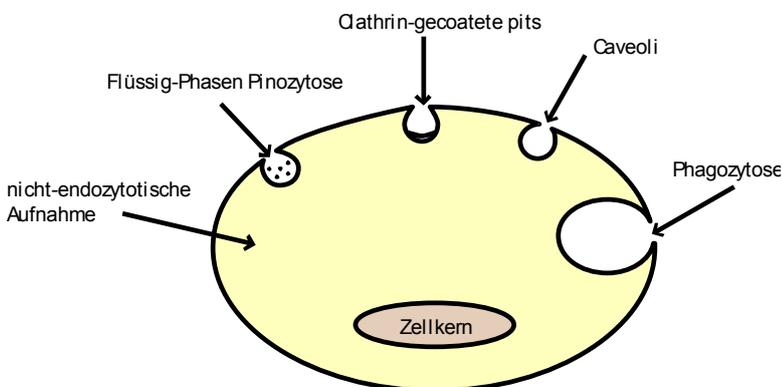


Abb. 3 Aufnahmewege partikulärer Systeme in die Zelle; modifiziert nach [57]

Die Flüssig-Phasen-Pinozytose findet zum Beispiel bei Polymer-Arzneistoff-Konjugaten statt, welche sich im Größenbereich von 1-100 nm bewegen [56]. Für passiv angereicherte nanopartikuläre Systeme (EPR-Effekt) mit einer Größe um 200 nm und auch darunter wird vor allem eine Aufnahme durch Endozytose über *clathrin coated pits* (Clathrin-beschichtete Vertiefungen) diskutiert [6]. Findet dagegen die Aufnahme durch Rezeptorwechselwirkung im Zielgewebe statt, spricht man von einer Internalisierung durch Rezeptor-vermittelte Endozytose [43]. Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Aufnahmeprozess

konzentrations- und zeitabhängig ist und bei höheren Konzentrationen ein Sättigungsverhalten eintritt [57][11]. Partikel mit einem Durchmesser um 500 nm oder darüber werden entweder über *Calveoli* oder Phagozytose in die Zelle aufgenommen [58].

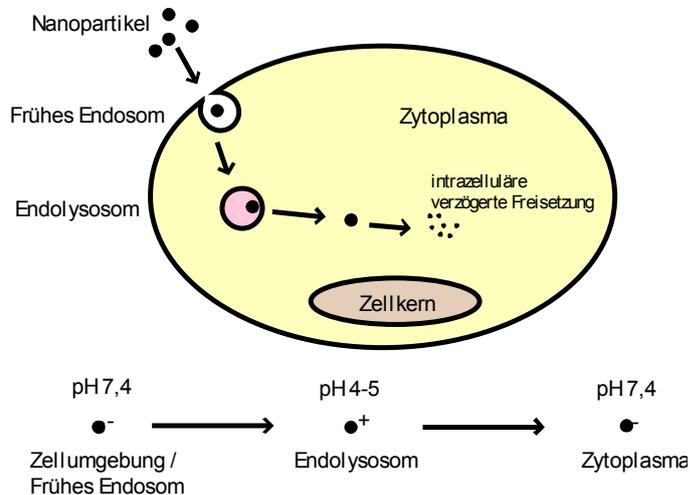


Abb. 4 Internalisierung und Freisetzung der Partikel in der Zelle bei Aufnahme durch nicht-Rezeptor vermittelte Endozytose; modifiziert nach [57]

In Abb. 4 ist die Endozytose-vermittelte Aufnahme und der anschließende Verbleib der Partikel in der Zelle schematisch dargestellt. Die Nanopartikel werden nach Adsorption auf der Zelloberfläche in einer Einstülpung der Zellmembran durch Clathrin-beschichtete Vertiefungen eingeschlossen und bilden frühe Endosomen, welche nach Abschnüren von der Zellmembran in das Zellinnere transportiert werden. Durch die dortige Verschmelzung mit Lysosomen kommt es zur Bildung von Endolysosomen (späte Endosomen), welche sich durch einen deutlich niedrigeren pH-Wert (pH 4-5) und hohe Enzymkonzentrationen auszeichnen [57]. Die pH-Wert-Senkung spielt eine entscheidende Rolle für die Aktivierung lysosomaler Enzyme. Sofern keine Freisetzung der Arzneistoffmoleküle aus dem Endolysosom z.B. durch passive Diffusion möglich ist, werden Partikelmatrix und Wirkstoff durch die lysosomalen Enzyme abgebaut. Nur durch die Freisetzung aus dem Endolysosom wird es dem Wirkstoff überhaupt erst ermöglicht, den erwünschten intrazellulären Mechanismus zu aktivieren. Aus diesem Grund kommt der Freisetzung des Wirkstoffes aus den Endolysosomen eine besondere Bedeutung zu. Folgende Substanzen sind dafür bekannt, dass sie diese Freisetzung beeinflussen oder auslösen können: (i) pH-abhängig lytische Peptide [59], (ii) lysosomotropische Substanzen wie Chloroquin, Primaquin [60] oder (iii) polykationischen Verbindungen.

Für Polykationen beruht eine Hypothese darauf, dass eine physikalische Zersetzung der negativ geladenen Endolysosomenmembran durch Wechselwirkung mit dem kationischen Polymer stattfindet [61]. Alternativ wird als Mechanismus der Protonenschwamm-Effekt insbesondere bei PEI-DNA-Polyplexen (Polyethylenimin-DNA-Polyelektrolytkomplexen) diskutiert (siehe Abb. 5). Nach dieser Theorie können kationische Polyelektrolyte wie PEI den sauren pH-Wert im Endolysosom durch zusätzliche Protonierung stark abpuffern, da bei pH 7,5 nur ca. 11% protoniert vorliegen [62]. Neben der Aufnahme von weiteren Protonen führt der Anstieg des osmotischen Druckes zum Einstrom von Wassermolekülen, wodurch es anschließend zu Osmolyse der Endolysosomen kommt und der Inhalt ins Zytoplasma freigesetzt wird [63].

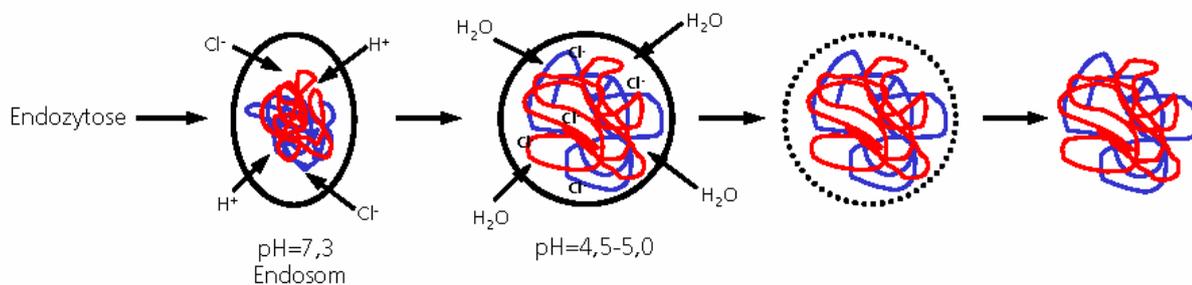


Abb. 5 Protonenschwamm-Hypothese bei PEI-DNA-Polyplexen; modifiziert nach [63]

Von schwachen Basen wie Chloroquin und Primaquin ist bekannt, dass sie biologische Membranen passieren können, jedoch innerhalb der Zelle in Organellen mit saurem Milieu protoniert vorliegen und dadurch wie in einer Ionenfalle das Zellkompartiment nicht verlassen können [64]. In höheren Konzentrationen wird der pH-Gradient durch diese lysosomotropischen Substanzen derart stark beeinflusst, dass die Membran der Endolysosomen geschädigt und somit durchlässig wird [60]. Demzufolge führt die Verwendung bestimmter aminhaltiger Verbindungen als Bestandteil partikulärer Systeme zu einer verbesserten Freisetzung aus den Endolysosomen in das Zytoplasma. Eine optimale endolysosomale Freisetzung wiederum kann zu einer Steigerung des therapeutischen Effektes führen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass hoch kationisch geladene Partikeloberflächen in der Blutzirkulation toxisch wirken, da sie mit negativ geladenen Zellmembranen wie denen der Erythrozyten stark elektrostatisch interagieren [65][66]. Eine anschließende Agglomeration kann durch Verschluss wichtiger Blutgefäße fatale Folgen für den Organismus haben [67].

Die Gültigkeit oder der Nutzen in vitro gewonnener Ergebnisse auf eine Anwendung in vivo erfordert deshalb jeweils eine genaue Prüfung der neuen Rahmenbedingungen.

2.2.3 Sonstige systemische Applikationswege

Alternativ zu den zuvor dargestellten Applikationswegen können mit Nanopartikeln entsprechend den Arzneistoffeigenschaften oder den pathologischen Gegebenheiten beim Patienten auch folgende systemische Applikationswege genutzt werden: (a) subkutan / intramuskulär, (b) bukkal, (c) nasal, (d) pulmonal oder (e) okular. Jeder dieser Wege bietet konkrete Vorteile, wodurch bei optimaler Nutzung eine qualitativ bessere Therapie für den Patienten erzielt werden kann.

a) subkutan (s.c.) / intramuskulär (i.m.)

Eine s.c. oder i.m. Applikation von kolloidalen Arzneistoffträgern ist beispielsweise sinnvoll, wenn die konventionelle orale Therapie zu gastrointestinalen Nebenwirkungen führt oder aufgrund der Arzneistoffeigenschaften eine niedrige Bioverfügbarkeit erreicht wird. Durch die Verwendung eines geeigneten Polymers ist eine gesteuerte, schnelle oder verzögerte Freisetzung möglich, wobei eine systemische Aufnahme über die Blutgefäße oder die Lymphe erfolgen kann [68].

b) bukkal

Die Umgehung des Gastrointestinal-Traktes bei oraler Einnahme ist auch durch den Einsatz von bukkalen nanopartikulären Arzneiformen möglich. Hochpotente schwer wasserlösliche Substanzen können z.B. als Nanosuspensionen (Arzneistoffnanokristalle) über die Mundschleimhaut dem Körper verfügbar gemacht werden. Ebenso wäre eine bukkale Anwendung von Nanopartikeln bei einer Prophylaxe oder Therapie von Pilzinfektionen im Mund- und Rachenraum denkbar. Auch im Hinblick auf eine schnelle systemische Anflutung des Wirkstoffes kann eine solche Formulierung von Vorteil sein. Basis ist die sehr gut durchblutete Mundschleimhaut, über welche kolloidale Systeme aus bioadhäsiven Formulierungen in die systemische Zirkulation überführt werden können [69].

c) nasal

Durch den besonderen Aufbau der Nase können Wirkstoffe mit Hilfe partikulärer Systeme über die *olfaktorische Region* und unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke direkt ins Gehirn gelangen [70]. Zuvor gescheiterte Substanzen könnten zukünftig auf diesem Weg noch als erfolgreiche ZNS-Therapeutika eingesetzt werden [71]. Die Nasenschleimhaut bietet eine ideale geschützte Umgebung, in der mukoadhäsive kolloidale Arzneistoffträger oder Nanosuspensionen haften und anschließend internalisiert werden können. Ist eine Aufnahme in den systemischen Blutkreislauf erfolgt, gelten die gleichen Verteilungsprozesse wie nach parenteraler Applikation. Damit kann auch der First-Pass-Effekt nicht-invasiv umgangen werden. Der Zeitraum der Partikel-*Clearance* von nur 15-20 min sowie hohe Enzymkonzentrationen (u.a. Cytochromoxidasen) sind eine Herausforderung für eine nasale kolloidale Formulierung [71][72].

d) pulmonal

Mit einer inneren Fläche von ca. 75 m² und einem dünnen Alveolarepithel als Barriere zum Körper besitzt die Lunge ein enormes Absorptions- und Resorptionspotential für Arzneistoffe. Dieser Aufnahmeweg ist vor allem für labile Substanzen wie Proteine und Peptide durch Umgehung des First-Pass-Effektes vorteilhaft [73]. Durch die geringe Größe der Nanopartikel sowie geeignete Überzüge kann eine optimale Wirkstoffaufnahme bei minimaler Reizung erfolgen. Insulin gehört zu den Substanzen, bei denen eine pulmonale kolloidale Applikation eine deutliche Verbesserung der Compliance bedeuten würde. Eine Hürde ist jedoch der effektive Transport der kleinen Partikel in die Lunge [74].

e) okular

Eine viel versprechende Behandlung von Augenerkrankungen beruht auf der Nutzung verzögert freisetzender Nanopartikel, welche intravitreal (in den Glaskörper) appliziert werden. Neben der ausreichend hohen Arzneistoffkonzentration nach einmaliger Anwendung konnte auch gezeigt werden, dass eine Lokalisierung der Nanopartikel im retinalen Pigmentepithel stattfindet, wodurch ein besserer therapeutischer Effekt erzielt werden konnte [11][75]. Eine längere Verweildauer der Partikel durch Ausnutzung bioadhäsiver Effekte wurde durch Verwendung von Chitosan und Hyaluronsäure erzielt [76].

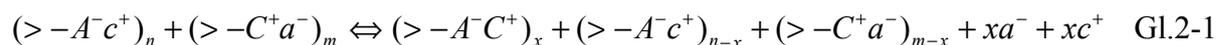
2.3 Kolloidale Arzneistoffträgersysteme

Die im Folgenden beschriebenen Systeme bilden die theoretische Grundlage für den Ergebnisteil dieser Arbeit.

2.3.1 Polyelektrolyt-Komplexe

Die Bildung von Polyelektrolyt-Komplexen erfolgt in der einfachsten Variante aus zwei entgegengesetzt geladenen Verbindungen, die durch Selbstorganisation definierte Aggregate in wässriger Lösung ausbilden. Man unterscheidet zwischen Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen (PEK) und Polyelektrolyt-Tensid-Komplexen (PET) [77]. Für den Prozess der Selbstaggregation durch ionische Wechselwirkungen bzw. Chemisorption wird auch der Ausdruck *ionic self assembly* (ISA) verwendet [78]. Bei der Aggregatbildung aus Polyelektrolyten handelt es sich um einen spontanen und relativ schnellen Prozess, bei welchem je nach den Eigenschaften der Verbindungen und den äußeren Bedingungen strukturell verschiedene Arten von Komplexen gebildet werden können. Diskutiert werden in der Literatur eine „strickleiterartige“ höhergeordnete Struktur vor allem für PETs sowie das „Rührei“ Modell für PEKs [79]. Die bei PETs vorhandene periodische Nanostruktur ist ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal gegenüber PEKs, welche im Festkörperzustand eine amorphe Struktur aufweisen. Treibende Kraft bei der Komplexbildung sind neben elektrostatischen Wechselwirkungen auch hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie entropiesteigernde Effekte bei der Freisetzung niedrigmolekularer Gegenionen. Im Zuge der Aggregatbildung gehen die flexiblen Polymerketten eine räumlich kompaktere Struktur ein, um optimale elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Komplexpartner eingehen zu können. Aufgrund dieser elastischen Polymerverformung findet in der Bilanz ein endothermer Prozess statt.

Die Reaktion der Komplexbildung kann nach Gl.2-1 dargestellt werden [77].



mit: A^- und C^+ geladene Gruppen der Polyelektrolyte, a^- und c^+ Gegenionen der Polyelektrolyte, n und m Anzahl der anionischen und kationischen Gruppen in Lösung, n/m oder $m/n = x$ -molares Mischungsverhältnis, $>-$ schematische Darstellung der Polymerkette

Der Prozess der Komplexbildung ist meist reversibel. Wasserlösliche Polyelektrolyt-Komplexe reagieren sehr sensibel auf Veränderungen in der Umgebung, weshalb sie auch als

„lebende Systeme“ bezeichnet werden. Eine Veränderung der umgebenden Salzkonzentration kann z.B. zu einer Reorganisation der Struktur führen, bis sich das neue thermodynamische Gleichgewicht eingestellt hat. Ladungsschwache Verbindungen mit signifikant geringerem Molekulargewicht können lösliche Komplexe bilden, wenn der starke, hochmolekulare Komplexpartner in deutlichem Ladungsüberschuss eingesetzt wird [80][81]. Die Komplexbildung zweier starker Elektrolyte führt aufgrund der hohen Tendenz zur Aggregation oft zur Ausflockung. Durch eine Herstellung der PEKs in verdünnten Lösungen stoppt der Prozess auf kolloidaler Ebene. Kolloidale PEKs besitzen meist eine sphärische Struktur, die sich durch einen ladungsneutralen Kern auszeichnet. Bei Vorliegen von nicht-stöchiometrischen Ladungsverhältnissen bildet die überschüssige Komponente eine Ladungshülle, welche entscheidend für die elektrostatische Stabilisierung ist. Entsprechend der Struktur des verwendeten Polyelektrolyten kann eine sterisch stabilisierende Komponente durch nicht komplexierte oberflächennahe Polymerketten hinzu kommen. Aufgrund der stabilisierenden Eigenschaften des überschüssigen Komplexpartners ist es häufig nicht notwendig, zusätzlich ein Tensid zu verwenden [77]. Genaue Kenntnis über den Komplexbildungsmechanismus und die Auswirkungen externer Einflüsse machen Polyelektrolytsysteme zu einem interessanten Drug Delivery System, welches z.B. eine Freisetzung unabhängig vom Polymerabbau ermöglicht. Eine viel versprechende Anwendung von PEKs sind DNA-Polyplexe zur nicht-viralen Gentherapie [82], auf welche im Verlauf dieser Arbeit zu Vergleichszwecken näher eingegangen werden wird. Umfassende Untersuchungen wurden z.B. auch zu Polyelektrolyt-Enzym-Komplexen gemacht [83]. Der große Vorteil besteht darin, dass Enzyme ihre biologische Aktivität bei elektrostatischer Komplexbildung im Gegensatz zu einer Bindung durch kovalente Kopplung nicht verlieren [84]. Die Komplexstabilität und damit das Freisetzungsverhalten der Wirkstoffe kann durch die Wahl der verwendeten Polyelektrolyte entscheidend beeinflusst werden. Gegenüber festen Polymernanopartikeln ist die höhere Flexibilität vorteilhaft für das Überwinden biologischer Barrieren mit geringem Größenausschluss (Fenestrierungen von Tumorgewebe, Kernporen etc.)

2.3.2 Polyelektrolyte

2.3.2.1 Polyethylenimin

Polyethylenimin ist ein im Bereich der nicht-viralen Gentherapie für DNA-Polymere (PEK) häufig verwendetes und dementsprechend viel untersuchtes Polykation. Die Herstellung erfolgt meist durch säurekatalysierte Homopolymerisation des Aziridins.

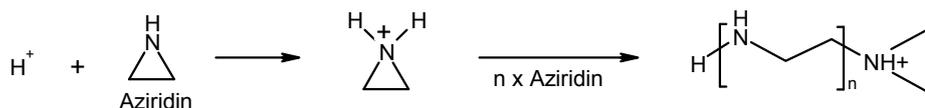


Abb. 6 Synthese von verzweigtem PEI über säurekatalysierte Homopolymerisation von Aziridin

Die hochviskosen Lösungen der Reinsubstanzen lösen sich unter stark alkalischer Reaktion in Wasser. Strukturell zeichnen sich die für die Untersuchungen verwendeten verzweigten PEIs durch eine Aufteilung in primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen in einem Verhältnis 30 – 40 – 30 % aus.

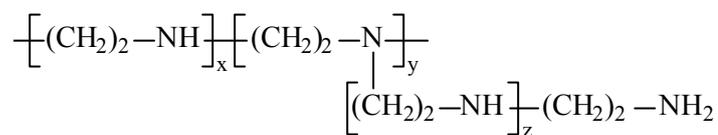


Abb. 7 Allgemeine Strukturformel für verzweigtes Polyethylenimin

Für die Herstellung von Ladungskomplexen ist zu beachten, dass nur ca. 2/3 der theoretisch möglichen PEI-Ladungen in der Lage sind, elektrostatisch zu binden. Ursache ist der hohe Verzweigungsgrad sowie die räumliche Nähe der Aminfunktionen, welche nur eine Protonierung der primären und sekundären Aminogruppen zulassen [170]. Durch die spezielle Anordnung der ladungstragenden Aminfunktionen besitzt PEI die höchste Ladungsdichte unter den bekannten Polykationen. Aufgrund der guten Transfektionsraten von PEI-DNA-Polymere ist es umfassend für eine gentherapeutische Anwendung untersucht worden. Die Transfektion von Zellen erfordert ein erfolgreiches Einschleusen der entsprechenden genetischen Information der DNA in den Zellkern. Mechanistisch genutzt wird die Möglichkeit, das polyanionische Phosphatrückgrat des Plasmides mit dem kationischen Polyelektrolyten zu komplexieren. Die so kondensierte DNA ist vor einem schnellen Abbau in physiologischem Medium geschützt und kann mittels des kationisch geladenen Polyplexes in den Zellkern eingeschleust werden. Entscheidend hierfür ist die endosmolytische Aktivität

von PEI, welche durch Ruptur der Endolysosomenmembran die Freisetzung der Polyplexe in das Zytoplasma bewirkt und dadurch den Transfer der DNA in den Zellkern möglich macht (siehe Kap. 2.2.2.3 Zellaufnahme).

Mit der Entwicklung von Blockcopolymeren aus einem kationischen PEI-Block und einem neutralen Polyethylenglycol-Block konnten bei der Komplexierung von DNA mizellare kolloidale Systeme hergestellt werden. Der PEI-Block bildet in diesen Fall mit der komplexierten DNA den partikulären Kern, wohingegen der PEG-Block diesen nach außen gegen das wässrige Medium abschirmt und sterisch stabilisiert (Kern-Hülle-Modell). Vorteil dieser Systeme ist die deutlich verringerte Toxizität der Partikel in vivo durch eine drastische Minderung der kationischen Oberflächenladungen.

2.3.2.2 Modifizierte Cyclodextrine

Lösungsverbesserung, Stabilitätsverbesserung sowie die Vermeidung von Inkompatibilitäten spielen eine wichtige Rolle bei der Herstellung pharmazeutischer Formulierungen. Eine Substanzklasse die solche Eigenschaften für orale aber auch parenterale Anwendungen erfüllt sind Cyclodextrine (CD) und ihre Derivate.

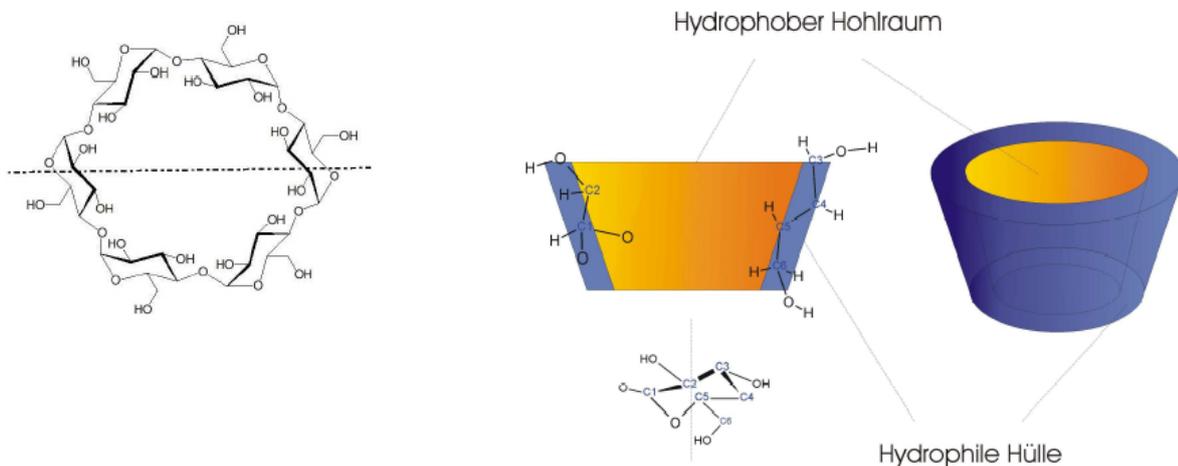


Abb. 8 a) Strukturformel für α -Cyclodextrin; b) Schematische Darstellung der konusförmigen Gesamtstruktur eines Cyclodextrins mit hydrophoben Innenraum und hydrophiler Hülle; aus [85]

Bei Cyclodextrinen handelt es sich um zyklische Oligosaccharide, welche durch enzymatischen Abbau von Stärke mit Hilfe von Glycosyltransferasen gebildet werden. Je nach Anzahl der α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten unterscheidet man α , β und γ -Cyclodextrin mit jeweils 6, 7 oder 8 Untereinheiten. Deren spezielle Ausrichtung zueinander bedingt eine konusförmige Gesamtstruktur, welche einen hydrophoben Innenraum

mit einem Durchmesser zwischen 0,45 nm und 0,9 nm und einer Tiefe von ca. 0,8 nm umschließt [85][86]. Durch die Bildung eines Einschlusskomplexes in dem hydrophoben Innenraum des Cyclodextrins wird eine erhöhte Löslichkeit und eine zum Teil verbesserte chemische und physikalische Stabilität der Substanz erzielt. Das wiederum resultiert in einer schnelleren Auflösungsgeschwindigkeit kombiniert mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit. Beta-Cyclodextrin findet z.B. in oralen Formulierungen Anwendung als Lösungsvermittler, zur Stabilisierung von Vitaminpräparaten oder als Geruchs- und Geschmackskorrigens [87]. Das Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD)-Derivat ist als Hilfsstoff einer Infusionslösung zugelassen (Sempera[®]) [88]. Das Hauptziel beim Einbau von Wirkstoff-Cyclodextrin-Komplexen in klassische Polymernanopartikel war die Überwindung der schlechten Lösungseigenschaften des Arzneistoffes nach parenteraler oder oraler Applikation im physiologischen Medium [89][90].

Zur Herstellung kolloidaler DNA-Trägersysteme wurden kationisch modifizierte Cyclodextrine als alternative Komplexierungspartner entwickelt [91][92]. Anionische aber auch kationisch modifizierte Cyclodextrine sind vor allem aus dem Bereich der chromatographischen Trennung chiraler Substanzen bekannt [93][94]. Unter dem Namen Captisol[®] ist das Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SB β CD) auf dem Markt und besitzt eine Zulassung unter dem Präparatenamen Vfend[®] [88]. Bei diesem Arzneimittel handelt es sich um ein Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, welche i.v. appliziert wird. Unmodifizierte Cyclodextrine sind nicht für eine parenterale Applikation zugelassen. Grund ist vor allem die Nephrotoxizität, basierend auf einer ungenügenden Löslichkeit bei renaler Elimination. Die hydrophileren Derivate wie das HP β CD und das SBE β CD werden zwar auch renal eliminiert, sind aber toxikologisch nur dann bedenklich, wenn eine Nierenfunktionsstörung beim Patienten vorliegt und es dadurch zu einer Kumulation kommt [95].

Nach dem derzeitigen Stand der Technik ist eine nanopartikeläre Formulierung mit einem anionisch modifizierten β -Cyclodextrin, wie sie in Kap. 4.2.1 beschrieben wird, nicht bekannt.

2.3.3 Feste Polymernanopartikel aus Polyalkylcyanoacrylaten

Polyalkylcyanoacrylate (PACA) werden bereits seit den 60er Jahren im medizinischen Bereich eingesetzt. Aufgrund exzellenter adhäsiver Eigenschaften in polarer Umgebung können sie mit lebendem Gewebe und der Haut stabile Bindungen ausbilden, weshalb sie zur Verschließung von Hautwunden [96], als Gewebshaftmittel sowie als chirurgischer Kleber [97] verwendet werden. Der schnelle Abbau von Polymethylcyanoacrylaten (PMCA) in vivo verursachte Entzündungsreaktionen und Gewebsschäden [98], weshalb die PMCAs durch länger-kettige Polyalkylcyanoacrylate (Alkylreste meist C4 bis C8) ersetzt wurden. Auf dem Markt befindliche Produkte zur Wundheilung sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4 Alkylcyanoacrylate in biomedizinischen Produkten; zusammengestellt nach [99]

Produkt	Hersteller	Alkylcyanoacrylat
Indermil [®]	Tyco	N-Butylcyanoacrylat
LiquiBand [®]	Advanced Medical Solutions plc	N-Butylcyanoacrylat
Trufill [®] n-BCA	Johnson & Johnson comp.	N-Butylcyanoacrylat
Dermabond [®]	Ethicon / Johnson & Johnson comp.	Octylcyanoacrylat

Im Bereich kolloidaler Trägersysteme, insbesondere für eine gezielte Krebstherapie, wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Systeme entwickelt, bei denen der Wirkstoff entweder in den PACA-Partikeln verkapselt oder auch adsorptiv auf der Oberfläche gebunden wurde [100]. Die Familie der PACA-Nanopartikel wird unterteilt in die klassischen Gruppen Nanosphären, Nanokapseln, sowie die entsprechenden Kern-Hülle-Partikel (siehe Abb. 9) [99].

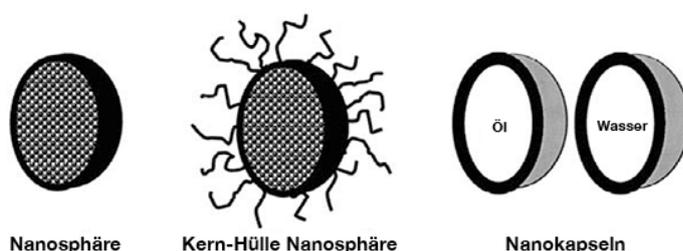


Abb. 9 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Typen von PACA-Partikeln; modifiziert nach [99]

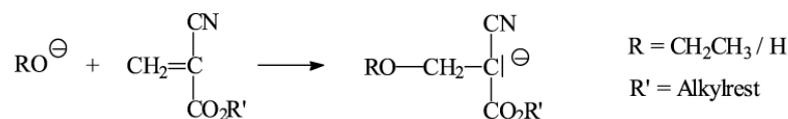
Bereits 1979 wurde eine Methode zur Synthese von Nanosphären aus Polyalkylcyanoacrylaten von Couvreur entwickelt [101]. Neben der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten anionischen Polymerisation können PACAs auch über eine zwitterionische oder

eine radikalische Polymerisation hergestellt werden [99]. Nanokapseln mit Öl oder Wasser gefülltem Innenraum können über Grenzflächenpolymerisation hergestellt werden [102], wohingegen Nanosphären meist durch ionische Polymerisation gewonnen werden. Ausgehend von Blockcopolymeren, bestehend aus PACA und z.B. einem hydrophilen PEG-Block, kommt es aufgrund des amphiphilen Charakters dieser Polymere zur Selbstaggregation. Die entstehenden Kern-Hülle-Partikel sind in der Herstellung vorteilhaft, da der Prozess der Partikelbildung mit einem definierten und charakterisierten Polymer stattfindet [99]. Der Abbau von PACA-Partikeln erfolgt über Esterasen [103][104]. In vitro konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess mit Esterasen aus Serum, Lysosomen und Pankreasflüssigkeit aktiviert werden kann [105]. Die Abspaltung der als Ester gebundenen Alkylreste führt dazu, dass das Polymergerüst an der Oberfläche hydrophiler wird und sich oberflächennahe Polymerketten vom Kernpartikel lösen können [106]. Man spricht deshalb auch von einem Abbau der Oberfläche durch diffusionskontrollierte Erosion. Die wasserlöslichen Abbauprodukte aus Alkylalkohol und Polyacrylsäure werden in vivo renal eliminiert [99].

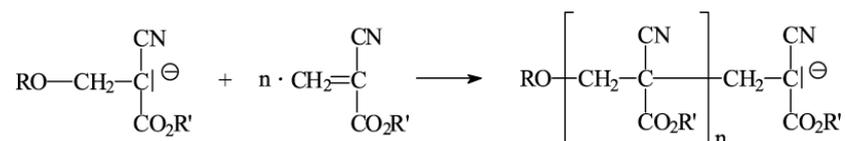
2.3.3.1 Anionische Polymerisation

Dieses Verfahren zur Herstellung von PACA-Partikeln beruht auf einer anionischen Polymerisation im wässrigen Medium. Mechanistisch ist die Polymerisation durch folgendes Reaktionsschema darstellbar [107]:

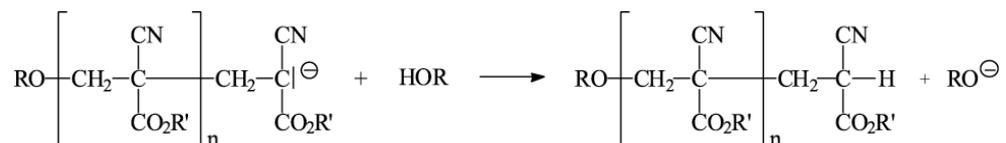
Startreaktion:



Kettenwachstum:



Übertragungsreaktion:



Kettenabbruch:

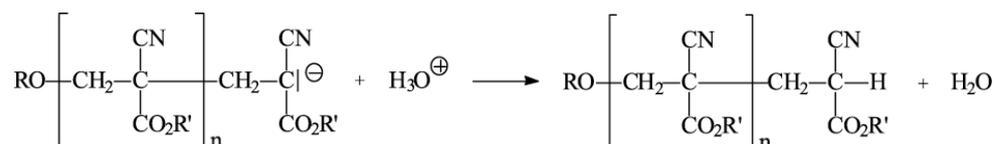


Abb. 10 Reaktionsschema für die anionische Polymerisation von Alkylcyanoacrylat

Das Monomer ist eine hochreaktive, klare sowie farblose Flüssigkeit von niedriger Viskosität. Für die Polymerisation wird das Monomer in eine wässrige, meist saure Tensidlösung emulgiert. Die Reaktion wird spontan durch Hydroxid-Ionen aus der Autoprotolyse des Wassers gestartet. Die Größe der entstehenden Sphären ist abhängig von verschiedenen Parametern wie Monomerkonzentration, Tensidgehalt, Rührgeschwindigkeit oder auch der Temperatur [99]. Durch Veränderung des pH-Wertes und der Tensidkonzentration kann der Durchmesser der PBCA-Nanopartikel bis auf 30 nm reduziert werden [108]. Es muss bei dieser Methode beachtet werden, dass eine Reihe von Substanzen selbst als Initiator der Polymerisation fungieren können. Häufig ist dies mit einem Verlust der biologischen Aktivität verbunden [109]. Dieser Effekt der Co-Polymerisation konnte aber auch vorteilhaft für die kovalente Kopplung von PEG-Molekülen an das polymerisierende PACA genutzt werden, wodurch die Herstellung oberflächenmodifizierter Partikel möglich wurde (Kern-Hülle Modell) [110].

2.3.3.2 Nanopräzipitation / SESD-Verfahren

In der Literatur wird diese Technik auch als Kondensations- und Fällungsverfahren aus hydrophiler Lösung bezeichnet [111].

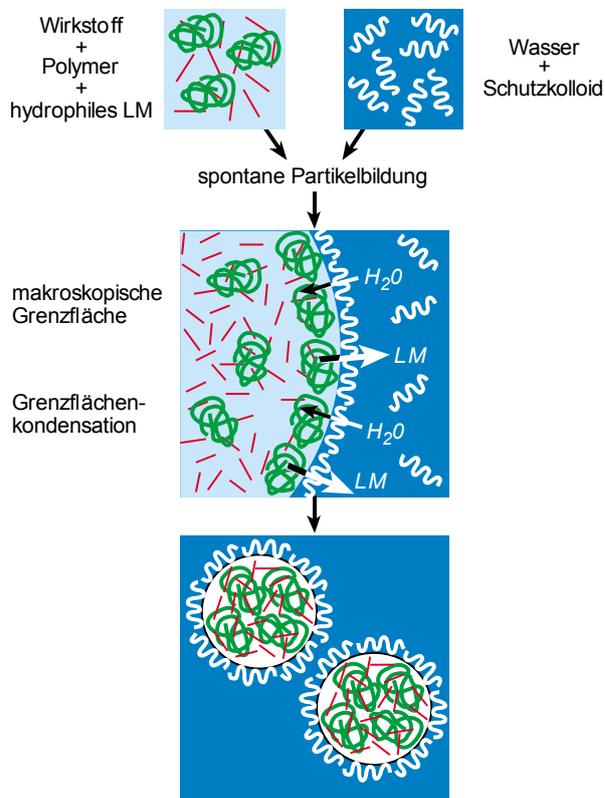


Abb. 11 Nanopräzipitation: Prinzip der Herstellung von Wirkstoff/ Pseudolatex-Nanopartikeln durch Grenzflächenkondensation; aus [111]

Es handelt sich aufgrund der Verwendung wassermischbarer Lösungsmittel um ein modifiziertes *SESD*-Verfahren (*Spontaneous Emulsification Solvent Diffusion*). Auch der Begriff *Solvent Displacement* wird in diesem Zusammenhang häufig verwendet. Die Partikelbildung ist schematisch in Abb. 11 dargestellt.

Bei dieser Methode wird das organische Lösungsmittel schlagartig dem Polymer entzogen, wenn die polymerhaltige organische Lösung in ein deutlich größeres Volumen einer wässrigen Lösung gegeben wird. Bedingung dafür ist die unbegrenzte Mischbarkeit des Lösungsmittels mit Wasser (z.B. Aceton, Ethanol) sowie die Unlöslichkeit des Polymers in der wässrigen Phase [112]. Die spontane Bildung einer nanopartikulären Pseudolatexdispersion wird erklärt durch Grenzflächenturbulenzen, welche aufgrund von Lösungsmitteldiffusion ausgelöst werden [113]. Ursache der Turbulenzen ist der Gradient zwischen den Oberflächenspannungen an der Grenzfläche von organischer Phase und

wässriger Phase. Solche Turbulenzen verursachenden Strömungen entlang eines Gradienten der Oberflächenspannung werden als *Marangoni*-Effekt bezeichnet. Dabei wird eine Strömungsrichtung zu Orten höherer Oberflächenspannung beobachtet [114]. Die Krafteinwirkung dieser Turbulenzen leitet die Fragmentierung zu nanodimensionierten Lösungskompartimenten ein. Infolge der Diffusion kommt es zu einer fortschreitenden Verarmung an Lösungsmittel, wodurch Polymer und Wirkstoff gemeinsam ausgefällt werden. Für diese Methode wurde deshalb auch der Begriff Nanopräzipitation geprägt. In diesen Fällungsprozess gehen u.a. auch Parameter wie externer Energieeintrag (Rührgeschwindigkeit, Temperatur), Viskosität der Lösungen, Gefäß und Ansatzgröße sowie der Polymer- und Tensidgehalt ein. Letzterer bestimmt entscheidend, inwieweit es neben der Nukleierung neuer Partikel auch zum Wachstum der bereits gebildeten Populationen kommt. Der Zusatz eines geeigneten Tensids gewährleistet somit eine entsprechende Stabilität der präzipitierenden Partikel [111]. Durch den vollständigen Abzug des Lösungsmittels kann der Partikelkern aushärten und erhält seine feste Polymerstruktur. Die hohe Geschwindigkeit des Fällungsprozesses des Polymers macht es möglich, weitere in der organischen Phase gelöste Substanzen zu verkapseln. Ideal ist es, wenn für die zu verkapselnden Substanzen das gleiche Lösungsmittel verwendet werden kann wie für das Polymer.

2.4 Kolloidstabilität und Oberflächenmodifikation

Für die Kolloidstabilität sind eine Reihe zwischenmolekularer Wechselwirkungen von Bedeutung. Auch eine elektrostatische Oberflächenmodifikation, wie sie für diese Arbeit angewendet und untersucht wurde, beeinflusst das Zusammenspiel solcher Kräfte entscheidend. Die folgenden Ausführungen sollen deshalb einen Einblick zu einigen zwischenmolekularen Wechselwirkungen geben.

2.4.1 Zwischenmolekulare Wechselwirkungen

Zwischenmolekulare Wechselwirkungen besitzen trotz ihrer deutlich geringeren Bindungsenergien (10-30 kJ/mol) im Vergleich zu kovalenten Bindungen (200-500 kJ/mol) einen großen Stellenwert sowohl in biologischen, als auch chemischen-technischen Systemen. Zu dieser Gruppe werden gezählt: (i) elektrostatische Wechselwirkungen, (ii)

Wasserstoffbrückenbindungen, (iii) van der Waals-Kräfte und (iv) hydrophobe Wechselwirkungen.

2.4.1.1 Elektrostatische Wechselwirkungen / Ionenbindung

Zwischen entgegengesetzt geladenen Verbindungen findet eine Anziehung mit definierter Bindungsenergie statt. Diese bei der elektrostatischen Wechselwirkung auftretende Energie kann nach dem *Coulomb'schen* Gesetz wie folgt beschrieben werden:

$$E_{Coul} = \frac{q^+ \cdot q^-}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot r} \quad \text{Gl.2-4}$$

mit: q^+ und q^- die Ladungen der Verbindungen, r der Abstand der Ladungen, ϵ_0 die elektrische Feldkonstante, ϵ_r die relative Dielektrizitätskonstante des Mediums

Entsprechend der hohen relativen Dielektrizitätskonstante von Wasser ($\epsilon_r=78,5$ bei 298 Kelvin) beträgt die Bindungsenergie in Wasser zwischen 10-30 kJ/mol.

2.4.1.2 Wasserstoffbrückenbindungen

Es handelt sich um Dipol-Dipol-Wechselwirkungen über ein Wasserstoffatom, welches durch kovalente Bindung an ein stark elektronegatives Element (v.a. N, O, F und Halogene) eine positive Partialladung besitzt. Diese interagiert mit einem weiteren elektronegativen Element, welches durch seine negative Partialladung bzw. ein freies Elektronenpaar als Protonenakzeptor fungiert und wodurch es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung kommt. Ein solches System kann als $[RX-H \cdots YR']$ formuliert werden, wobei die punktierte Linie die Wasserstoffbrücke symbolisiert. Im Gegensatz zu anderen zwischenmolekularen Wechselwirkungen besitzt die Wasserstoffbrückenbindung eine Vorzugsrichtung. Es findet meist eine lineare Ausrichtung statt, da in diesem Fall die Bindungskräfte am stärksten sind. Die Bindungsenergie pro Wasserstoffbrücke wird mit 10-30 kJ/mol angegeben. In Form von intramolekularen Wasserstoffbrücken spielen sie beispielsweise eine wichtige Rolle für die elastischen Eigenschaften von PEG-Ketten und deren sterischer Stabilisierung auf der Oberfläche kolloidaler Trägersysteme. Biologisch bedeutend sind sie z.B. für die Basenpaarungen von DNA oder die Sekundärstruktur von Proteinen.

2.4.1.3 Van der Waals-Kräfte

Van der Waals-Kräfte (auch London-Kräfte) sind sehr schwache Bindungskräfte, welche bei Abständen von atomarer Größenordnung zwischen Atomen und Molekülen auftreten. Durch Fluktuationen der Elektronenverteilungen kommt es zu Ladungsverschiebungen und damit zur Ausbildung temporärer Dipole. Diese wiederum erzeugen eine ähnliche unsymmetrische Ladungsverteilung bei benachbarten Atomen, d.h. ein Dipolmoment wird induziert. Zwischen temporärem und induziertem Dipol kommt es zu einer anziehenden Wechselwirkung E_{vdW} , deren Stärke von der Polarisierbarkeit a und dem Abstand r der wechselwirkenden Atome abhängt.

$$E_{vdW} = \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{r^6} \quad \text{Gl.2-5}$$

mit: E_{vdW} van der Waals-Energie, a Polarisierbarkeit, r Abstand der Atome

Die Anziehungskräfte nehmen bei Annäherung stark zu bis es zu einer Überlappung der Elektronenwolken und damit zur Abstoßung kommt (Pauli-Prinzip). Eine Vielzahl solcher zwischenmolekularen Wechselwirkungen wie z.B. in gepackten Kohlenstoffketten kann in der Summe ebenso zu entsprechend starken Bindungskräften führen.

2.4.1.4 Hydrophobe Wechselwirkungen

Diese Wechselwirkungen beruhen auf der Tendenz hydrophober Moleküle oder Molekülbereiche, sich in polarem Medium wie z.B. Wasser zusammenzulagern. Treibende Kraft ist die Entropie des polaren Mediums. Da keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und unpolaren Molekülen ausgebildet werden können, orientieren sich die angrenzenden polaren Wassermoleküle in maximaler Anzahl um das unpolare Molekül, wodurch sie stärker geordnet und in ihrer Bewegung eingeschränkt sind. Die Abnahme der Entropie ist jedoch kein energetisch begünstigter Prozess, weshalb es zur Selbstaggregation der unpolaren Moleküle kommt. Durch die Minimierung der hydrophoben Oberfläche wird automatisch die Anzahl der geordneten polaren Moleküle im Medium reduziert, resultierend in einem Entropiegewinn. Der hydrophobe Effekt ist demzufolge auf die starken Wechselwirkungen der Wassermoleküle untereinander und bevorzugte entropische Prozesse zurückzuführen.

Hydrophobe Wechselwirkungen sind z.B. maßgeblich an der Bildung von Polymermizellen aus amphiphilen Substanzen oder Blockcopolymeren beteiligt. Oberhalb einer bestimmten Konzentration, der so genannten kritischen Mizellbildungskonzentration CMC , werden aus Monomeren molekulare Aggregate gebildet. Die CMC ist umso niedriger, je höher der hydrophobe Anteil des amphiphilen Moleküls ist.

2.4.2 Kolloidstabilität

Eine Theorie zur Stabilisierung von kolloidalen Teilchen durch elektrostatische Aufladung wird nach ihren Begründern kurz DLVO-Theorie (Derjaguin, Landau (1941), Verwey, Overbeek (1948)) genannt. Sie betrachtet die unterschiedlichen anziehenden und abstoßenden Wechselwirkungsenergien, welche in der Gesamtbilanz eine Aussage geben können, ob die kolloidale Dispersion stabil ist oder es zur Agglomeration kommt. Entscheidend für die Gesamtwechselwirkungsenergie V_T ist die Betrachtung in Abhängigkeit vom Teilchenabstand H . Um abstoßende Energien bei Teilchenannäherung zu überwinden, muss Energie aufgewendet werden. Diese wird deshalb mit einem positiven Vorzeichen versehen, wohingegen anziehende Kräfte durch energetischen Gewinn als negativ bilanziert sind. Nähern sich zwei kugelförmige Kolloidteilchen mit definiertem Oberflächenpotential einander, so wird eine elektrostatische Abstoßungsenergie V_R wirksam, welche über größere Distanzen dominierend ist. Je höher der Betrag des Oberflächenpotentials ist, desto dicker ist die diffuse Schicht der Teilchen und desto stärker sind die repulsiven Kräfte bei Überlagerung dieser diffusen Schichten. Bei deutlicher Verringerung des Teilchenabstandes kommen anziehende van der Waals-Kräfte V_A zum Tragen. Kommt es durch Überlagerung von Elektronenhüllen zu einer Annäherung bis auf atomaren Abstand (ca. 0,4 nm), geht eine weitere Komponente, die *Born'sche* Abstoßungskraft, in die Bilanz mit ein. In Abb. 12 sind die einzelnen Energiekurven graphisch dargestellt.

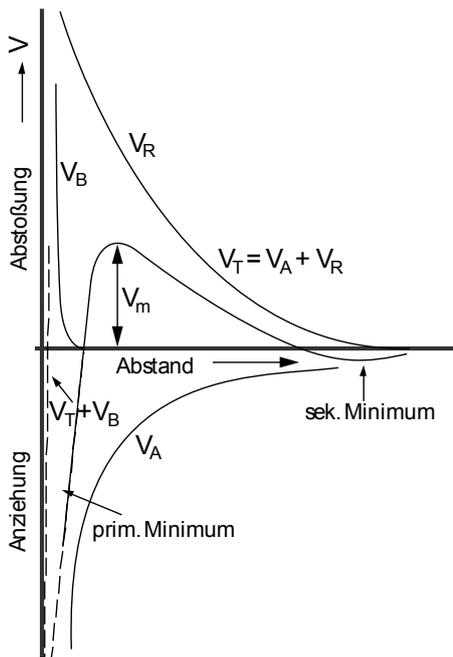


Abb. 12 Elektrostatische Wechselwirkungsenergien nach [115]; mit: V_T Gesamtwirkungsenergiekurve, V_R elektrostatische Abstoßung, V_B Born'sche Abstoßung; V_A van der Waals-Anziehung

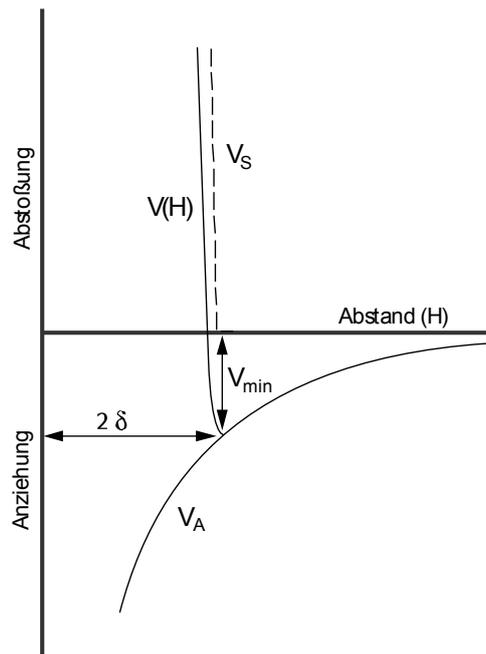


Abb. 13 Sterische Wechselwirkungsenergien nach [116]; mit: $V(H)$ ($=V_T$) Gesamtwirkungsenergiekurve, V_S sterische Stabilisierung, V_A van der Waals-Anziehung, δ Schichtdicke der makromolekularen Hülle, Grafik ohne Born'sche Abstoßung

Die Gesamtwirkungsenergiekurve lässt sich nach [115] darstellen als:

$$V_T = V_R + V_B + V_A \quad \text{Gl.2-6}$$

mit: V_T Gesamtwirkungsenergiekurve, V_R elektrostatische Abstoßung, V_B Born'sche Abstoßung; V_A van der Waals-Anziehung

Ausreichend stabilisierte Dispersionen bilden in der Gesamtwirkungsenergiekurve ein entsprechend hohes Maximum V_m , das nur durch Aufbringen einer bestimmten Aktivierungsenergie E_{akt} überwunden werden kann. Agglomeration tritt demzufolge ein, wenn aufgrund einer zu geringen Höhe von V_m oder einer ausreichend hohen Aktivierungsenergie E_{akt} die Energiebarriere V_m bei einem Abstand H überwunden wird.

Zur Beschreibung der Gesamtwechselwirkungsenergiekurve für die sterische Stabilisierung von Partikeldispersionen kann Gleichung Gl.2-7 herangezogen werden:

$$V_T = V_S + V_B + V_A \quad \text{Gl.2-7}$$

mit: V_T Gesamtwechselwirkungskurve, V_S sterische Wechselwirkungsenergie, V_B Born'sche Abstoßung, V_A van der Waals-Anziehung

Das Prinzip der sterischen Stabilisierung lässt sich nach Evans et al. folgendermaßen erklären [116]: Bei der Annäherung zweier Teilchen, welche auf ihrer Oberfläche eine makromolekulare Schicht der Dicke δ besitzen und einen Abstand H zueinander aufweisen, kann es in Abhängigkeit von diesem Abstand zu sterischen Wechselwirkungen kommen (siehe Abb. 13). Für den Fall das $H > 2\delta$ ist, treten nur geringfügige oder gar keine Wechselwirkungen zwischen den Hüllen der Teilchen auf, d.h. eine Agglomeration der Teilchen ist nicht zu erwarten. In dem Bereich $\delta < H < 2\delta$ führt die partielle Verzahnung der makromolekularen Hüllen zu einer Erhöhung des osmotischen Druckes in diesem Bereich, wodurch es zu repulsiven Kräften zwischen den Teilchen kommt und somit eine Agglomeration meist unterbunden wird. Wenn dagegen $H < \delta$ ist, können die Makromoleküle der Hülle ineinander dringen, wobei sie gleichzeitig komprimiert werden. Weiterhin verursacht dies einen Verlust der Konformationsentropie der Makromoleküle und infolge einer unzureichenden Abstoßung der Hüllen können die Teilchen agglomerieren (siehe Abb. 13).

2.4.3 Oberflächenmodifikation

Für nanopartikuläre Systeme gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, oberflächenmodifizierte Partikel herzustellen [118]. Die verschiedenen Arten der Modifikation können unterteilt werden in: (i) Adsorption auf den Partikeln, (ii) Einschluss während der Partikelherstellung (Nanopräzipitation), (iii) Co-Polymerisation während der Partikelherstellung, (iv) Synthese amphiphiler Copolymere vor Partikelherstellung / Herstellung durch Selbstaggregation und (v) kovalente Kopplung aktiver Liganden. Die auf Adsorption basierende Modifikation kann noch einmal unterschieden werden in Adsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen und Adsorption durch elektrostatische Wechselwirkungen. Für die unterschiedlichen Modifikationsarten werden anhand der folgenden Beispiele potentieller Nutzen und mögliche Anwendungen verdeutlicht.

Mit Hilfe von hydrophoben Wechselwirkungen werden beispielsweise Di- oder Triblockcopolymere auf Partikeloberflächen aufgebracht. Der hydrophobe Block interagiert dabei mit der hydrophoben Partikeloberfläche, wohingegen sich die hydrophilen Blöcke zum umgebenden wässrigen Medium ausrichten (siehe hydrophobe Wechselwirkungen Kap. 2.4.1.4). Wie bereits in Kap. 2.2.2.1 erläutert wurde, führen vor allem pegylierte Oberflächen zu einer verlängerten Zirkulationszeit der Partikel im Blut und damit zu einer verbesserten Anreicherung über den EPR-Effekt. Elektrostatische Wechselwirkungen werden z.B. zur Adsorption von instabilen Wirkstoffen auf der Partikeloberfläche verwendet, welche dadurch vor dem Abbau durch lytische Enzyme geschützt sind und dementsprechend einen höheren therapeutischen Effekt erzielen können. Yang et al. copolymerisierte Chitosan während der Herstellung von PACA-Nanopartikeln, wodurch die Partikel eine kationische Chitosanoberfläche aufwies [119]. Die Synthese amphiphiler Blockcopolymere wie PEG-HDCA oder Dextran-PCL ermöglicht die Herstellung von Kern-Hülle-Partikeln, deren Oberflächeneigenschaften durch den hydrophilen Block bestimmt werden.

2.5 Detektion *in vitro* und *in vivo*

Für eine Detektion nanopartikulärer Systeme *in vitro* oder *in vivo* stehen verschiedene Techniken zu Verfügung. Dazu zählen u.a. Verfahren wie CT (Computertomographie), PET (Positronen-Emissions-Tomographie), SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), MRT (Magnetresonanztomographie), Ultraschall und fluoreszenzbasierte Verfahren wie FMT (Fluorescence Mediated Tomography) [120]. Bildgebungsverfahren wie diese erlangen zunehmende Bedeutung bei der Diagnose von Krankheiten, der Therapieplanung sowie als chirurgisches Hilfsmittel während der Operation. Auch klinische Studien werden verstärkt von der objektiven Darstellung durch bildgebende Daten abhängen, welche Aufschluss über den therapeutischen Erfolg geben können [121]. Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme haben großes Potential im Bereich der Diagnose und Therapie. In Kombination mit den genannten Detektionsverfahren stellen sie ein wichtiges Hilfsmittel zur Identifizierung und Etablierung neuer medizinischer Strategien dar.

2.5.1 Fluoreszenzbasierte Detektion

2.5.1.1 Prinzip der Fluoreszenz

Durch Absorption von Photonen aus einer geeigneten Lichtquelle erfolgt eine Anregung des Fluorophors aus dem Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_1 ($v = 0, 1, 2$ usw.). Bei der Rückkehr in den energetischen Grundzustand S_0 kommt es neben Schwingungsrelaxation zur Emission von Licht in Form von Fluoreszenz. Durch verschiedene Umwandlungsprozesse ist die emittierte Fluoreszenzstrahlung gegenüber dem Absorptionsspektrum bathochrom verschoben (*Stokes'sche Regel*). Die mittlere Zeitspanne des angeregten Singulettzustands liegt im Bereich von Nanosekunden, d.h. Fluoreszenz besitzt eine kurze Lebensdauer und tritt zeitgleich mit der Anregung auf (siehe Abb. 14).

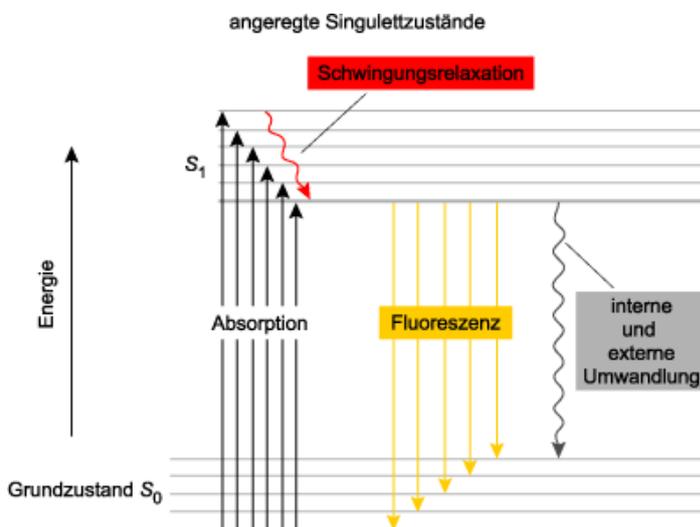


Abb. 14 vereinfachtes Jablónski-Energieniveauschema für Fluoreszenzstrahlung; nach [123]

Während sich der Fluorophor in dem angeregten Zustand befindet (10^{-7} bis 10^{-9} s), kann er seine Lage im Raum ändern oder mit der Umgebung wechselwirken. Das emittierte Licht hängt demzufolge stark von der Umgebung und den dynamischen Eigenschaften des Fluorophors in dieser Zeitspanne ab. Befinden sich zum Beispiel zwei Fluorophore sehr dicht beieinander, so wird die Energie beispielsweise durch einen Stoß auf den benachbarten Fluorophor übertragen. In diesem Falle unterbleibt die Emission von Licht und man spricht vom *Quenching* der Fluoreszenz. Kurzfristig geht der Fluorophor X^* einen Stoßkomplex mit dem Quenchpartner Q ein (Gl.2-8).



Für $Q=X$ wird der Komplex Excimer, für $Q\neq X$ Exciplex genannt. Dieser Komplex besitzt andere Energieniveaus als der Fluorophor X und sendet deshalb Fluoreszenz mit veränderter Frequenz aus:



Der Komplex kann seine Energie auch strahlungslos abgeben, wodurch die Fluoreszenz unterdrückt, also gequenchet wird:



Damit es innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer zur Bildung eines Stoßkomplexes kommt, müssen die Fluorophore sich in entsprechend geringem Abstand befinden. Dieser kann zum einen durch hohe räumliche Nähe entstehen, wenn der Fluorophor kovalent gebunden oder in eine feste Matrix integriert ist und dadurch keiner freien Diffusion unterliegt. Weitere Möglichkeit ist eine hohe Konzentration des Fluorophors oder seines Quenchers in Lösung. Auch in diesem Fall wird die Diffusion behindert, infolgedessen es zum Quenching kommt [124].

2.5.1.2 Zellmikroskopische Untersuchungen

Die Kenntnis über die Aufnahme kolloidaler Trägersysteme in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen ist von zentraler Bedeutung für ihre Anwendbarkeit in vivo als auch in vitro (siehe Kap. 2.2.2.3). Besonders die Interaktion zwischen Zelloberfläche und Material des kolloidalen Systems, die anschließende Aufnahme und der Abbau in den einzelnen Zellkompartimenten sind entscheidend für die Effizienz als Diagnostikum oder Therapeutikum [125]. Fluoreszenzmikroskopische Zelluntersuchungen bieten ideale Möglichkeiten, durch Nutzung verschiedener Fluorophore zwischen Zellkompartimenten und Orten der Partikelanreicherung zu differenzieren und über Quantifizierung der Fluoreszenz funktionalisierte Partikeloberflächen nach Effizienz zu klassifizieren. Fluoreszenzfarbstoffe im Wellenlängenbereich von 400-600 nm zeichnen sich meist durch geringere Ausbleicheffekte aus, weshalb sie für zellmikroskopische Untersuchungen bevorzugt werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturuntersuchungen wurden HeLa-Zellen verwendet. Diese Zelllinie wurde 1951 vom Epithel eines Zervix-Karzinoms einer 31 Jahre alten Frau generiert und stellt die erste aneuploide, kontinuierlich kultivierte humane

Zelllinie dar [126][127]. Es handelt sich in Kultur um adhärenzte Zellen mit hoher Teilungsrate, welche durch die Ausbildung einer einschichtigen Zellschicht (*Monolayer*) eine gute Basis für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bilden.

2.5.2 Optical Imaging / Nahinfrarot-Fluoreszenz

Optical Imaging stellt einen relativ neuen Ansatz in der Diagnostik dar und beruht auf der Nutzung von Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenz. Farbstoffe mit einem Absorptions- und Emissionsspektrum im NIR-Bereich zwischen 650-900 nm werden für diese Methode verwendet. Die Besonderheit liegt darin, dass das Gewebe innerhalb dieses Wellenlängenbereiches, der auch als optisches Fenster bezeichnet wird, die geringste Eigenabsorption durch physiologische Komponenten wie Hämoglobin (Hb), Oxyhämoglobin (HbO₂) und Wasser besitzt [120][128]. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 15 graphisch dargestellt [129].

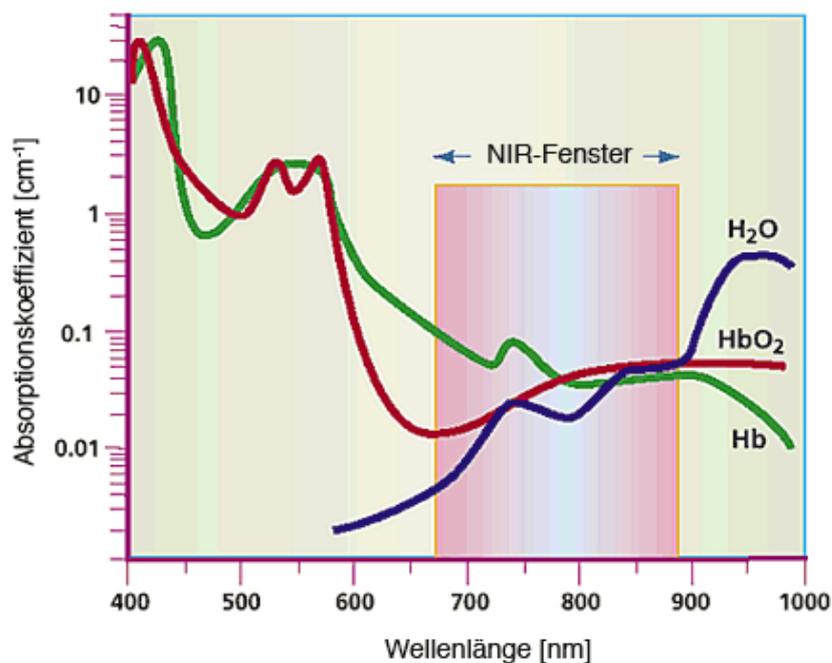


Abb. 15 Optisches bzw. NIR-Fenster; modifiziert nach [129]

Nach Anregung des Fluorophors kann mit Hilfe spezieller CCD-Kameras ein gegen das Gewebssignal positives Fluoreszenzsignal detektiert werden, sofern eine spezifische Verteilung des Farbstoffes stattgefunden hat. Bildgebung im NIR-Bereich besitzt zusätzlich den Vorteil, dass die minimale Autofluoreszenz des Gewebes ein gutes Signal-Rauschverhältnis bewirkt und dadurch ein besserer Kontrast erzielt wird [130][131]. Vorteile dieses Verfahrens sind: (i) arbeitet ohne ionisierende Strahlung, (ii) einfach handhabbare und

schnelle Methode, (iii) mehrfach und zu jeder Zeit durchführbar im Vergleich zur Diagnostik mit Radioisotopen, (iv) geringer apparativer Aufwand, (v) preiswert im Vergleich zu Verfahren wie MRT [128][120]. Der Aspekt der Unbedenklichkeit durch die Vermeidung von ionisierender Strahlung spielt vor allem in der Tumorfürhdiagnostik eine wichtige Rolle. Im medizinischen Bereich ist deshalb ein breiter Einsatz dieses Verfahrens vorstellbar. Zur Anwendung kommt Optical Imaging derzeit hauptsächlich in der Gehirndiagnostik, bei der Detektion von Brustkrebs sowie bei der Muskeldarstellung zu physiologischen Überwachungszwecken [132]. Limitiert ist dieses Verfahren durch die geringe Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe, welche derzeit mit 10 bis 15 cm angegeben wird [128][133]. Grund ist, dass neben der Emission von Fluoreszenz das Licht auch mit dem Gewebe interagiert, wodurch es zur beschriebenen Absorption aber auch zu Streueffekten kommt [128]. Durch sensitivere Apparaturen und neue Techniken wie der Verwendung von gepulstem Licht und verbesserten Farbstoffen sind hier noch Möglichkeiten einer Optimierung gegeben [134].

Eine Alternative zur Überwindung dieser Hürde stellt derzeit die Verwendung von multimodalen Nanopartikeln dar. Partikel mit einem Eisenoxidkern können mittels MRT präoperativ in hoher Auflösung gut im Tumorgewebe detektiert werden. Ein mit dem Eisenpartikel kombinierter NIR-Fluorophor kann dann intraoperativ durch Fluoreszenzkontraste dem Chirurgen lokale Informationen über die Ausbreitung des Tumorgewebes geben, um dieses vollständig entfernen zu können [120][135][136]. Medarova et al. verwendeten multimodale Nanopartikel in vivo, um zum einen den Tumor zu detektieren und zum anderen um den therapeutischen Effekt der Chemotherapie zu überwachen [137]. Systeme wie diese könnten in Zukunft ein schnelleres Erkennen von Therapieresistenzen ermöglichen und durch rechtzeitigen Einsatz alternativer Therapien den Heilungserfolg des Patienten deutlich verbessern [138].

Optical Imaging besitzt auch großes Potential auf dem Gebiet der Wirkstofffindung, der Arzneimittelentwicklung und der Identifizierung krankheitsspezifischer Marker und ihrer möglichen Zielstrukturen. Für eine Vielzahl von Erkrankungen wurden bereits Mausmodelle etabliert, welche zum Beispiel im Rahmen von präklinischen Studien durch nicht-invasives Imaging ein und desselben Tieres über längere Zeiträume wertvolle Informationen über den Therapieverlauf und mögliche Nebenwirkungen liefern können. Kosten- und zeitaufwändiges Sezieren von Tieren könnte minimiert werden, die Anzahl der Versuchstiere reduziert und der

gesamte Entwicklungsprozess deutlich beschleunigt werden. Eine derartige neue Entwicklungsstrategie bedarf jedoch auch der entsprechenden regulatorischen Rahmenbedingungen, welche bisher nicht gegeben sind [121].

2.5.2.1 Nahinfrarot - Kontrastmittel

Als Kontrastmittel werden im Bereich Optical Imaging Fluorophore verwendet, welche das Licht im NIR-Bereich absorbieren und emittieren. Damit eine gute Kontrastierung in vitro und in vivo erzielt werden kann, müssen diese Fluorophore Voraussetzungen erfüllen wie: (i) photochemische und chemische Stabilität, (ii) hoher Absorptionskoeffizient, (iii) hohe Quantenausbeute, (iv) keine Photosensibilisierung, (v) gute Wasserlöslichkeit und (vi) geringe Toxizität [131][139][140]. Trotz guter optischer Eigenschaften und Stabilität sind derzeit Phthalocyanine und Pheophorbid nicht als Kontrastmittel geeignet, da sie bei Anregung reaktive Sauerstoffspezies wie Singulett-Sauerstoff erzeugen, welcher toxisch auf Zellen und Gewebe wirkt. Genutzt werden kann diese Eigenschaft für eine Anwendung im Bereich der Photodynamischen Therapie (PDT) [128][131].

Cyaninfarbstoffe

Die Gruppe der Polymethine bzw. der Cyaninfarbstoffe hat sich in den letzten Jahren als viel versprechend bei der Verwendung als Kontrastmittel herausgestellt [141]. Mit zunehmender Größe des Chromophors und mit höherer Absorptionswellenlänge besteht jedoch eine erhöhte Anfälligkeit für Ausbleichung (Cy7 > Cy5 > Cy3, d.h. Carbocyaninfarbstoffe mit 7, 5 oder 3 konjugierten Doppelbindungen) [131]. Für die im NIR-Bereich fluoreszenzaktiven Cyanine liegt hier die größte Einschränkung, auch bezüglich einer Nutzung im mikroskopischen Bereich.

Durch eine unspezifische Anreicherung der reinen Farbstoffmoleküle, basierend auf der erhöhten Perfusion pathologischer Gewebe, ist nur eine eingeschränkte Kontrastierung möglich. Die kovalente Kopplung der NIR-Fluorophore an Target-Moleküle wie Octreotat, Folsäure oder Bisphosphonate führt entsprechend zu einer verbesserten spezifischen Kontrastierung von Tumorgewebe, arthritischem Gewebe und dem Knochengewebe [142][143][144].

Um eine aktive Anreicherung überhaupt zu ermöglichen, müssen diese Kontrastmittel, welche einer schnellen renalen Eliminierung unterliegen, ausreichend lange zirkulieren. Eine sehr

langsame Eliminierung durch Kombination mit hochmolekularen Verbindungen ist allerdings auch nachteilig, da der in der systemischen Zirkulation befindliche Farbstoff ein Hintergrundsignal verursacht, welches den eigentlichen Kontrast stark überdecken kann [131]. Vorteilhaft erwies sich die Entwicklung intelligenter Farbstoffsysteme, welche erst am eigentlichen Zielort aktiviert werden und deshalb kein störendes Hintergrundsignal während der Zirkulation erzeugen. Krankheitsspezifische molekulare Marker wie Proteasen oder erhöhte Enzymlevel werden dazu genutzt, den nur durch diese Substanzen spaltbaren Linker zu lösen, wodurch der Fluorophor freigesetzt wird. Erst durch diesen Prozess der Aktivierung erlangt der Fluorophor seine Aktivität als Folge von Dequenching zurück. Ist jedoch der Fluorophor noch an die Probe gebunden und in engem Kontakt mit anderen Farbstoffmolekülen, so tritt Quenching auf. Das bedeutet, dass durch Energietransfer zwischen den Fluorophoren eine Emission von Fluoreszenz nicht stattfindet [129][145][146][147].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Cyaninfarbstoffen zur Detektion kolloidaler Systeme handelt es sich um Indocyaningrün (ICG), Tetrasulfocyanin (TSC), Trisulfocyanincarbonsäure (TSCCS) und Indodicarbocyanin (IDCC), welche in den jeweiligen Kapiteln kurz vorgestellt werden. Der Einbau dieser Cyaninfarbstoffe in die Matrix von Nanopartikeln ist bis dato nur vereinzelt in der Literatur beschrieben.

Quantum dots

Im Zusammenhang mit Optical Imaging haben *Quantum dots* in den letzten Jahren großes wissenschaftliches Interesse erlangt. Es handelt sich um Halbleiter-Nanokristalle, welche aus Atomen wie Cd, Se, Te, S oder Zn bestehen. Die Partikel mit Durchmessern zum Teil unter 10 nm können in sehr enger Größenverteilung hergestellt werden und durch Überziehen oder Einkapseln in organischen Hüllen als biologische Marker in vitro eingesetzt werden [148]. Eigenschaften wie (i) eine gute Stabilität, (ii) sehr hohe Quanten-Ausbeuten, (iii) lange Abklingzeiten, (iv) vernachlässigbare Ausbleicherscheinungen und (v) steuerbare Emissionsbanden über den gesamten Vis- und NIR-Bereich machen sie zu Kontrastmitteln mit idealen optischen Eigenschaften [128][149]. Die Verwendung von Schwermetallen wie Cadmium als Ausgangssubstanz lässt jedoch vom toxikologischen Standpunkt eine Anwendung am Menschen als unwahrscheinlich erscheinen, zumal wenig über den Verbleib und die Effekte im Organismus bekannt ist.