

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Selbstaggrierende diagnostische Systeme

Einleitung

Selbstaggrierende Ladungskomplexe basieren auf einer spontanen Ausbildung kolloidaler Partikel durch elektrostatische sowie π - π -Wechselwirkungen zwischen entgegengesetzt geladenen Komponenten. Dieser Mechanismus wird auch als *ionic self assembly*, kurz ISA bezeichnet. Voraussetzung sind zwei entgegengesetzt geladene Komplexpartner, die sich in einem geeigneten stöchiometrischen Ladungsverhältnis der Einzelkomponenten unter bestimmten sterischen Voraussetzungen bis zum Erreichen des thermodynamisch günstigsten Zustandes zusammenlagern (siehe Kap. 2.3.1). Die Stabilisierung der Ladungskomplexe erfolgt hauptsächlich elektrostatisch durch einen definierten Überschuss einer der Komplexpartner. Im Falle von Polyelektrolyt-Tensid-Komplexen (PET) können Kettenlänge und Abstand der Ladungen des stabilisierenden Komplexpartners noch eine zusätzliche sterische Stabilisierung bewirken [170]. Ein für Ladungskomplexe und vor allem Polyplexe vielfach verwendetes Polykation ist Polyethylenimin (PEI).

Die farbstoffgestützte NIR-Diagnostik nutzt Nahinfrarot(NIR)-Farbstoffe für die Früherkennung von Tumoren und prämaligen Veränderungen sowie pathologischen Erscheinungen, welche durch Entzündungsreaktionen ausgelöst werden (siehe Kap. 2.5.2). Tetrasulfocyanin ist ein solcher Farbstoff, welcher sich für eine Anwendung in der optischen Mammographie in Entwicklung befindet (siehe Abb. 17).

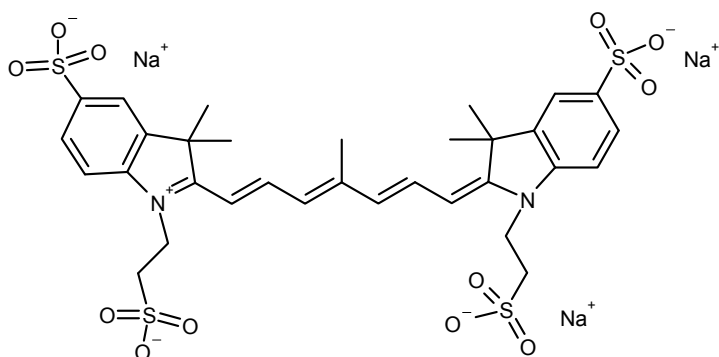


Abb. 17 Strukturformel von Tetrasulfocyanin (TSC)

Da diagnostische NIR-Farbstoffe wie auch TSC möglichst schnell aus dem Organismus eliminiert werden sollen, weisen sie eine sehr gute Wasserlöslichkeit auf. Durch das Vermeiden einer Akkumulation in Organen oder Geweben, welche nicht mit dem Kontrastmittel interagieren sollen, können mögliche Nebenwirkungen minimiert und die Biokompatibilität erhöht werden. Im Zuge der Herstellung und Prüfung neuer Verbindungen ist daher von Interesse, dass solche NIR-Farbstoffe wenig Interaktion mit körpereigenen Strukturen zeigen und vollständig, möglichst ohne eine metabolische Veränderung, ausgeschieden werden.

Um allgemein eine falsch positive Kontrastierung von gesundem Gewebe auszuschließen, sollte sich das Kontrastmittel sehr spezifisch im pathologischen Gewebe (z.B. dem Tumor) anreichern. Diese Problematik wurde bisher vor allem durch die Kopplung des Farbstoffes an spezifische Antikörper gelöst. Für einen optimalen Kontrast ist es allerdings notwendig, dass auch eine Vielzahl solcher Antikörper-markierten Farbstoffmoleküle das Zielgewebe erreichen. Einer solchen effektiven Anreicherung steht eine schnelle Eliminierung der Antikörper-Farbstoff-Konjugate über Makrophagen und die Organe des retikulo-endothelialen Systems (RES) entgegen. Hinzu kommt die Gefahr einer ungewollten Immunreaktion des Körpers auf die Antikörper, was eine wiederholte Anwendung ausschließen würde.

Alternativ kann eine Kontrastierung von pathologisch fenestriertem Gewebe (Tumorgewebe, arthritisches Gewebe etc.) auch mit Hilfe von Farbstoff-beladenen Nanopartikeln erfolgen. Wie bereits in Kap. 2.2.2.1 beschrieben, sind Nanopartikel aufgrund ihrer speziellen Struktur und Größe in der Lage, sich in Gewebe mit löcheriger Gewebsstruktur über Fenestrierungen anzureichern. Eine nanopartikuläre Formulierung bietet somit die Möglichkeit, eine Vielzahl von NIR-Farbstoffmolekülen pro Partikel gleichzeitig durch ein passives Targeting zum Zielgewebe zu transportieren. Die Schwierigkeit besteht allerdings darin, den hydrophilen NIR-Farbstoffes effizient in eine hydrophobe Partikelmatrix zu verkapseln.

4.1.1 Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Nanopartikel

Ziel war es deshalb, das gut wasserlösliche, im NIR-Bereich fluoreszenzaktive Tetrasulfocyanin (TSC) in ein nanopartikuläres Trägersystem einzuschließen. Die Komplexbildungseigenschaft des Polykations Polyethylenimin (PEI) sollte genutzt werden, um das anionisch geladene TSC-Salz in einen nanopartikulären Komplex durch Ladungsfällung

zu überführen (siehe Kap. 2.3.2.1). Die spontane in situ Ausbildung der kolloidalen Partikel ist in Abb. 18 schematisch dargestellt.

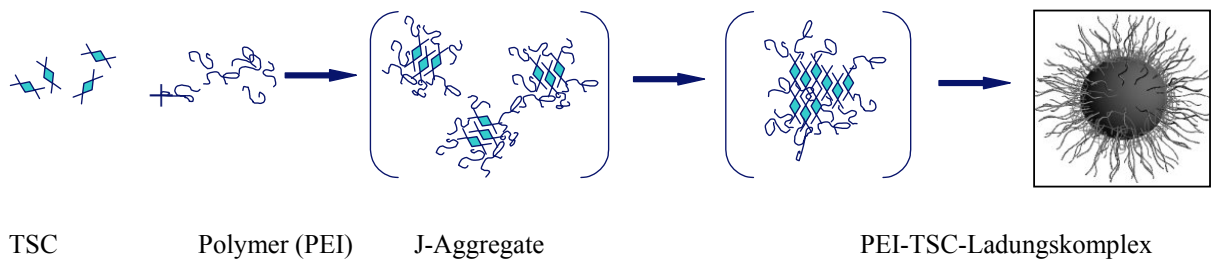


Abb. 18 Schematische Darstellung der Ausbildung der kolloidalen PEI-TSC-Komplexe

Selbstaggregierende Polyelektrolytkomplexe (PEKs) werden durch Ladungsüberschuss einer der Komplexpartner elektrostatisch über die Ausbildung einer Ionenhülle stabilisiert. Diese Ionenhülle wiederum kann genutzt werden, oberflächenmodifizierende Komponenten mit Hilfe von elektrostatischen Wechselwirkungen durch so genannte Ladungstitration aufzubringen. Wie eingangs beschrieben, erlaubt diese Methode eine flexible und vielseitige Modifikation von Partikeloberflächen. Hinzu kommt, dass der wasserlösliche Farbstoff sehr effizient in diese Ladungskomplexe eingeschlossen werden kann, da er Teil der Partikelmatrix ist.

4.1.1.1 Partikelcharakterisierung

Zur Komplexierung des TSC wurden PEIs der Molekulargewichte 10 kDa, 70 kDa sowie 750 kDa verwendet. Die Herstellungsvorschrift ist im Anhang (Kap. 7.1.1.1) beschrieben. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Komplexzusammensetzung sowie die Polymerkettenlänge auf das Aggregationsverhalten, die resultierende Partikelgröße und die Stabilität der Komplexe haben. Hydrodynamischer Durchmesser und Zetapotential der nanopartikulären Komplexe wurden mittels PCS und LDA bestimmt.

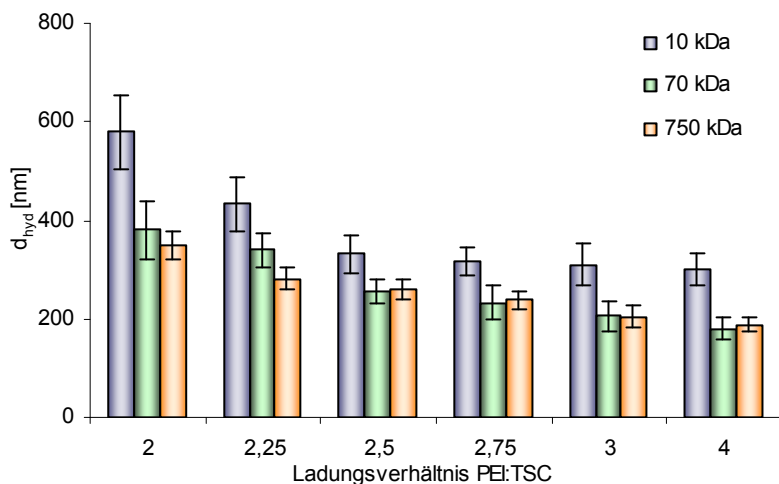


Abb. 19 Größe d_{hyd} von PEI-TSC-Nanopartikeln in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des PEIs und der Zusammensetzung der Komplexpartner

Aus Abb. 19 geht hervor, dass das Verhältnis der eingesetzten Ladungen der beiden Komplexpartner ein wichtiger Parameter für die Partikelgröße der PEI-TSC-Komplexe ist. Aufgrund der variierenden Ladungsverhältnisse konnten Partikelgrößen zwischen 200 nm und 600 nm innerhalb dieser Versuchsreihe erzielt werden. Dabei wird deutlich, dass ein geringerer PEI-Ladungsüberschuss zu größeren Partikeln führte, bei welchen zugleich eine Stabilitätsabnahme beobachtet wurde. Ursache könnte eine weniger stark ausgebildete Ionenhülle und dementsprechend schwächere elektrostatische Stabilisierung sein.

Eine fehlende elektrostatische Stabilisierung ist der Grund dafür, dass es um ein 1:1 Ladungsverhältnis zu einer Ausflockung von makroskopischen Komplexen kam [156]. Ein sehr hoher Polymerüberschuss bewirkte jedoch keine optimale Stabilisierung der Komplexe, sondern resultierte in einer Solvatisierung der TSC-Moleküle [80][81]. Derartige Ladungsaggregate unterhalb des Nanometerbereiches können mit Messmethoden der Dynamischen Lichtstreuung nicht mehr bestimmt werden (siehe Kap. 3.1.1). Anhand von Abb. 19 zeichnet sich weiterhin ab, dass die Verwendung von Polymeren mit niedrigerem Molekulargewicht, also kürzeren Kettenlängen, zur Ausbildung größerer Partikel führte. Park et al. hatten gezeigt, dass die Strukturen des PEIs einer zufälligen Verzweigung unterliegen aber mit steigendem Molekulargewicht ihre Kompaktheit zunimmt. Das könnte die Ursache dafür sein, dass es bei Verwendung von PEI mit hohem Molekulargewicht zur Bildung kleinerer Partikeldurchmesser kam [155]. Dieser Effekt wurde bereits von Thünemann et al. für PEI-Retinat-Komplexe beschrieben. Durch AFM-Untersuchungen konnte eine stärkere Kompaktheit der Komplexe bei Verwendung von höher molekularem PEI nachgewiesen

werden [156]. Hinzu kommt, dass sich bei gleichem Verzweigungsgrad eine lange Polymerkette im Vergleich zu mehreren kurzen Polymerketten vermutlich wesentlich kompakter packen muss, um alle bzw. möglichst viele Ladungen des TSC komplexieren zu können. Die höhere Kompaktheit wiederum bedingt Ladungskomplexe mit geringerer Größe. Parameter wie der Energieeintrag in Form der Rührgeschwindigkeit sowie die Umgebungstemperatur, Ansatzvolumen, Art des Rührgerätes und des Ansatzgefäßes beeinflussen ebenso die resultierende Partikelgröße, spielen jedoch eine untergeordnete Rolle. Die Verwendung von sehr kurzkettigem PEI mit einem Molekulargewicht von 1800 Da führte nur in Einzelfällen und nicht reproduzierbar zur Komplexbildung. Die geringere Kompaktheit dieses PEIs sowie die höhere Mobilität kurzer Polymerketten und das damit verbundene leichtere Eindringen von Wassermolekülen verhinderten offenbar, dass sich stabile partikuläre Ladungskomplexe mit einem schwachen Polyelektrolyten wie TSC ausbilden konnten.

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse kann für die PEI-stabilisierten TSC-Nanopartikel festgestellt werden, dass eine stabile Komplexbildung möglich ist, sofern ein definierter Überschuss des Polymers in den Ladungsverhältnissen 2:1 bis 4:1 eingesetzt wird und ein ausreichendes PEI-Molekulargewicht eine entsprechende Kompaktheit der Ladungen bzw. Polymerketten gewährleistet.

Eine Komplexbildung mit einem Überschuss an TSC ist prinzipiell möglich. Diese durch den Farbstoff stabilisierten Partikel wiesen jedoch eine deutlich geringere Stabilität auf, bedingt durch eine ungehinderte Diffusion der TSC-Moleküle auf der Partikeloberfläche. Anders als bei einem polymerstabilisierten Partikel ist der Farbstoff TSC durch seine geringe Molekülgröße nicht im Inneren des Komplexes verankert und kann bei dem Auftreten von Konkurrenzladungen anderer Verbindungen leicht substituiert werden. Die Folge ist eine geringere Stabilität dieser Komplexe in Anwesenheit geladener Verbindungen, wie z.B. den Serumproteinen im Blutplasma. Aus diesem Grund wurden nur polymerstabilisierte Partikel für die weiteren experimentellen Untersuchungen und Modifikationen verwendet.

Eine wichtige Kenngröße für die Stabilität der Ladungskomplexe ist das als Zetapotential bestimmte Oberflächenpotential der Nanopartikel, gemessen an der Scherebene der im elektrischen Feld wandernden Partikel (siehe Kap. 3.1.2).

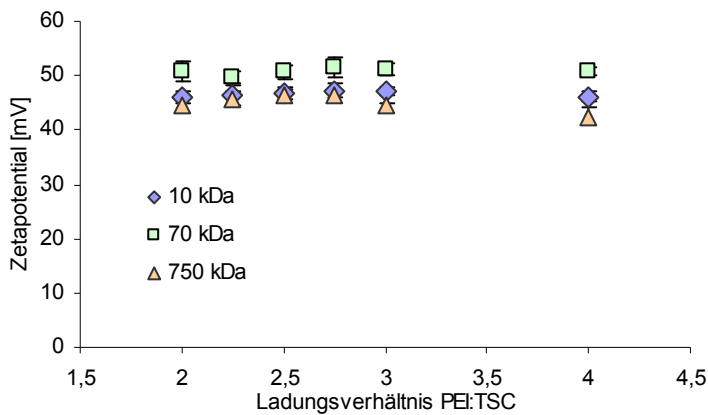


Abb. 20 Zetapotential der PEI stabilisierten PEI-TSC-Komplexe in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des PEIs und der Zusammensetzung der Partikel

Für die in Abb. 20 aufgeführten Zusammensetzungen konnte unabhängig von dem Verhältnis der Ladungen im Komplex ein konstantes Zetapotential zwischen +45 mV und +55 mV bestimmt werden. Demnach hatten alle stabilen Partikelzusammensetzungen mit einem Polymer-TSC-Ladungsverhältnis 2:1 bis ca. 4:1 eine mit kationischen Ladungen des PEIs vollständig abgesättigte Oberfläche, welche die Basis für die elektrostatische Stabilisierung ist. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Sachverhalt, dass nicht-stöchiometrische Ladungsverhältnisse in PEI-Komplexen zu einem starken Ladungsüberschuss bei der Zetapotential-Messung führen [157]. Im Falle einer ausreichend starken ionischen Komplexhülle ist die Verwendung eines zusätzlichen Tensids daher nicht notwendig.

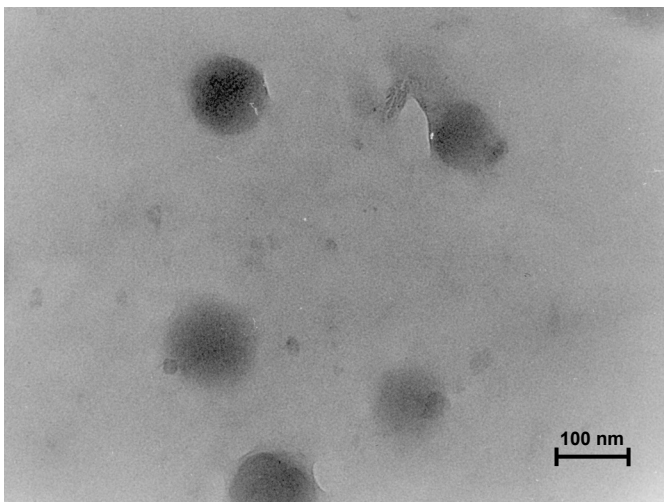


Abb. 21 TEM-Aufnahme der PEI-TSC-Komplexe; Aufnahme ohne kontrastverstärkende Anfärbung

Die mit Hilfe des TEMs bestimmte Partikelgröße von ca. 100 nm lag etwa 30% unter dem mittels Laserlichtstreuung (PCS) bestimmten hydrodynamischen Durchmesser. Dieser Effekt

ist wahrscheinlich auf die besondere Struktur von Ladungskomplexen zurückzuführen. Anders als bei festen Polymernanopartikeln sind die Bestandteile in einem Ladungsaggregat weniger kompakt angeordnet und befinden sich in einem permanenten Gleichgewicht mit Wassermolekülen. Hinzu kommt die bei hoch geladenen Partikeloberflächen stärker ausgeprägte Hydrathülle, welche bei der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels DLS mit in die Partikelgröße einfließt. Eine durch Trocknungsprozesse kompaktere Struktur der Aggregate sowie der Wegfall der Hydrathülle bei der TEM-Probenaufarbeitung können für die ca. 30% geringere Partikelgröße als Erklärung herangezogen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Bharali et al. diskutiert [158]. In diesem Fall handelte es sich um PVP-quervernetzte Methylenacrylamid-Nanopartikel, welche im TEM einen um 40% geringeren Partikeldurchmesser aufwiesen, verglichen mit den durch Laserlichtstreuung erzielten Ergebnissen. Hydratisierung und Quellung wurden hier als mögliche Ursachen dieser Größendifferenz genannt. Für Polyelektrolytkomplexe wurde dieser Effekt auch von Thünemann et al. bei Vergleich der mittels DLS und AFM bestimmten Partikelgrößen beschrieben [156].

Die in Abb. 21 dargestellten Nanopartikel besitzen eine sphärische Form und unterscheiden sich nur unwesentlich in ihrer Größe. Partikuläre Systeme, welche durch spontane Aggregation mittels ISA in situ entstehen, besitzen bei geringer Viskosität der Lösungen den Vorteil, eng verteilte Partikelpopulationen auszubilden. Indiz ist unter anderem der Polydispersitätsindex der Teilchengrößenbestimmung, welcher ein Maß für die Breite der Partikelpopulation ist. Im Falle von PEI-TSC-Nanopartikeln lag dieser PI meist unter 0,1. Größenbedingte Eigenschaften oder Effekte der PEKs können bei einer engen Verteilung der Partikel optimal genutzt werden. Das spielt z.B. eine wichtige Rolle bei der Überwindung biologischer Barrieren mit einem bestimmten Größenausschluss, ebenso wie für die Zellaufnahme. Auch eine Anreicherung mittels EPR-Effekt über die Fenestrierungen von Tumorgewebe (380-780 nm, siehe Kap. 2.2) ist nur dann möglich, wenn der Großteil der Partikel dieses Kriterium einer definierten Größe erfüllt.

4.1.1.2 Optische Eigenschaften der Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Nanopartikel

Abb. 22 zeigt eine Versuchsreihe, bei welcher zur Herstellung der PEI-TSC-Ladungskomplexe eine TSC-Lösung konstanter Konzentration mit jeweils steigenden Konzentrationen von PEI komplexiert wurde. Trotz der gleichen TSC-Konzentration in allen Ansätzen ist ein deutliches Verblässen des Farbstoffes mit zunehmendem PEI-Gehalt zu erkennen.



Zunehmende Polymerkonzentration (PEI)
→
bei konstanter TSC-Konzentration

Abb. 22 Farbstoffverblässung infolge der Komplexierung und Bildung von J-Aggregaten

Grund für diese Verblässung sind neben partikelbedingten Streueffekten des Lichtes hauptsächlich Quenching-Effekte. Diese werden verursacht durch die Komplexierung und Bildung von J-Aggregaten der Farbstoffmoleküle im Zuge der Partikelentstehung. Bei J-Aggregaten handelt es sich im Allgemeinen um Assoziate von Farbstoffmolekülen, deren Absorptionsspektrum deutlich bathochrom verschoben ist im Vergleich zum Absorptionsspektrum des Farbstoffmonomers. Die Literatur spricht hier auch von sogenannten *Scheibe*-Aggregaten [159][160]. Ihr Verhalten beruht auf einer starken zwischenmolekularen Kopplung der elektrischen Anregung [161].

a) UV-Vis-Spektroskopie

Veränderungen in chromophoren Systemen, wie sie durch Aggregate von Cyaninfarbstoffen verursacht werden, können mit Hilfe von UV-Vis-Absorptionsspektren analysiert werden und wichtige Hinweise zu den physikochemischen Vorgängen während oder nach der Zusammenlagerung geben. Das Absorptionsspektrum einer reinen wässrigen TSC-Lösung ist in Abb. 23 zu Vergleichszwecken aufgeführt.

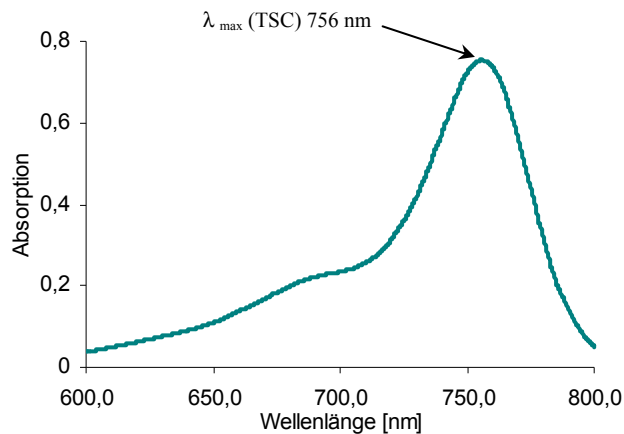


Abb. 23 Absorptionsspektrum von TSC in wässriger Lösung

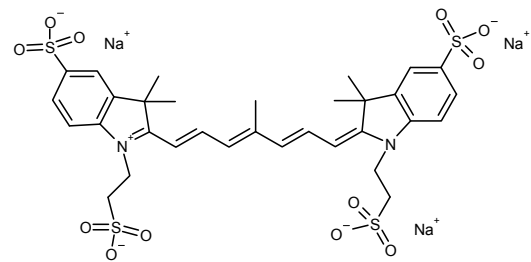


Abb. 24 Strukturformel von Tetrasulfocyanin (TSC)

In Abb. 25 ist die durch J-Aggregatbildung ausgelöste spektroskopische Veränderung der in wässriger Lösung vorliegenden PEI-TSC-Ladungskomplexe dargestellt. Anhand der Spektren ist zu erkennen, dass eine vollständige J-Aggregatbildung der Farbstoffmoleküle bei einem PEI-Ladungsüberschuss von 150%, 175% und 200% stattgefunden hatte. Beweis ist das Fehlen des Wellenlängenmaximums des Farbstoffmonomers bei 756 nm sowie das Auftreten eines neuen bathochrom verschobenen Wellenlängenmaximums bei ca. 800 nm, welches von den J-Aggregaten stammt. Die Spektren der Ansätze mit 100% und 125% PEI-Ladungsüberschuss belegen durch zwei Maxima bei den beiden oben genannten Wellenlängen, dass noch Teile des Farbstoffes in der ungebundenen freien Form neben den bereits gebildeten J-Aggregaten vorlagen.

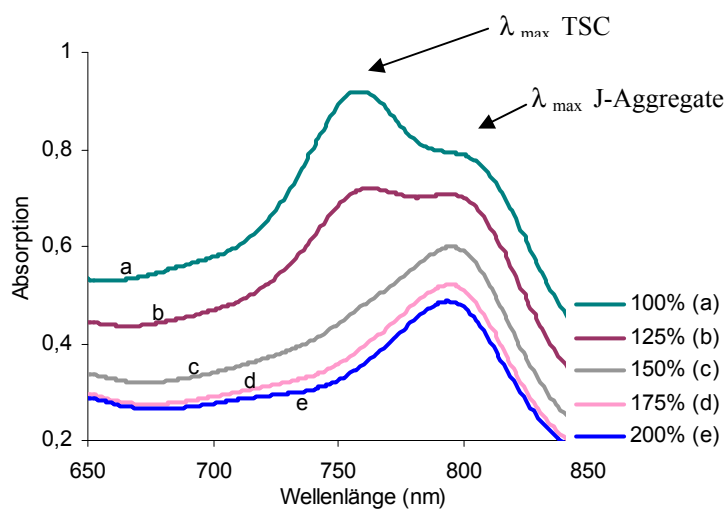


Abb. 25 J-Aggregatbildung durch PEI-TSC-Komplexbildung; (a)-(e) PEI-Ladungsüberschuss in %

Alle Proben der gezeigten Spektren hatten bei der spektrophotometrischen Vermessung die gleiche Farbstoffkonzentration. Aus der Abnahme der absoluten Absorption kann deshalb zum einen geschlussfolgert werden, dass die Quenching-Effekte mit dem Ausmaß der J-Aggregatbildung bei steigendem Polymergehalt zunahmen. Des Weiteren kann die zunehmende Abschirmung des TSC durch die stärkere PEI-Partikelhülle eine verringerte Absorption verursacht haben.

Beim Quenching (vgl. Kap.2.5.1.1) kommt es durch die Wechselwirkung zwischen einem durch Strahlung angeregten Fluorophor und einer weiteren Substanz (Quencher=Löscher) zu einer strahlungslosen Übertragung der Energie des angeregten Fluorophors auf die Quencher-Moleküle, wobei zwischen zwei Arten von Lösprozessen unterschieden wird. Die dynamische Fluoreszenz-Löschung entsteht durch Kollisionsprozesse, z.B. bei Vorliegen hoch konzentrierter Farbstofflösungen. Im Falle der PEI-TSC-Partikeldispersion kam es vermutlich zu einer statischen Fluoreszenz-Löschung, verursacht durch Komplexbildung zwischen Fluorophor und Quencher-Molekülen [122]. Hinweis ist unter anderem die Aufhebung des Quenching-Effektes bei Desaggregation der Komplexe, auf welche später näher eingegangen wird.

Die zwischenmolekularen π - π -Wechselwirkungen bei der J-Aggregatbildung werden den anionischen TSC-Molekülen durch die elektrostatische Interaktion mit kationischem PEI aufgezwungen. Dabei müssen sich im Zuge der Komplexbildung die TSC-Moleküle möglichst dicht packen. Die daraus resultierende höher geordnete Struktur der entstehenden J-Aggregate ist abhängig vom Ordnungsgrad der molekularen Packung der Farbstoffmoleküle. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich der Ordnungsgrad in verschiedenen Packungs-Typen, wie z.B. dem „Backstein“- oder dem „Sandwich“-Typ, widerspiegelt [162]. Einfluss auf den Ordnungsgrad dieser molekularen Packung in den PEI-TSC-Komplexen hat das Polymer-Farbstoff-Ladungsverhältnis. In Abb. 26 ist die Verschiebung des Wellenlängenmaximums in Abhängigkeit vom PEI-Ladungsüberschuss im Komplex dargestellt.

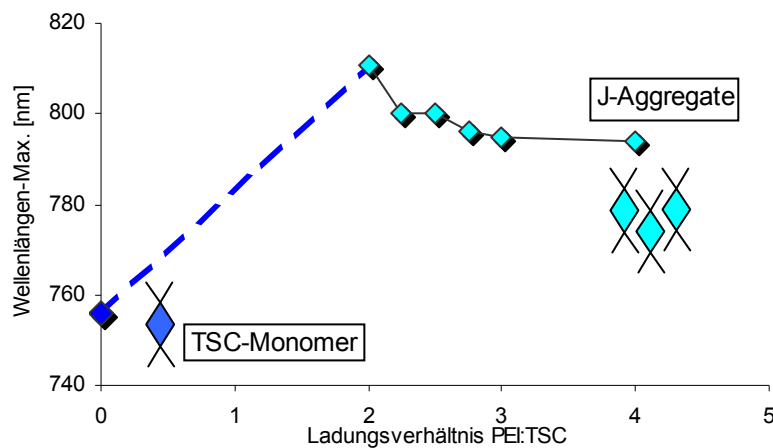


Abb. 26 Bathochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums von TSC durch Bildung von J-Aggregaten im Zuge der PEI-TSC-Komplexbildung

Es wird ersichtlich, dass bei dem geringsten Polymeranteil und somit kleinsten Ladungsüberschuss im Komplex die weiteste bathochrome Verschiebung mit ca. 50 nm, ausgehend vom TSC-Monomer mit 756 nm, auftrat. Die Farbstoffmoleküle wurden hier durch den geringen Polymerüberschuss in der höchsten Packungsdichte angeordnet, was sich in der größten bathochromen Verschiebung zeigt. Ab einem Ladungsüberschuss von ca. 200% (Verhältnis 3:1) hatte sich anscheinend eine minimale Packstruktur eingestellt, die sich auch mit zunehmendem Polymer- bzw. Ladungsüberschuss nicht mehr veränderte.

Für die molekulare Ordnung und Kompaktheit der Aggregate ist demzufolge das Verhältnis der Ladungen und damit die Zusammensetzung der Komplexe ein entscheidender Faktor. Für dieses System gilt: Je weniger Polymer zur Komplexierung zur Verfügung steht, desto dichter müssen sich die Farbstoffmoleküle als J-Aggregate packen. Bekannt ist, dass die Polymer-Farbstoff-Wechselwirkung nicht nur von der Stärke, der Anzahl und dem Abstand der ionischen Bindungsstellen abhängt, sondern auch vom *Stacking*-Koeffizient [163][164]. Dieser bedingt eher eine benachbarte Anlagerung an bereits eingebundene Farbstoffmoleküle als eine zufällige Interaktion mit freien ionischen Bindungsstellen des Polyelektrolyten. Das könnte auch die minimale Packstruktur erklären, bei welcher unabhängig vom Polymerüberschuss die Farbstoffmoleküle eine unveränderte J-Aggregatformierung aufweisen, ersichtlich aus dem gleich bleibenden Wellenlängenmaximum (Verhältnis PEI:TSC 3:1, 4:1).

Die in den Absorptionsspektren erkennbare Wellenlängenverschiebung ermöglicht eine genaue Unterscheidung zwischen intakten und desaggregierten Komplexen. Eine solche

Unterscheidung ist sehr wichtig im Hinblick auf die Untersuchung des Stabilitätsverhaltens der Partikel in Plasma, da in diesem Medium eine Partikelgrößenbestimmung mittels PCS problematisch ist. Grund ist das Vorkommen von nanopartikulären Bestandteilen im Plasma, welche die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung verfälschen würden. Eine Verschiebung des Wellenlängenmaximums der J-Aggregate zeigt dagegen eindeutig Veränderungen der Komplexe in Plasma an.

Die Herstellung von nanopartikulären PEKs erfordert häufig ein Arbeiten in Lösungen mit niedrigen Konzentrationen [77]. Ist der Aggregationsprozess abgeschlossen, kann die Partikeldispersion unter bestimmten Rahmenbedingungen eingengt und dadurch aufkonzentriert werden (siehe Abb. 27). Das Einengen erfolgte mit einer Ultrafiltrationszelle von Millipore (Amicon stirred cell) und unter Einsatz eines Polyethersulfon-Filters (NMWL 100 kDa).

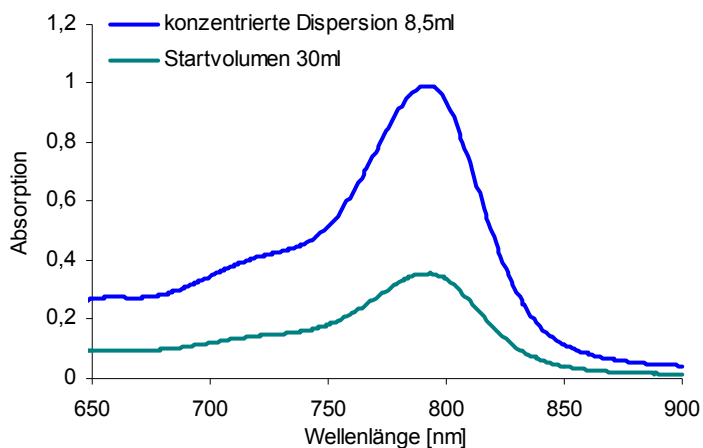


Abb. 27 Zunahme der Absorption durch Einengen der PEI-TSC Partikeldispersion mittels Ultrafiltrationszelle (NMWL 100 kDa)

Durch das Einengen der Dispersion sind keine Veränderungen innerhalb der molekularen Packung der Ladungskomplexe aufgetreten. Als Beweis dient der Vergleich der Absorptionsspektren der Ausgangslösung und der ca. 4-fach konzentrierten Lösung. Zu erkennen ist eine Zunahme der absoluten Absorption als Folge der Konzentrationsveränderung, aber keine Verschiebung der Wellenlängenmaxima der J-Aggregate.

Wurden jedoch PEI-TSC-Komplexe mit PEI M_w 70 kDa durch Verwendung einer Filterausschlussgrenze von 100 kDa aufkonzentriert, konnte das PEI die Filterporen passieren und somit den Komplexen entzogen werden. Dadurch kam es zu einer Veränderung des PEI-TSC-Verhältnisses in Richtung Ladungsausgleich. Die Folge war eine bathochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums, da sich die Farbstoffmoleküle bei geringerem

Polymerüberschuss wesentlich dichter packen müssen. Dieser Effekt ist bereits anhand von Abb. 26 erläutert worden. Die Veränderung des Ladungsverhältnisses führte auch zu einer Verringerung der elektrostatischen Stabilisierung, wodurch es zum Partikelwachstum kam.

Demnach darf der überschüssige Komplexpartner durch ein Aufkonzentrieren nicht dem System entzogen werden, weil dies zu einer Destabilisierung führt. Unter geeigneten Bedingungen ist es aber möglich, die für eine Anwendung gewünschte Konzentration in bestimmten Grenzen einzustellen, ohne die Stabilität der Partikel zu beeinflussen.

b) Fluoreszenzspektroskopie

Die Verwendung der nanopartikulären PEI-TSC-Komplexe für diagnostische Zwecke setzt voraus, dass der im NIR-Bereich fluoreszenzaktive Farbstoff auch in der partikulären Form fluoreszenzaktiv ist. Zur Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften wurden die in Abb. 28 dargestellten Spektren mit einem Fluorimeter vom Typ LS50B der Firma Perkin Elmer Instruments bei einer Anregungswellenlänge von 695 nm aufgenommen.

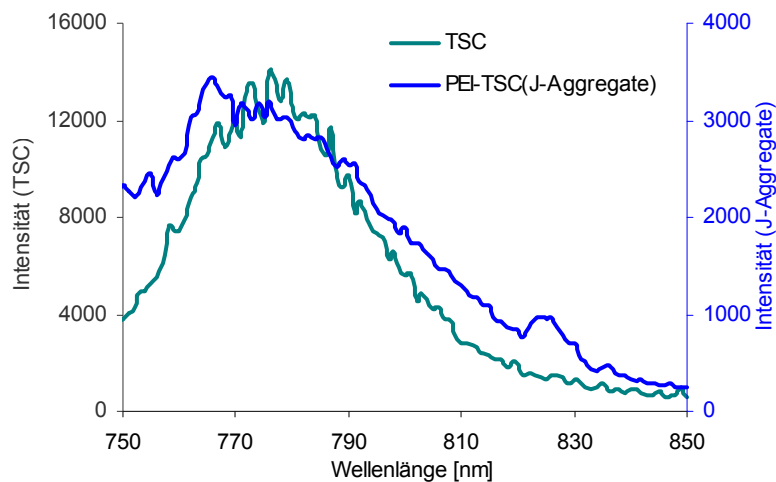


Abb. 28 Fluoreszenzspektren einer wässrigen TSC-Lösung und der PEI-TSC-Partikeldispersion (J-Aggregate)

Eine Fluoreszenzaktivität der J-Aggregate war vorhanden aber verglichen mit einer 0,2 μM wässrigen TSC-Referenzlösung stark in der Intensität gemindert. Dies geht deutlich aus einer Gegenüberstellung von Primär- und Sekundärachse hervor. Ursache sind Quenching Effekte, welche sich bereits in den Absorptionsspektren der PEI-TSC-Komplexe abgezeichnet haben (vgl. Abb. 25). Die Einbindung des Farbstoffes in den Komplex bewirkte eine leichte hypsochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums im Emissionsspektrum. Im Hinblick auf eine Anwendung im Bereich Optical Imaging besitzt dieser Effekt allerdings nur

Relevanz, wenn es zu einer Verschiebung außerhalb des optischen Fensters kommen würde (siehe Kap. 2.5.2).

4.1.1.3 Oberflächenmodifikation der Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Nanopartikel

Nanopartikuläre Formulierungen als Transportsysteme für Diagnostika und Therapeutika haben in der Wissenschaft großes Interesse geweckt, weil ihre gezielte Anreicherung in pathologisch verändertem Gewebe durch die Ausnutzung von passiven und aktiven Targeting-Effekten möglich ist (siehe Kap. 2.2.2). Ziel ist es, durch eine optimale Anpassung der Partikeloberfläche diese Effekte zukünftig besser steuern zu können. Das anschließende Kapitel befasst sich deshalb mit der elektrostatischen Oberflächenmodifikation der NIR-aktiven PEI-TSC-Komplexe und den Auswirkungen auf die Komplexeigenschaften *in vitro*.

a) Oberflächenmodifikation mit Adenosintriphosphat (ATP)

Molekulare Zielmechanismen nutzen die Eigenschaft, dass in pathologischem Gewebe häufig eine Veränderung der physiologischen Prozesse festzustellen ist. Es ist z.B. bekannt, dass bei einer Reihe von Tumorarten bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche deutlich stärker exprimiert werden als auf gesundem Gewebe. Bekannt ist auch, dass besonders im und um das Tumorgewebe herum eine erhöhte Stoffwechselaktivität stattfindet, welche nur aufrecht erhalten werden kann, wenn eine entsprechende Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet ist (siehe Kap. 2.2.2.1).

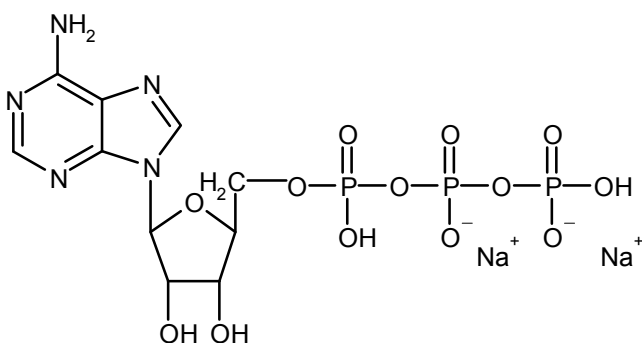


Abb. 29 Strukturformel von Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz (ATP)

Adenosintriphosphat ist ein wichtiger Energieträger bei physiologischen Stoffwechselprozessen in der Zelle und könnte für die Tumoraktivität eine Rolle spielen. Es ist mit einem Molekulargewicht von M_w 507,21 den „kleinen Molekülen“ zuzuordnen und besitzt durch die

negativ geladenen Phosphatgruppen des Salzes die Voraussetzung, sich per Ladungstitration auf die positiv geladene Oberfläche der PEI-TSC-Nanopartikel aufbringen zu lassen. Es wurde deshalb im folgenden Versuch als potentielles Zielmolekül für eine Oberflächenmodifikation ausgewählt.

In Abb. 30 sind die Veränderung der Partikelgröße und des Zetapotentials der PEI-TSC-Partikel infolge der Ladungstitration mit ATP dargestellt.

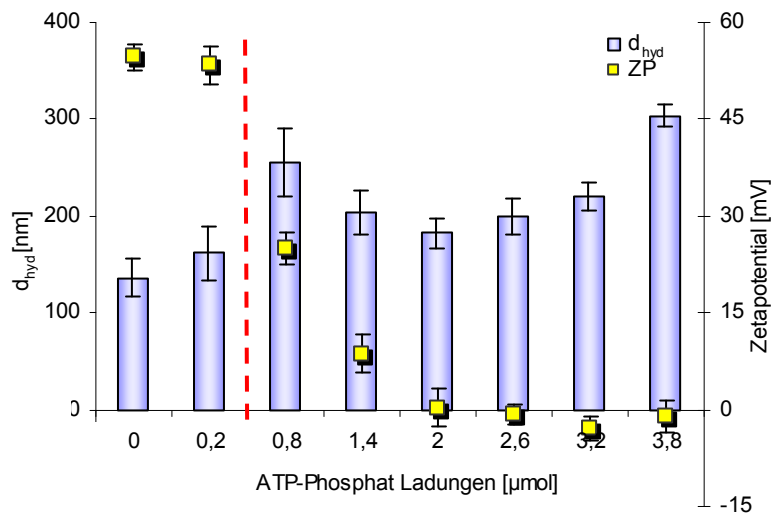


Abb. 30 Veränderung des Partikeldurchmessers d_{hyd} und des Zetapotentials mit fortschreitender Titration; roter Balken markiert beginnende Umstrukturierung der Komplexe

Eine Titration mit 0,8 μmol Phosphat-Ladungen führte zu einer starken Senkung des Oberflächenpotentials um ca. 35 mV. Diese Verringerung des Zetapotentials bewirkte einen Stabilitätsverlust, wodurch es zu einem Partikelwachstum um mehr als 100 nm kam. Die anschließende Partikelgrößenabnahme ist durch eine Umstrukturierung der Komplexe zu erklären, bei welcher TSC durch das ladungsstärkere ATP substituiert wurde. Belegt werden kann dieser Prozess durch die spektroskopische Veränderung der J-Aggregate, welche in Abb. 31 dargestellt ist.

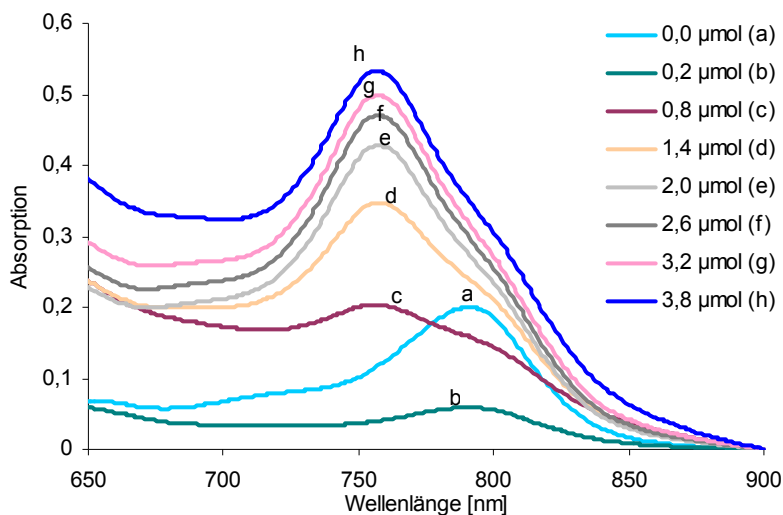


Abb. 31 Spektroskopische Veränderung der PEI-TSC-Komplexe durch ATP-Titration

Bereits bei einer Zugabe von $0,8 \mu\text{mol}$ Phosphat-Ladungen (c) fand eine Verdrängung des TSC aus dem ursprünglichen PEI-TSC-Komplex statt. Anstelle dessen kam es zur Ausbildung neuer PEI-ATP-Komplexe und der Farbstoff TSC lag wieder in der ungebundenen Form vor. Als Beweis kann die Verschiebung des Wellenlängenmaximums der J-Aggregate von ca. 795 nm zum Wellenlängenmaximum des Farbstoffmonomers bei 756 nm herangezogen werden. Anhand der Spektren ist auch gut erkennbar, dass es infolge der Desaggregation zur Aufhebung des Quenching-Effektes kam. In dem Ausmaß wie die Farbstoffmoleküle aus dem Komplex freigesetzt wurden, war eine Zunahme der Absorption als Zeichen für Dequenching zu beobachten.

ATP ist basierend auf diesen Ergebnissen nicht für eine ladungsbasierte Oberflächenmodifikation der PEI-TSC-Nanopartikel geeignet. Das kleine Molekül ist sehr schnell in der Lage, durch Diffusion in die molekulare Packungsordnung der Ladungskomplexe einzudringen und anschließend das ladungsschwächere TSC zu substituieren.

b) Oberflächenmodifikation mit β -Cyclodextrinphosphat (β CDPO₄)

Aus den Ergebnissen der Oberflächenmodifikation mit ATP konnten zwei Parameter identifiziert werden, welche entscheidend für eine Ladungstitration auf PEI-TSC-Ladungskomplexen sind: Die Molekülgröße des Titranten sowie seine Ladungsstärke.

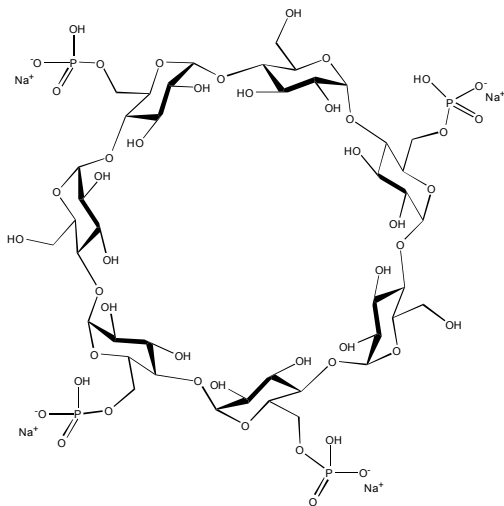


Abb. 32 Strukturformel von Natrium- β -Cyclodextrinphosphat

Dieses anionisch modifizierte β -Cyclodextrinphosphat (β CDPO₄) wurde wegen seiner größeren räumlichen Ausdehnung, die eine schnelle Diffusion in den Komplex verhindern sollte, für die anschließende Oberflächenmodifikation ausgewählt. Es ist aufgrund seines Zuckergrundgerüsts als physiologisch verträglich einzustufen und bietet außerdem die Möglichkeit weiterer Modifikationsschritte durch die Bildung von Einschlussverbindungen (siehe Kap.2.3.2.2). Pun et al. beschrieben eine solche Variante, bei welcher die Zielmoleküle mittels Admantan auf einer Cyclodextrin-haltigen Nanopartikeloberfläche aufgebracht wurden [165]. In diesem Fall war das Cyclodextrin vor der Partikelbildung an das gerüstbildende Polymer kovalent gekoppelt worden.

In Abb. 33 ist das Ergebnis der Partikelcharakterisierung nach Ladungstitration der PEI-TSC-Komplexe mit β CDPO₄ dargestellt.

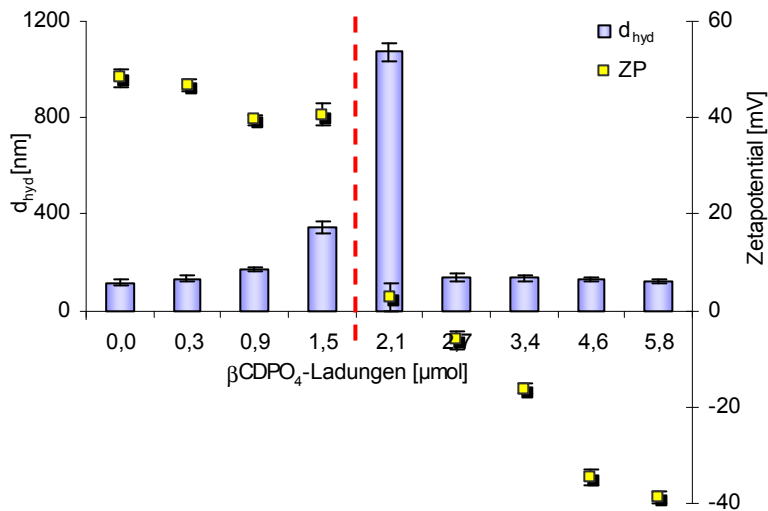


Abb. 33 Veränderung des Partikeldurchmessers d_{hyd} und des Zetapotentials mit fortschreitender β CDPO₄-Titration; roter Balken markiert beginnende Umstrukturierung der Komplexe

Das Partikelwachstum bei einem Zusatz des Titranten bis zu 2,1 μmol ist mit der Abnahme des Zetapotentials und der damit verbundenen Verringerung der elektrostatischen Stabilisierung zu erklären (Abb. 33). Ladungsneutralität auf der Partikeloberfläche führte zum Verlust der elektrostatischen Anziehungskräfte innerhalb der PEI-TSC-Komplexe, wodurch eine Substitution des Farbstoffes durch das ladungsstärkere β CDPO₄ stattfand. Die Absorptionsspektren der Abb. 34 spiegeln diesen Prozess der Umstrukturierung der Aggregate wider.

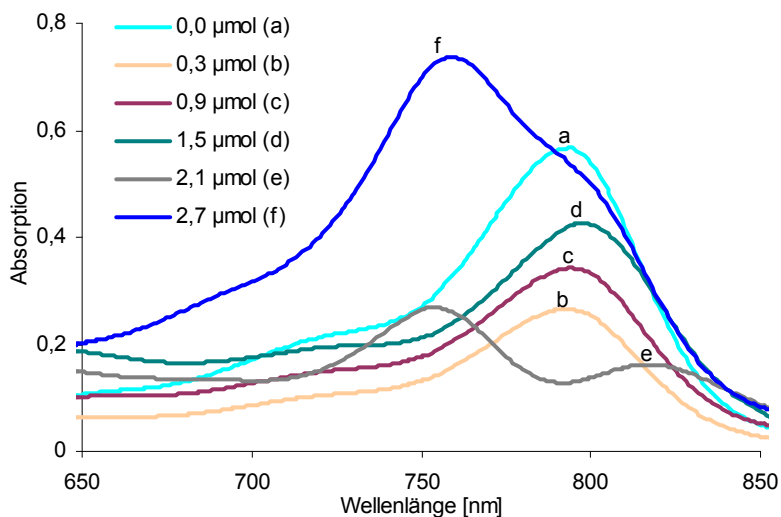


Abb. 34 Spektroskopische Veränderung der PEI-TSC-Komplexe durch β CDPO₄-Titration

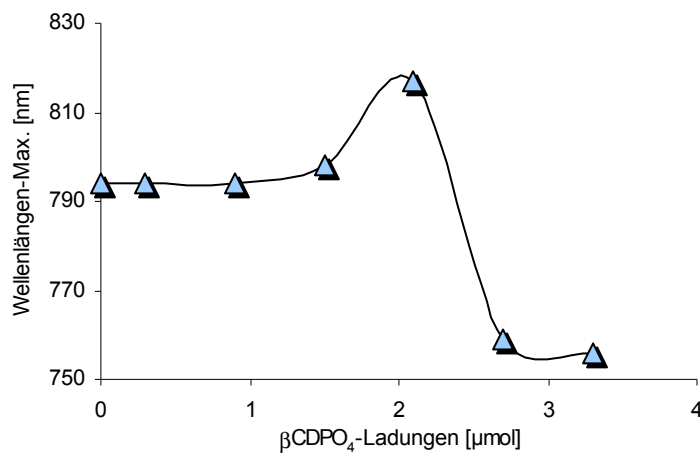


Abb. 35 Veränderung der Wellenlängenmaximums der PEI-TSC-Komplexe durch β CDPO₄-Titration

Ein geringer Anteil an β CDPO₄ konnte auf der Oberfläche der Partikel elektrostatisch gebunden werden (siehe Abb. 34; 0-1,5 µmol). Der Ladungskomplex war noch intakt, da die molekulare Packungsordnung des Farbstoffes mit einem Wellenlängenmaximum bei 795 nm nicht verändert wurde (siehe Abb. 35). Durch Zusatz von 2,1 µmol Phosphatladungen wurde aber bereits ein Teil des Farbstoffes aus dem Komplex verdrängt, ersichtlich in dem nun auftretenden Wellenlängenmaximum des ungebundenen Farbstoffes bei 756 nm. Der Teil der Farbstoffmoleküle, welcher noch im Komplex eingeschlossen war, wurde durch die Interaktion von PEI mit β CDPO₄ in eine kompaktere molekulare Packung gezwungen, was sich anhand einer zweiten bathochromen Verschiebung von 798 nm auf 817 nm nachweisen lässt (siehe Abb. 35). Höhere Zusätze des ladungsstärkeren Titranten (ab 2,7 µmol) führten zur vollständigen Substitution des Farbstoffes, weshalb dieser wieder in der freien, ungebundenen Form mit einem Wellenlängenmaximum bei 756 nm vorlag.

Fazit: Eine Oberflächenmodifikation von PEI-TSC-Komplexen mit β CDPO₄ ist in geringem Umfang möglich, sofern die Partikeloberfläche nicht vollständig neutralisiert wird. Die verringerte elektrostatische Stabilisierung hat ein Partikelwachstum zur Folge. Das im Vergleich zu TSC ladungsstärkere β CDPO₄ kann bei einer ladungsneutralen Partikeloberfläche die elektrostatischen Wechselwirkungen im Komplex durchbrechen. Aus diesem Grund werden neue Komplexe gebildet, bevor es zu einer Absättigung der Oberfläche durch den Titranten kommt.

Die Oberflächenmodifikation mit β CDPO₄ wird als nicht optimal bewertet, da es zu einer deutlichen Partikelgrößenzunahme infolge einer zu starken Destabilisierung der Komplexe kam.

c) Oberflächenmodifikation mit Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP)

Die Ladungsstärke sowie die Kompaktheit und die geringe Molekülgröße von ATP wurden als Ursachen für die schnelle Substitution des Farbstoffes durch ATP vermutet. Bei β CDPO₄ konnte durch die Molekülgröße eine Verbesserung der Oberflächenmodifikation erzielt werden. Der Grund für die Destabilisierung und schnelle Substitution könnte in diesem Fall auf die Ladungsstärke des Tetraphosphates zurückzuführen sein. Ein Vergleich der Zetapotentiale des Dissoziations-Gleichgewichtes auf der Partikeloberfläche der neu gebildeten Komplexe nach Verdrängung des TSC bestätigt diesen Sachverhalt (vgl. Abb. 30 und Abb. 33). Das Dissoziations-Gleichgewicht an der Partikeloberfläche der neuen PEI- β CDPO₄-Komplexe endet nicht wie bei den PEI-ATP-Komplexen bei einem Oberflächenpotential um 0 mV, sondern stellt sich erst bei ca. -35 mV ein. Das ist ein Hinweis dafür, dass das β CDPO₄ als Tetraphosphat als stärkerer Ladungsträger fungierte als das Triphosphat.

Deshalb wurde für die anschließend beschriebene Oberflächenmodifikation das ladungsschwächere und verglichen mit der ATP-Molekülstruktur größere NADP gewählt (siehe Abb. 36)

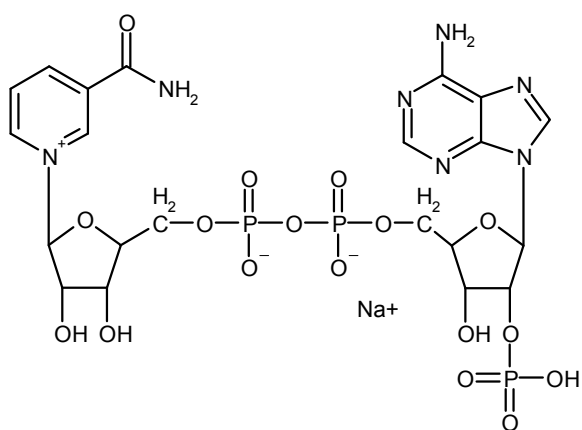


Abb. 36 Strukturformel von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Natriumsalz (NADP)

Die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung nach Ladungstitration sind in Abb. 37 und Abb. 38 veranschaulicht.

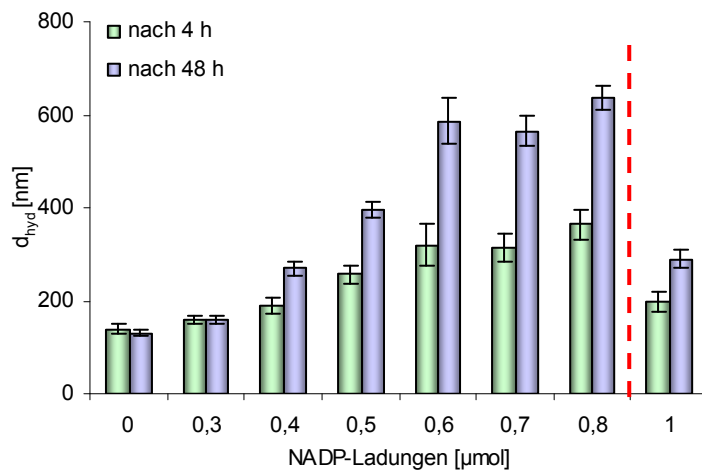


Abb. 37 Veränderung der Partikeldurchmessers d_{hyd} in Abhängigkeit von der Titrationsstufe und der Zeit; Balken markiert beginnende Umstrukturierung der Komplexe

Anhand der Abbildungen ist zu erkennen, dass eine Oberflächenmodifikation bis zu einer Zugabe von 0,4 μmol ohne starkes Partikelwachstum durchgeführt werden konnte. Das von +53 mV auf +25 mV gesenkte Zetapotential ist Indiz für eine Anlagerung der NADP-Moleküle auf der Partikeloberfläche durch elektrostatische Wechselwirkungen. Damit verbunden kam es zu einem geringfügigen Partikelwachstum von ca. 180 nm auf ca. 230 nm.

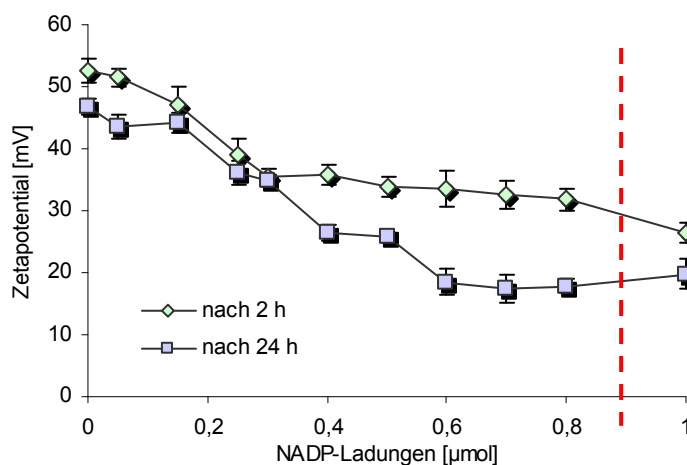


Abb. 38 Veränderung des Zetapotentials in Abhängigkeit von der Titrationsstufe und der Zeit; Balken markiert beginnende Umstrukturierung der Komplexe

Die geringere Ladungsstärke des NADP, erkennbar im deutlich höheren Zetapotential des Dissoziations-Gleichgewichtes von +20 mV (vgl. Abb. 38, Abb. 33 und Abb. 30), bedingt

eine trotz der Titration relativ gute Komplexstabilität im Vergleich zur Stabilität nach Titration mit ATP und β CDPO₄. Grund ist die insgesamt geringere Senkung des Oberflächenpotentials. Im Falle eines deutlichen Überschusses des Titranten kam es auch hier zu einer Desaggregation der PEI-TSC-Komplexe und Neubildung von PEI-NADP-Komplexen. Veranschaulicht wird das in den entsprechenden Absorptionsspektren in Abb. 39.

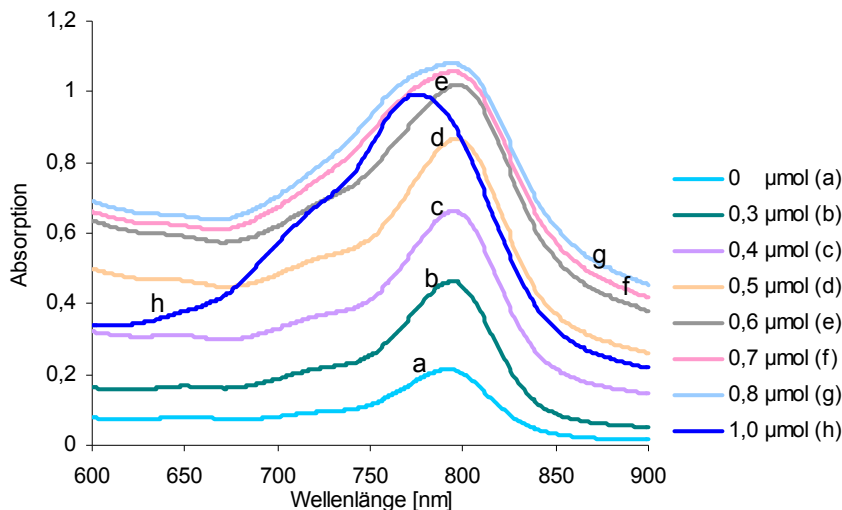


Abb. 39 Spektroskopische Veränderung der PEI-TSC-Komplexe durch NADP-Titration

Interessant ist, dass infolge der Titration die Quenching Effekte gemindert werden, erkennbar an der Zunahme der absoluten Absorption (Abb. 39a bis g). Vermutet wird eine Aufweitung der ionischen Komplexhülle durch schwächere elektrostatische Wechselwirkungen auf der Partikeloberfläche. Der Grund dafür könnte die Kompensierung der Oberflächenladungen durch den Titranten sein.

Die durch Titration mit NADP oberflächenmodifizierten PEI-TSC-Nanopartikel wurden in Mausplasma inkubiert, um Rückschlüsse auf das Verhalten und die Stabilität der Partikel in vivo ziehen zu können. Für die Untersuchung wurde die Nanopartikeldispersion 1:1 mit Mausplasma von weiblichen Nacktmäusen versetzt. Diese Tierspezies wurde ausgewählt, da sie hauptsächlich für Versuche im Bereich Optical Imaging eingesetzt werden.

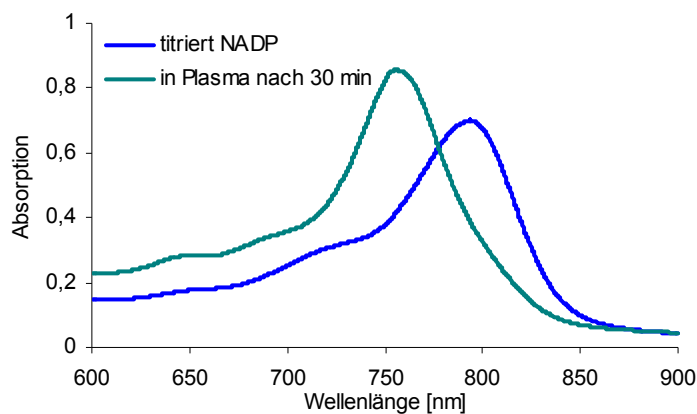


Abb. 40 Desaggregation der NADP-oberflächenmodifizierten PEI-TSC-Nanopartikel nach Inkubation in Mausplasma

Aus Abb. 40 geht hervor, dass die modifizierten Nanopartikel eine unzureichende Stabilität in Plasma aufweisen. Nach bereits 30 min waren die Nanopartikel zu 100% desaggregiert. Als Folge der Desaggregation kam es außerdem zur Zunahme der Absorption, ein Zeichen für das zuvor angesprochene reversible Quenching bei Auflösung der Komplexstruktur und Freisetzung des Farbstoffes.

d) Kombinierte Oberflächenmodifikation mit Glu(10)-b-PEG(110) und NADP

Vorangegangene Ergebnisse haben gezeigt, dass die PEI-TSC-Komplexe einen Stabilitätsverlust aufzeigen, sofern die elektrostatische Stabilisierung auf der Partikeloberfläche durch Ionenpaarbildung mit einem Titranten ausgeschaltet oder drastisch gemindert wird. Die durch Ladungstiteration aufgebrachte Oberfläche sollte deshalb eine sterisch stabilisierende Komponente enthalten, welche die verringerte elektrostatische Stabilisierung ausgleichen kann. Aus diesem Grund wurde für die folgende Oberflächenmodifikation das Blockcopolymer Glutaminsäure(10)-block-Polyethylenglycol(110) ausgewählt.

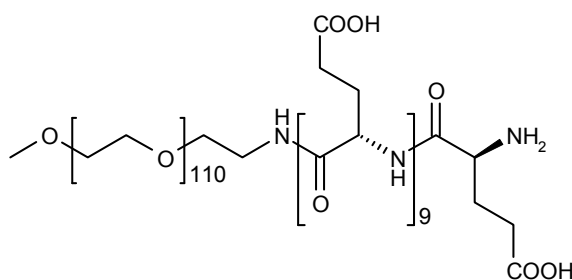
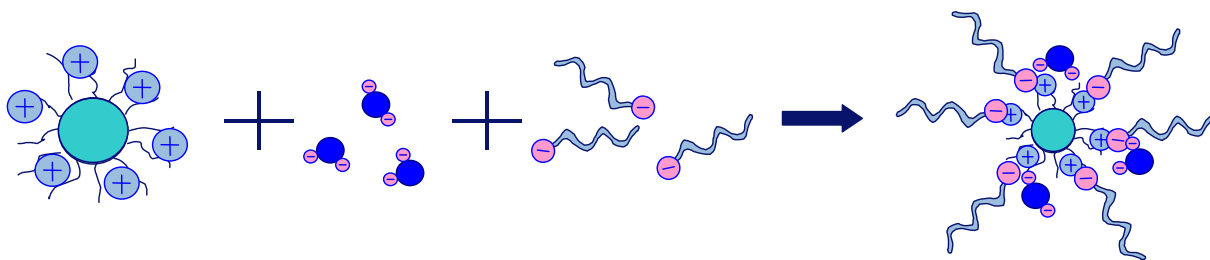


Abb. 41 Strukturformel von Glu(10)-b-PEG(110); synthetisiert am Fraunhofer IAP, Golm [166]

Für PEG-Oberflächen konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass sie kolloidale Systeme vor Plasmakomponenten abschirmen und dadurch eine schnelle Opsonierung verhindern. Dementsprechend können diese durch eine Pegylierung geschützten Partikel länger in der systemischen Zirkulation verbleiben, ohne sofort durch Makrophagen eliminiert und anschließend abgebaut zu werden [167].

Durchgeführt wurde die Titration in Kombination mit NADP, welches aufgrund seiner physiologischen Herkunft als potentiell Zielmolekül fungierte und von den zuvor getesteten Molekülen akzeptable Ergebnisse bei der Oberflächenmodifikation erzielt hatte. Die kombinierte Oberflächenmodifikation ist in Abb. 42 schematisch veranschaulicht.



PEI-TSC-NP

NADP

Glu(10)-b-PEG(110)

oberflächenmodifizierter Partikel

Abb. 42 Kombinierte Oberflächenmodifikation von PEI-TSC-Molekülen mit NADP und Glu(10)-b-PEG(110)

Die Darstellung soll den sterisch stabilisierenden Effekt des Blockcopolymers durch den PEG-Block auf der Partikeloberfläche demonstrieren. Als negative Ladungsanker dienen die Carboxylat-Gruppen der Glutaminsäure-Untereinheiten des Blockcopolymers.

Das Ergebnis dieser Kombinationstitration waren größenstabile, NIR-aktive, oberflächenmodifizierte Nanopartikel. Eine Charakterisierung des Partikeldurchmessers und des Oberflächenpotentials erfolgte über einen Zeitraum von 12 Tagen, wobei unmodifizierte gegen oberflächenmodifizierte Partikel verglichen wurden (siehe Abb. 43 und Abb. 44).

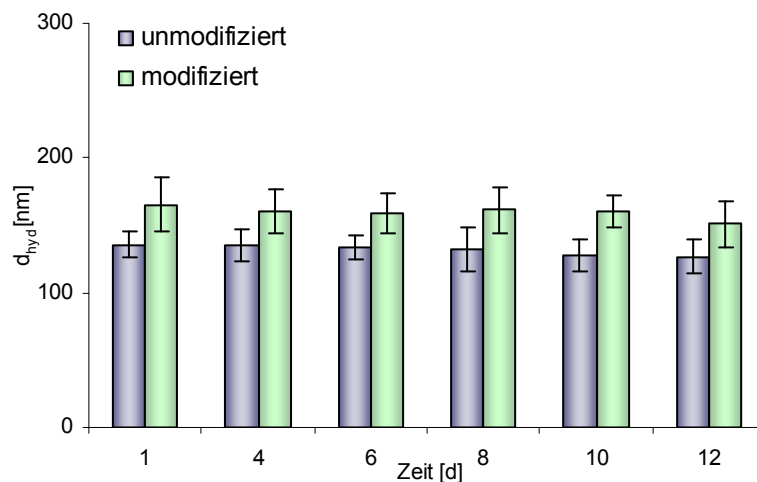


Abb. 43 Partikeldurchmesser d_{hyd} oberflächenmodifizierter PEI-TSC-Nanopartikel über einen Zeitraum von 12 Tagen

Die für die Titration verwendeten PEI-TSC-Nanopartikel hatten über den untersuchten Zeitraum einen konstanten hydrodynamischen Durchmesser von ca. 135 nm. Bedingt durch die Oberflächenmodifikation kam es zu einer einmaligen Zunahme des Partikeldurchmessers um ca. 30 nm auf 165 nm. Die Modifikation der Oberfläche hatte offensichtlich keinen Stabilitätsverlust zur Folge, denn ein weiteres Partikelwachstum wurde nicht beobachtet.

Die einmalige Zunahme der Partikelgröße könnte auf den 4,4 kDa großen PEG-Block sowie eine Komplexaufweitung zurückzuführen sein. Durch Anlagerung der entgegengesetzt geladenen Substanzen kam es zu einer Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen in der Komplexhülle. Die resultierende Aufweitung ermöglichte eine Einlagerung von Wassermolekülen, womit sich die Partikelgrößenzunahme erklären ließe.

Während der Titration konnte auch eine Zunahme der absoluten Absorption festgestellt werden. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese einer Komplexaufweitung, denn die Zunahme der Absorption ist ein Zeichen für eine Verringerung der Quenching-Effekte. Allgemein gilt, dass Absorption und Fluoreszenz umso stärker sind, je weniger die Aufnahme bzw. Abgabe von Lichtquanten, wie im Falle einer Komplexaufweitung, behindert wird (siehe Quenching Kap. 2.5.1.1).

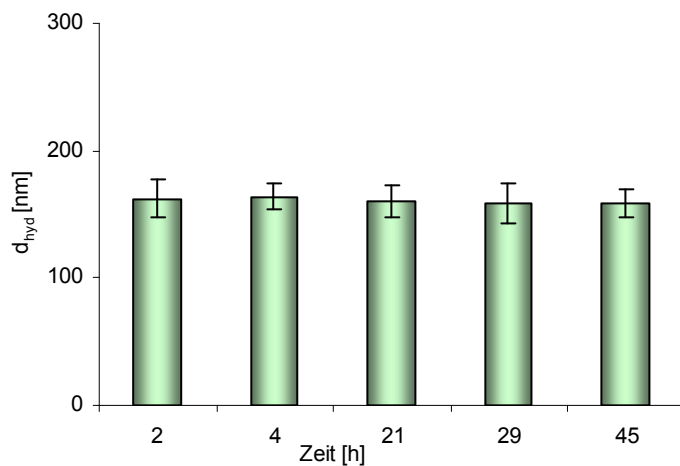


Abb. 44 Partikeldurchmesser d_{hyd} modifizierter PEI-TSC-Nanopartikel nach Inkubation im Schüttelschrank bei 37°C über 45 h

Anhand von Abb. 44 wird deutlich, dass während der Stabilitätsprüfung der modifizierten Partikel im Schüttelschrank bei 37°C über 45 h keine Veränderung der Partikelgröße stattfand. Es kann deshalb geschlossen werden, dass infolge einer erhöhten Temperatur unter in vivo Bedingungen eine Destabilisierung der Komplexe nicht zu erwarten ist.

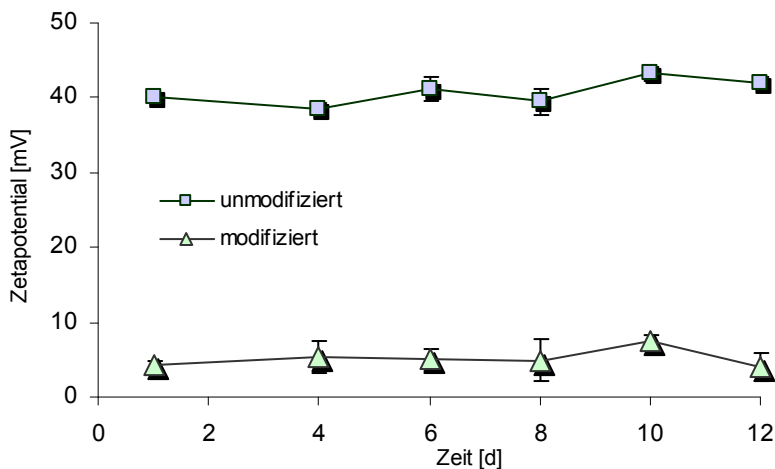


Abb. 45 Zetapotential modifizierter PEI-TSC-Nanopartikel über einen Zeitraum von 12 Tagen

Die Untersuchung des Zetapotentials der Partikel erbrachte einen deutlichen Potentialunterschied zwischen den modifizierten und unmodifizierten Partikeln von ca. 40 mV (siehe Abb. 45). Dieser Potentialunterschied blieb innerhalb von 12 Tagen konstant und spiegelt die gleich bleibende Stabilität der modifizierten Partikel wider. Das konstante Oberflächenpotential der modifizierten Partikel ist Beleg dafür, dass keine Veränderung der Ladungsverhältnisse und damit keine Veränderung der auf die Oberfläche elektrostatisch

gebundenen Substanzen stattgefunden hatte. Trotz der minimalen Oberflächenladung zwischen 0 mV und 5 mV war das System stabil, da die aufgebrauchte Oberfläche eine ausreichende sterische Stabilität der Partikel durch den PEG-Block gewährleistete.

Wie im Falle des hier beschriebenen Systems ist eine hydrophile und leicht kationisch geladene Oberfläche für eine *in vivo* Anwendung zu bevorzugen. Zum einen besteht nicht wie bei hoch kationisch geladenen Partikeln die Gefahr der Agglomeration mit Blutbestandteilen [65][66]. Andererseits kann sich eine leicht positiv geladene Partikeloberfläche als vorteilhaft bei der Zellaufnahme und Freisetzung aus den Endolysosomen auswirken (siehe Kap. 2.2.2.3).

Die modifizierten Nanopartikel zeigten die für eine Detektion notwendige Fluoreszenzaktivität (Abb. 46). Eine leichte hypsochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums des Emissionsspektrums konnte ebenso bei Untersuchung der unmodifizierten PEI-TSC-Nanopartikel beobachtet werden.

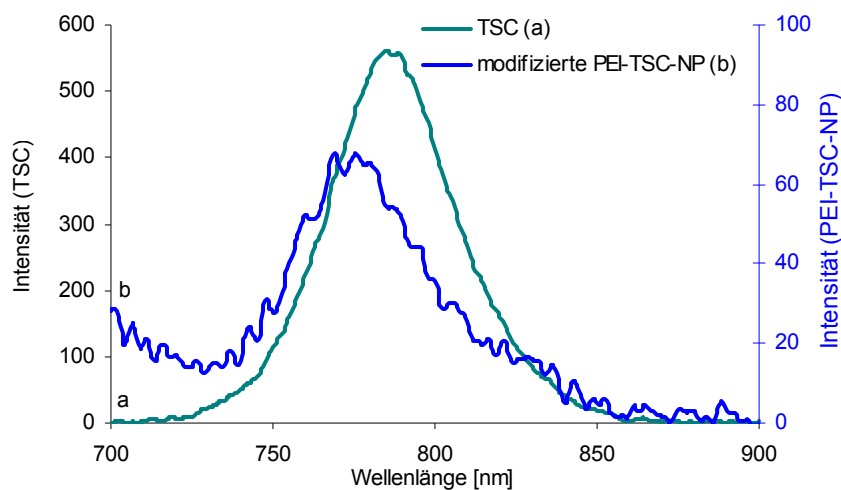


Abb. 46 Fluoreszenzspektren von TSC und oberflächenmodifizierten PEI-TSC-Nanopartikeln

Eine Prüfung der Stabilität der oberflächenmodifizierten Nanopartikel erfolgte u.a. durch Inkubation in Mausplasma (siehe Abb. 47).

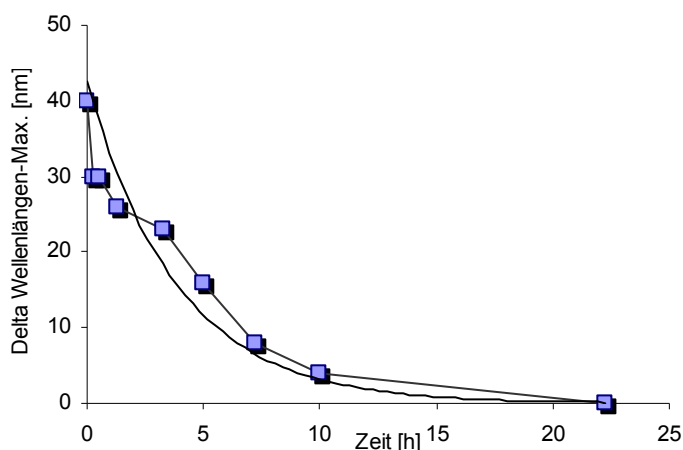


Abb. 47 Desaggregation der oberflächenmodifizierten PEI-TSC-Nanopartikel nach Inkubation in Mausplasma

In Abb. 47 ist der Desaggregationsprozess der nanopartikulären Komplexe als eine Funktion der Verschiebung des Wellenlängenmaximums der J-Aggregate in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (siehe Erklärung Abb. 31, Veränderung von J-Aggregaten). Anhand der ermittelten Werte wurde für die Nanopartikel bzw. J-Aggregate eine Halbwertszeit von 2,6 h im Plasma bestimmt, wobei für den Desaggregationsprozess eine Reaktion erster Ordnung angenommen wurde.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen in Mausplasma belegen, dass mit Hilfe einer kombinierten Oberflächenmodifikation aus NADP und Glu(10)-b-PEG(110) ein nanopartikuläres System entwickelt wurde, welches unter physiologischen Bedingungen ausreichend stabil ist. Durch den Einbau des NIR-aktiven Farbstoffes TSC in die Partikelmatrix sind die Komplexe mittels Optical Imaging detektierbar. Neben der stabilisierenden Komponente gewährleistet die PEG-Oberfläche eine verlängerte Zirkulationszeit im Organismus, welche Voraussetzung für eine Anreicherung der Partikel durch passive Mechanismen wie den EPR-Effekt ist. NADP als potentiell Zielmolekül auf der Partikeloberfläche erweitert das System durch die Möglichkeit einer aktiven Wechselwirkung mit dem gewünschten Zielgewebe (aktives Targeting). Anhand von Abb. 42 könnte allerdings geschlossen werden, dass ein kleines Molekül wie NADP durch den sterisch raumerfüllenden PEG-Block abgeschirmt wird, wodurch die Interaktion von NADP mit einem Rezeptor beeinträchtigt wird. Berücksichtigt werden sollte aber, dass der PEG-Block in wässriger Lösung eine knäuelartige Struktur ausbildet (vgl. Abb. 51), welche sich deutlich dichter um den Partikel herum anordnet als in Abb. 42 schematisch dargestellt. Hinzu kommt, dass sich die direkt auf einer Partikeloberfläche sehr dicht gepackten PEG-Ketten zur

äußeren Partikelhülle hin aufweiten, weshalb dort eher Raum für zusätzliche kleine Moleküle ist, ähnlich dem Prinzip der dichtesten Kugelpackung bei Tensidstabilisierung. Aus den genannten Gründen ist es deshalb vorstellbar, dass die NADP-Moleküle trotz des deutlich größeren, benachbarten PEG-Blockes in der äußeren Partikelhüllschicht für eine Rezeptorinteraktion zur Verfügung stehen. Eindeutige Beweise können an dieser Stelle nur weiterführende Untersuchungen liefern.

Begünstigt werden könnte die Detektion der angereicherten Partikel im pathologischen Gewebe durch reversible Quenching-Effekte im Zuge der Desaggregation der Komplexe. Eine hohe Farbstoffbeladung des Systems ist dadurch garantiert, dass der eingeschlossene Farbstoff Teil der Partikelmatrix ist. Der besondere Aufbau des Ladungskomplexes ermöglicht durch Interaktion mit geladenen physiologischen Substanzen eine schnelle und vollständige Freisetzung des Farbstoffes, welche Voraussetzung für einen guten Fluoreszenzkontrast *in vivo* ist. Ein weiterer vorteilhafter Aspekt besteht darin, dass dieses Systems im Gegensatz zu den meisten festen Polymernanopartikel kein zusätzliches Tensid für seine Stabilisierung benötigt.

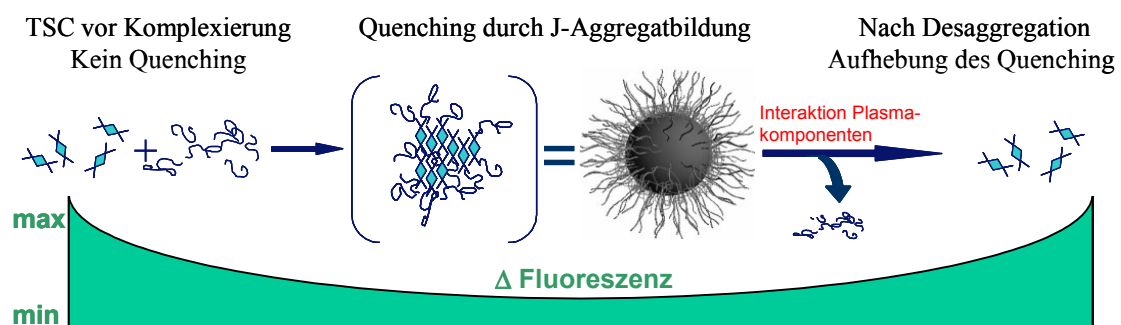


Abb. 48 Schematische Darstellung des reversiblen Quenching-Effektes; minimale Fluoreszenz bei Zirkulation der intakten J-Aggregate; maximale Fluoreszenz nach Desaggregation der Komplexe im angereicherten Gewebe

In Abb. 48 ist der Prozess des reversiblen Quenchings und der damit verbundenen variablen Fluoreszenzaktivität der Komplexe schematisch dargestellt. Ähnlich den in Kap. 2.5.2.1 beschriebenen intelligenten Farbstoffsystemen, bei denen die Fluoreszenz durch Abspaltung des Farbstoffes im Zielgewebe aktiviert wird, ist dieses System in seinem intakten Zustand aufgrund der gequenchten Fluoreszenz nur schwach detektierbar. Im Idealfall kommt es erst nach einer Anreicherung im pathologischen Gewebe zur vollständigen Desaggregation durch Interaktion mit physiologischen Komponenten. Aufgrund des dabei auftretenden reversiblen Quenchings wird die Fluoreszenz im Zielgewebe detektierbar.

Bereits in der Zirkulation desaggregierte Komplexe werden vermutlich sehr schnell aus dem Kreislauf eliminiert und stehen somit für eine Kontrastierung nicht mehr zur Verfügung. Durch Verdünnungseffekte im Blut sollten aber keine lokal hohen Konzentrationen auftreten, welche den eigentlichen Kontrast im Zielgewebe überdecken könnten.

Mit den dargestellten Ergebnissen wurden die Grundlagen geschaffen, dieses System in zukünftigen Untersuchungen auf seine Anwendbarkeit in vivo zu prüfen. Eine einfache aber sehr charakteristische Analytik in vitro und in vivo machen diese Nanopartikel zu einem interessanten Testsystem für selbstaggregierende nanopartikuläre Ladungskomplexe. Es stellt eine alternative Nanopartikelformulierung dar, welche beispielsweise für diagnostische Anwendungen Vorteile gegenüber festen Polymernanopartikeln aufweist. Durch eine gezielte Modifikation der Oberfläche können die Eigenschaften des Systems den jeweiligen Anforderungen angepasst werden.

Der Einfluss alternativer kationischer Polymere auf dieses System wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.1.2 Modifikation der Polymerkomponente

4.1.2.1 PEG-Polyethylenimin-Tetrasulfocyanin-Komplexe

In Kap. 4.1.1.3d) wurde gezeigt, dass die Verwendung eines PEG-Blockes auf der kationischen Oberfläche von PEI-TSC-Komplexen zu einer deutlichen Steigerung der Stabilität in Mausplasma führt (vgl. Abb. 40 und Abb. 47). Aus der Literatur ist bekannt, dass Blockcopolymere, bestehend aus einem geladenen Polyelektrolyt-Block und einem ungeladenen PEG-Block, entgegengesetzt geladene Polyelektrolyte komplexieren können [168]. Dabei kommt es zur Ausbildung mizellarer Systeme, welche gegen die wässrige Phase durch den nicht komplexierten hydrophilen PEG-Block abgegrenzt werden. Durch den folgenden Versuch sollte getestet werden, ob der Farbstoff TSC mit Hilfe eines solchen Blockcopolymers ein mizellares System ausbildet und inwiefern sich daraus Vorteile gegenüber den PEI-TSC-Komplexen ergeben.

a) Komplexierung von TSC mit PEG(113)-b-PEI(30)

Die Partikelpräparation erfolgte aus einer 0,01%igen wässrigen Lösung des Blockcopolymeres PEG(113)-b-PEI(30) und TSC. Bei diesem Blockcopolymer handelt es sich um ein Diblockpolymer, bestehend aus einem ca. 5000 Da großen PEG-Block und einem in sich verzweigten PEI-Block von etwa 1300 Da.

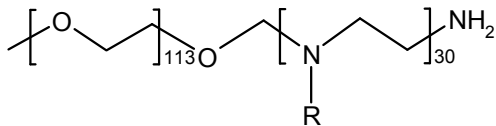


Abb. 49 Strukturformel PEG(113)-b-PEI(30) = Polyethylenglycol(113)-block-Polyethylenimin(30); PEI-Block besteht aus 30 verzweigten Untereinheiten PEI (mit R=H oder Polyethylenimin)

PEG-PEI-TSC-Nanopartikel mit einer akzeptablen Verteilung (Polydispersitätsindex $\leq 0,2$) konnten mit einem PEI-Ladungsunterschuss von 10% bis zu einem PEI-Ladungsüberschuss von 50% hergestellt werden (siehe Abb. 50). Ein weiterer Ladungsunterschuss oder Ladungsüberschuss des Polymers führte zu jeweils größeren Agglomeraten oder zur Solvatisierung der TSC-Moleküle (vgl. Kap. 4.1.1.1). Alle Zusammensetzungen, welche zu stabilen Komplexen führten, hatten einen Durchmesser um 250 nm. Dabei wurden durch einen größeren Polymerüberschuss tendenziell kleinere Partikelgrößen erzielt.

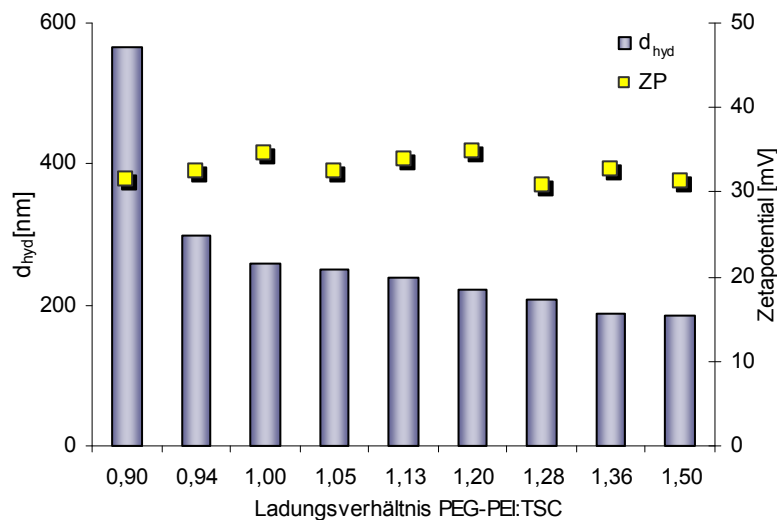


Abb. 50 Partikeldurchmesser d_{hyd} und Zetapotential der PEG-PEI-TSC-Nanopartikel entsprechend der Zusammensetzung

Bei der Bestimmung des Oberflächenpotentials 24 h nach Partikelherstellung war auffällig, dass auch bei einem rechnerischen Unterschuss an PEI-Ladungen ein Zetapotential von

+30 mV gemessen wurde. Anscheinend fand bei diesem Blockcopolymer keine 1:1 Komplexierung der Ladungen im Komplex statt.

Der hydrophile und nicht komplexierte PEG-Block ist in dem mizellaren System nach außen gerichtet und grenzt die Partikel so gegen die wässrige Phase ab (Kern-Hülle-Modell). Auf der Grundlage von molekulardynamischen Dehnungssimulationen ist bekannt, dass PEG-Ketten in Wasser elastische Eigenschaften besitzen. Diese basieren auf der Ausbildung von helixähnlichen Strukturen, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten PEG-Monomeren stabilisiert werden [169]. Die darauf beruhende Verknäuelung des PEG-Blockes erzeugt eine raumerfüllende Struktur die in der Lage ist, um den kationischen PEI-Block zu schwingen (Abb. 51)

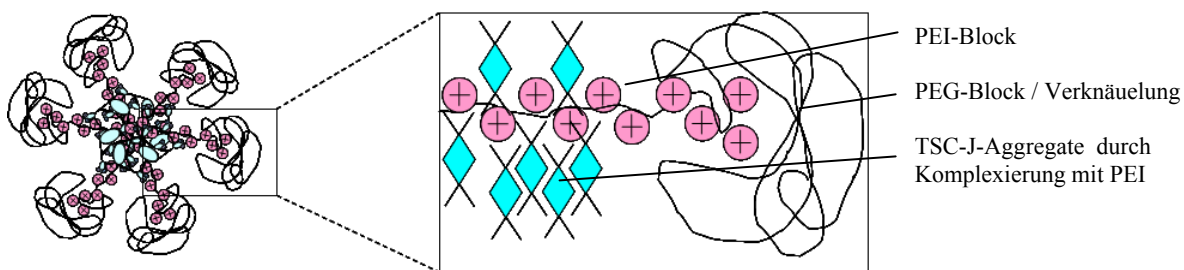


Abb. 51 Schematische Darstellung der dynamischen PEG-Ketten auf der Komplexoberfläche

Es ist vorstellbar, dass durch diese Dynamik nahe dem PEG-Block befindliche PEI-Ladungen aus dem Kernbereich des mizellaren Ladungskomplexes herausgezogen wurden. Die bereits eingeschlossenen Farbstoffmoleküle konnten den Komplex trotz unvollständiger Komplexierung nicht verlassen, da die in der Partikelhülle „freien“ PEI-Ladungen als eine Ladungsbarriere fungierten. Deshalb wurde auch ein positives Oberflächenpotential von +30 mV gemessen, obwohl ein rechnerischer Überschuss negativer Ladungen vorlag. Im Inneren des Komplexes hatte nach dieser Hypothese keine 1:1 Komplexierung der Ladungen stattgefunden.

In Kap. 4.1.1.1 wurde festgestellt, dass stabile nanopartikuläre Ladungskomplexe mit dem schwachen Polyelektrolyten TSC nur ausgebildet werden können, wenn das verwendete PEI ein ausreichendes Molekulargewicht und somit eine entsprechende Kompaktheit der Ladungen besitzt. Dennoch konnten mit dem Blockcopolymer PEG-PEI, welches nur einen PEI-Block von 1300 Da hat, erfolgreich Ladungskomplexe hergestellt werden. Durch die besondere Struktur des mizellaren Systems wird dem niedrigmolekularen PEI vermutlich eine kompaktere Struktur im Kern der Aggregate aufgezwungen, wodurch eine Komplexbildung

erst ermöglicht wird. Begünstigt wird diese auch aufgrund der sterischen Stabilisierung und Abschirmung des Partikelkerns durch den PEG-Block.

Die Stabilitätsprüfung der PEG-PEI-TSC-Komplexe erfolgte durch eine Inkubation in Mausplasma und die anschließende Aufnahme der Absorptionsspektren (vgl. Abb. 40).

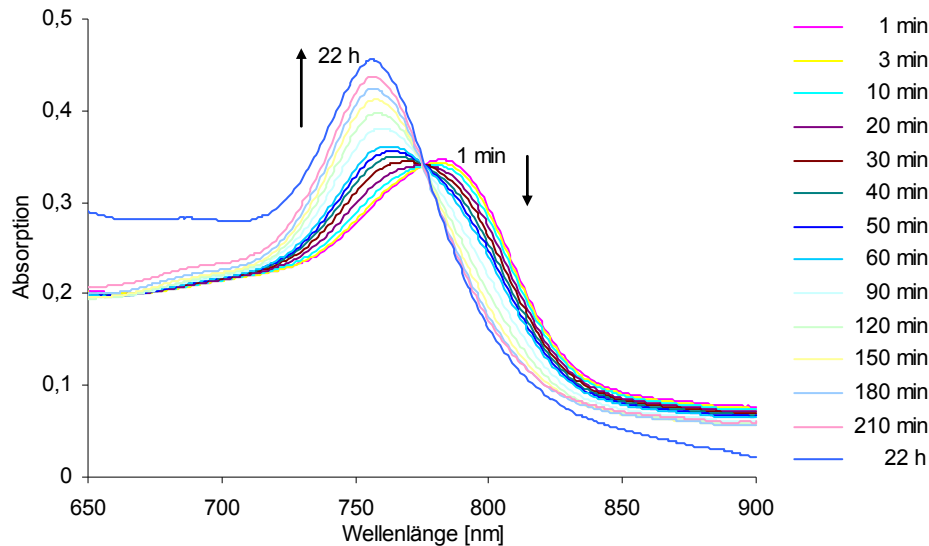


Abb. 52 Absorptionsspektren des Desaggregationsprozesses der PEG-PEI-TSC-Nanopartikel nach Inkubation in Plasma über 22 h

Anhand der in Abb. 52 dargestellten Absorptionsspektren ist zu erkennen, dass sich alle Kurven in einem so genannten isobestischen Punkt schneiden. Dieser kennzeichnet den Punkt eines Absorptionsspektrums (λ_i), an dem zwei Spezies mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima (TSC = $\lambda_1 = 756$ nm, J-Aggregate = $\lambda_2 = 795$ nm) die gleiche molare Absorption bzw. Extinktion besitzen, wobei gilt:

$$\Delta E \lambda_i (t) = 0 \text{ bzw. } E1 = E2 \quad \text{Gl.4-1}$$

Isobestische Punkte können in Zweikomponentensystemen sowie in echten Gleichgewichten auftreten. Mit Hilfe des isobestischen Punktes kann bewiesen werden, dass aus einem Ausgangsstoff nur ein Endprodukt entsteht. Für den konkreten Prozess der Desaggregation der J-Aggregate (PEG-PEI-TSC-Komplexe) bedeutet dies, dass keine Zwischenprodukte gebildet wurden, sondern exakt zwei Zustände mit zwei entsprechenden Wellenlängenmaxima nebeneinander existierten bzw. direkt ineinander übergingen. Der als J-Aggregat gebundene Farbstoff mit einem Wellenlängenmaximum von 795 nm wurde somit durch Desaggregation in Plasma wieder direkt in die freie ungebundene Form mit einem Wellenlängenmaximum von 756 nm überführt.

Die Auswertung der Spektren belegt, dass bereits nach ca. 40 min 50% der Partikel einer Desaggregation unterlagen, welche nach 210 min fast vollständig abgeschlossen war. Der Spektrenvergleich der Messzeitpunkte 210 min und 22 h macht deutlich, dass in diesem Zeitraum nur noch geringfügige Veränderungen stattgefunden haben. Resultat ist eine im Vergleich zu unmodifizierten oder ausschließlich mit NADP modifizierten Partikeln erhöhte Stabilität in Mausplasma, denn die Halbwertszeit dieser Systeme lag im Bereich von wenigen Minuten (vgl. Abb. 40). Eine Verbesserung der Halbwertszeit von 2,6 h der oberflächenmodifizierten PEI-TSC-Komplexe (siehe Abb. 47) konnte demzufolge mit diesem System nicht erreicht werden, sondern wurde noch deutlich unterschritten.

b) Komplexierung von TSC mit PEI_{40 kDa}-g-PEG_{350 Da}(20)

Im Gegensatz zu dem im vorherigen Abschnitt verwendeten Diblockcopolymer wurden bei der Herstellung dieses Polymers zwanzig PEG-Blöcke von je 350 Da auf einen PEI-Block mit einem Molekulargewicht von 40 kDa aufgepfropft.

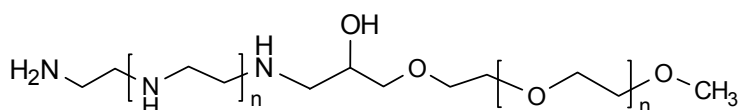


Abb. 53 Strukturformel von PEI_{40 kDa}-g-PEG_{350 Da}(20) = Polyethylenimin_{40 kDa}-grafted-Polyethylen-glycol_{350 Da}(20); Polyethylenimin 40.000 Da mit 20 PEG-Ketten á 350 g/mol

Unter analogen Voraussetzungen vorangegangener Versuche war eine Partikelherstellung möglich. Die Partikelgrößen der stabilen Partikelpopulationen lagen zwischen 100 nm und 200 nm und es wurde ein Oberflächenpotential von ca. +30 mV bestimmt. Die Vielzahl der kleinen PEG-Blöcke bewirkte allerdings keine bessere sterische Stabilisierung, wie aus Abb. 54 zu erkennen ist. Die vollständige Desaggregation der Partikel in Mausplasma war bereits nach 25 min Inkubationszeit abgeschlossen. Offensichtlich sind diese PEG-Blöcke zu klein für eine ausreichend starke Abschirmung der Ladungskomplexe vor Plasmakomponenten. Deshalb kam es zu einer schnellen Desaggregation in Plasma, wie sie auch bei unmodifizierten Partikeln zu beobachten war.

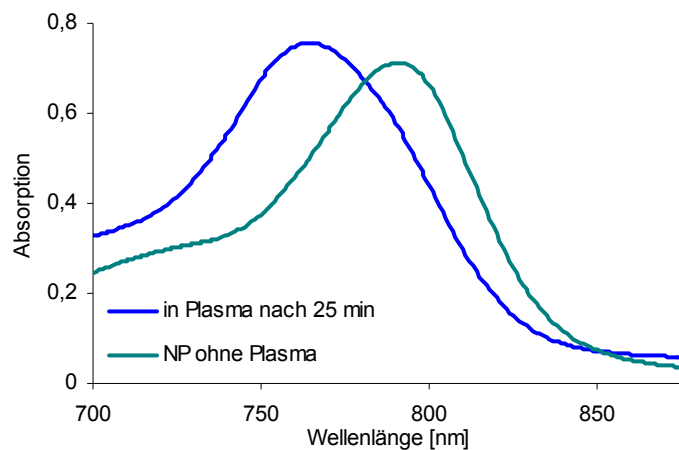


Abb. 54 Absorptionsspektren der intakten PEG-PEI-TSC-Nanopartikel und 25 min nach Inkubation Plasma (Desaggregation)

Die in diesem Kapitel behandelten PEG-PEI-TSC-Komplexe bieten nur geringfügige Vorteile gegenüber den zuvor beschriebenen Komplexen. Eine weitere Untersuchung wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

4.1.2.2 Nanopartikel aus kationischer Stärke und Tetrasulfocyanin

Eine interessante Alternative zu PEI ist die im folgenden Kapitel verwendete kationisch modifizierte Stärke. Der integrierte kationische Block besitzt einen Anteil von 54% und sollte analog der Komplexierung von PEI den anionischen NIR-Farbstoff TSC in einen nanopartikulären Ladungskomplex einbinden. Der Ladungsträger ist das Chlorid-Salz eines quartären Amins, dessen Ladung permanent und unabhängig vom pH-Wert für eine Komplexierung zur Verfügung steht.

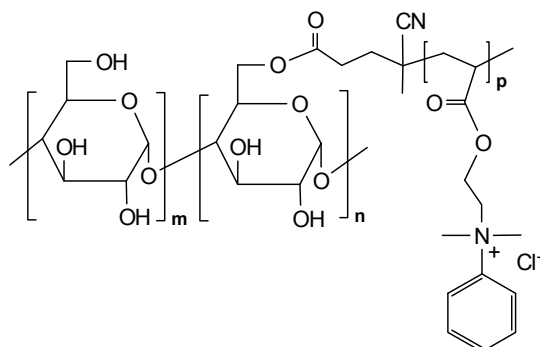


Abb. 55 Strukturformel von kationischer Stärke: G-MADAM-BQ-St 20 = N-Methacryloyloxyethyl-N,N-dimethyl-N-benzylammoniumchlorid-Stärke (54 % kationischer Anteil); synthetisiert am Fraunhofer IAP, Golm [171]

Die Verwendung von kationischer Stärke ermöglichte unter Einhaltung geeigneter Ladungsverhältnisse die Herstellung von Stärke-TSC-Komplexen mit Partikelgrößen um 250 nm. Entsprechend dem eingesetzten Polymerüberschuss variierte das gemessene Oberflächenpotential zwischen +35 mV und +60 mV. Teilweise kam es zur Bildung von Partikelpopulationen mit einer breiteren Verteilung bzw. polydispersen Aggregaten (PI 0,2-0,3). Der Grund dafür war vermutlich, dass die gegenüber Wasser erhöhte Viskosität einer Stärkelösung zu einer deutlichen Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeit führte. Eng verteilte Partikelpopulationen konnten dementsprechend nicht ausgebildet werden, da die Voraussetzung hierfür schnelle Diffusions- und Agglomerationsprozesse sind. Eine Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit durch hohe Energieeinträge mit Hilfe von Rührgeräten wirkte sich negativ aus, da teilweise die Bildung makroskopischer Polymeraggregate begünstigt wurde.

Das Wellenlängenmaximum der J-Aggregate lag bei Polymerladungsüberschuss um 780 nm und damit ca. 15 nm unterhalb der PEI-TSC-Komplexe. Veränderte Ladungsabstände bzw. eine andere Polymerstruktur sind als mögliche Ursachen hierfür zu nennen. Weiterhin haben Stabilitätsprüfungen in Plasma gezeigt, dass diese Komplexe eine gegenüber PEI-TSC-Komplexen geringfügig erhöhte Halbwertszeit von ca. 25 min haben.

In dem folgenden Schritt wurde geprüft, wie sich die Partikelstabilität bei einer Ladungstitration verhält. Für die Ladungstitration wurde β CDPO₄ verwendet (vgl. Kap. 4.1.1.3b). Die Charakterisierung der oberflächenmodifizierten Partikel erfolgte ca. 24 h nach Titration. Die Veränderung der Partikelgröße und des Oberflächenpotentials infolge der Titration sind in Abb. 56 dargestellt.

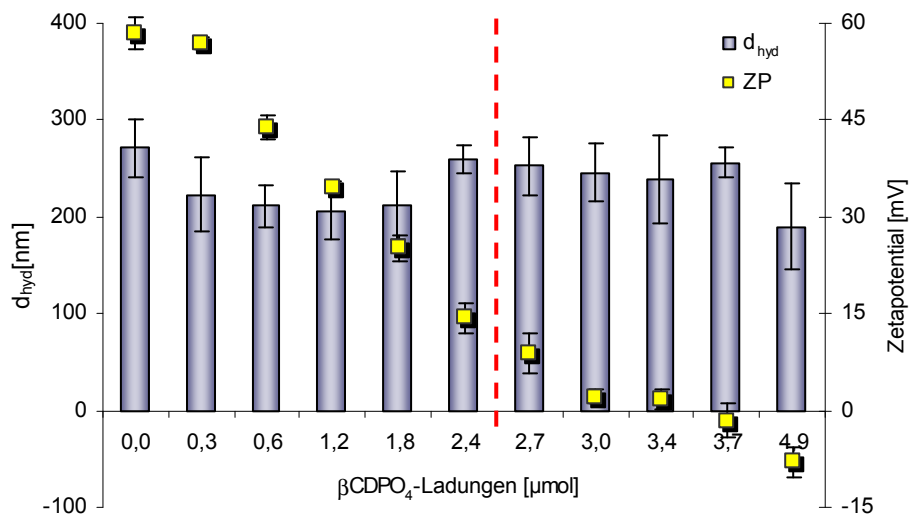


Abb. 56 Partikeldurchmesser d_{hyd} und Zetapotential der Stärke-TSC-NP nach Titration mit β CDPO₄

Bis zum Titrationsschritt 2,4 μ mol kam es zu einer Komprimierung der Ladungskomplexe. Diese spiegelt sich zum einen in der geringeren Partikelgröße und zum anderen in einer kompakteren molekularen Packung des Farbstoffes wieder. Nachweisbar ist letztere durch eine weitere bathochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums der J-Aggregate (siehe Abb. 58) sowie einen verstärkten Quenching-Effekt. Der zusätzliche Quenching-Effekt wird durch die Abnahme der absoluten Absorption belegt (siehe Abb. 57). Ab dem Titrationsschritt 2,4 μ mol kam es aufgrund der Verringerung des Zetapotential auf ca. +12 mV zu einer elektrostatischen Destabilisierung, ersichtlich in der Zunahme der Partikelgröße. Die Neutralisierung der Ladungen der Partikeloberfläche führte neben der Destabilisierung zu einer Komplexaufweitung. Daraus resultierten die Abnahme der Quenching-Effekte, eine entsprechende Zunahme der Absorption und eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums. Bei vollständiger Ladungsneutralität auf der Partikeloberfläche kam es zu einer Umstrukturierung der bestehenden Komplexe. Der Farbstoff wurde bei Titration mit 3,7 μ mol β CDPO₄ komplett substituiert und neue Komplexe wurden aus β CDPO₄ und kationischer Stärke gebildet.

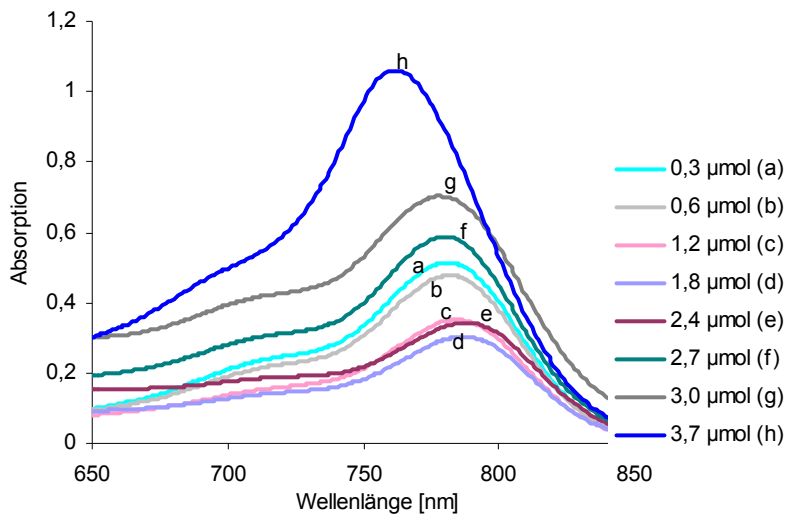


Abb. 57 Absorptionsspektren der Stärke-TSC-Komplexe 24 h nach Titration mit β CDPO₄

Der oberflächenmodifizierte Komplex (e) mit einem Zetapotential von +12 mV und einem akzeptablen Partikeldurchmesser von 260 nm war 24 h nach Titration vollständig intakt. Als Beweis dient das Absorptionsspektrum der J-Aggregate mit dem Wellenlängenmaximum bei λ_{max} 788 nm.

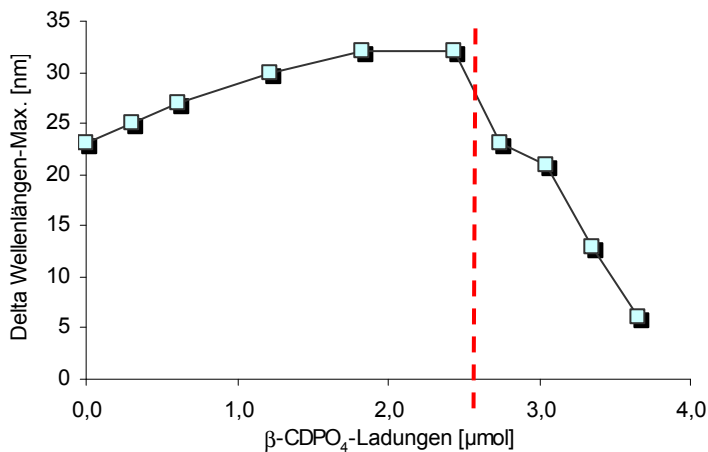


Abb. 58 Verschiebung des Wellenlängenmaximums durch Titration mit β CDPO₄; bis zur Zugabe von 2,5 µmol bathochrome Verschiebung (Komplexverdichtung); anschließend Desaggregation der Komplexe (hypsochrome Verschiebung bis zur Ausgangswellenlänge)

Fazit: Eine Oberflächenmodifikation der Stärke-TSC-Komplexe durch Ladungstitration mit β CDPO₄ war erfolgreich, sofern die Ladungen auf der Partikeloberfläche nicht vollständig neutralisiert wurden. Unter diesen Bedingungen hatte das modifizierte System eine ausreichende Stabilität, weshalb in vitro eine zusätzlich sterisch stabilisierende Komponente

auf der Oberfläche nicht notwendig war. Neben der entscheidenden Komplexstabilität ist eine höhere Farbstabilität der Komplexe als positiver Aspekt zu erwähnen. Für eine gute Plasmastabilität ist allerdings die Kombination mit einer PEG-Oberfläche zu bevorzugen.

4.1.3 Modifikation der Farbstoffkomponente

4.1.3.1 Verwendung eines Farbstoff-Carbonsäure-Derivates

Die Stabilität eines Ladungskomplexes wird entscheidend durch die Ladungsstärke, Ladungsdichte und die Wasserlöslichkeit der zu komplexierenden Verbindungen beeinflusst (siehe Kap. 2.3.1). Je weniger polar die Substanz ist, desto stärker gehen hydrophobe Effekte und van der Waals-Kräfte in die Komplexstabilität mit ein. TSC ist als schwacher Ladungsträger einzustufen, der aufgrund seiner Molekülstruktur verglichen mit Polyelektrolyten eine relativ geringe Ladungsdichte besitzt. Diese Ladungseigenschaften und die gute Wasserlöslichkeit begünstigen deshalb eine Substitution des Farbstoffes im Komplex bei Anwesenheit von stärkeren Ladungsträgern, wie im Kapitel 4.1.1.3 anhand der Oberflächenmodifikationen dargestellt wurde. Durch die Kopplung einer hydrophoben und komplexierbaren Domäne an das Farbstoffmolekül sollte die hohe Affinität zu Wasser gemindert werden und eine zusätzliche struktur- und matrixbildende Komponente die Komplexstabilität erhöhen. Weiterhin sollte der Einbau dieser Komponente eine Erhöhung der Ladungsabstände zwischen Farbstoff und Polykation bewirken. Ziel war die Minimierung der Quenching-Effekte sowie eine Verbesserung der Komplexstabilität.

Von Carbonsäuren entsprechender Kettenlänge ist bekannt, dass sie flüssigkristalline Phasen in kolloidalen Dispersionen durch Komplexierung mit PEI ausbilden [170]. Sie schienen daher geeignet, als zusätzliche Domäne an den Farbstoff gekoppelt zu werden. Es wurde die in Wasser unlösliche Laurinsäure verwendet, welche mit einer C12-Kette einen ausreichend hydrophoben Charakter besitzt. Die Synthese des TSC-Carbonsäurederivates erfolgte in der Abteilung Medical Chemistry der Schering AG.

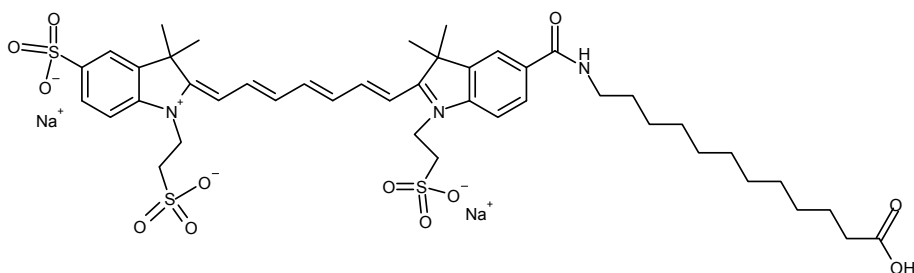


Abb. 59 TSCCS=TSC-Carbonsäurederivat

Das in Abb. 59 dargestellte TSC-Carbonsäurederivat ist wasserlöslich und konnte analog der Herstellungsmethode für PEI-TSC-Ladungskomplexe komplexiert werden. Eine Partikelherstellung war auch dann möglich, wenn zusätzlich reine Laurinsäure (LS) im Gemisch mit dem TSC-Carbonsäurederivat für die Komplexierung mit PEI verwendet wurde. Die hergestellten nanopartikulären Ladungskomplexe waren elektrostatisch durch eine PEI-Hülle stabilisiert und besaßen Partikelgrößen zwischen 170 nm und 340 nm. Bei der Bestimmung des Zetapotentials wurden Werte zwischen +45 mV und +55 mV gemessen. Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von PEI-TSCCS-Komplexen ist in Abb. 60 dargestellt.

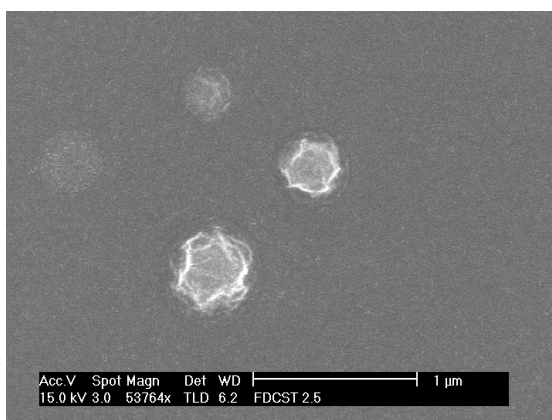


Abb. 60 REM-Aufnahme von PEI-TSCCS-Komplexen

Anhand von Abb. 60 ist erkennbar, dass sphärische nanopartikuläre Komplexe vorlagen. Eine REM-Darstellung von Partikeln mit kleinerem Durchmesser war schwierig, da es sich nicht um feste Polymernanopartikel sondern Ladungsaggregate mit geringem Polymergehalt handelte, deren Struktur durch den Elektronenstrom leicht deformiert wurde. Der hellere Kranz in der Aufnahme ist vermutlich auf eine Anreicherung der Laurinsäure in der äußeren Partikelschicht zurückzuführen. Ein derartiger Effekt konnte bei PEI-TSC-Komplexen nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung der PEI-TSCCS-Komplexe und PEI-TSCCS-LS-Komplexe sind in Abb. 61 und Abb. 62 dargestellt.

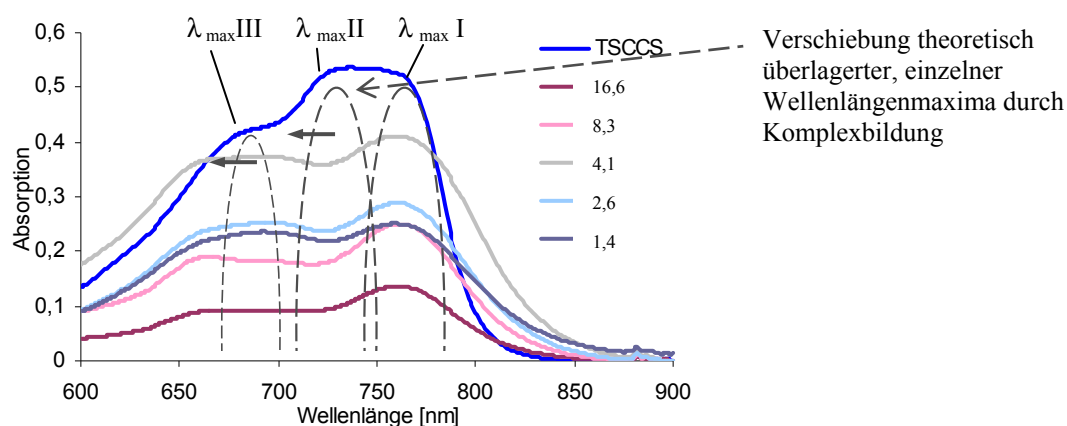


Abb. 61 Absorptionsspektren von PEI-TSCCS-Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung; Verhältnis PEI-TSCCS

Das Absorptionsspektrum der wässrigen Lösung des TSCCS-Kopplungsproduktes zeigte ein verändertes Absorptionsspektrum gegenüber dem zuvor verwendeten TSC (siehe Abb. 24). Auffällig ist das verbreiterte Maximum bei 750 nm, welches vermutlich durch die Überlagerung von zwei dicht beieinander liegenden Wellenlängenmaxima entstand (siehe schematische Ergänzungen in Abb. 61).

Das erste Maximum bei 756 nm ($\lambda_{\max I}$) ist dem Farbstoff, das zweite Maximum bei ca. 725 nm ($\lambda_{\max II}$) einem Effekt der Carbonsäure zuzuordnen. Ausgelöst durch die Komplexbildung kam es zu einer hypsochromen Verschiebung des zweiten Maximums von 725 nm zu ca. 700 nm. Ein drittes erkennbares Wellenlängenmaximum verschob sich leicht von 680 nm zu 655 nm.

Erklärbar ist diese hypsochrome Verschiebung durch eine Komplexbildung basierend auf der Wechselwirkung zwischen Carbonsäure-Rest und PEI. Die Wechselwirkung der TSC-Moleküle mit PEI wurde dadurch derart verändert, dass eine J-Aggregatbildung nicht mehr stattfand. Beweis ist die fehlende bathochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums des Farbstoffes bei 756 nm ($\lambda_{\max I}$). Ein steigender TSCCS-Anteil führte vor allem zu einer Zunahme der Absorption, jedoch nicht zu einer Veränderung der Spektren (Abb. 61).

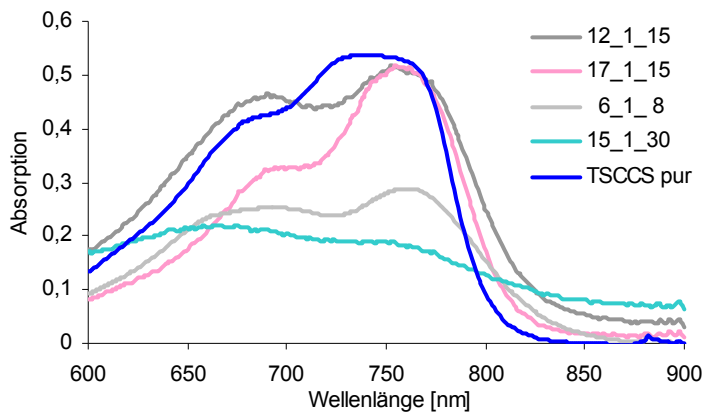


Abb. 62 Absorptionsspektren von PEI-TSCCS-LS(Laurinsäure)-Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung; in der Legende sind angegeben die Ladungsäquivalente der eingesetzten Komponenten in der Reihenfolge: PEI_TSCCS_LS

Auch mit Hilfe von Abb. 62 kann belegt werden, dass die Carbonsäure die Ursache der hypsochromen Verschiebung in den Spektren ist. Der Unterschied zwischen den Komplexen dieser Spektren bestand v.a. darin, dass variierende Mengen reiner Laurinsäure (LS) zusätzlich mit komplexiert wurden. Je höher der Laurinsäure-Anteil war, desto stärker ausgeprägt war die hypsochrome Verschiebung der beiden unterhalb von 750 nm liegenden Maxima (siehe Spektrum 15_1_30). Das dem Farbstoff zugehörige Wellenlängenmaximum bei 756 nm (λ_{max}) blieb dagegen unverändert. Die Charakterisierung von Partikelgröße und Oberflächenpotential der Komplexe aus Abb. 62 ist in Abb. 63 dargestellt.

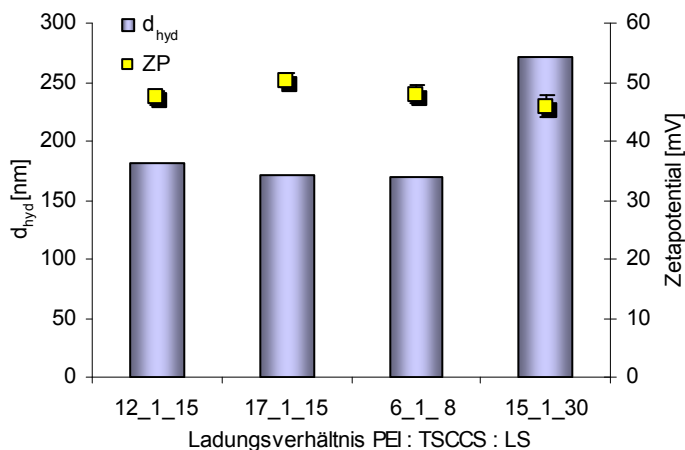


Abb. 63 Partikeldurchmesser d_{hyd} und Zetapotential von PEI-TSCCS-LS-Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung

Bei allen dargestellten Komplexen wurde ein positives Zetapotential zwischen + 45 mV und +55 mV gemessen. Demzufolge fand eine elektrostatische Stabilisierung der Oberfläche

durch die kationischen Ladungen des PEIs statt. Anhand der rechnerischen Verhältnisse der eingesetzten Ladungen lag jedoch ein Überschuss an negativen Ladungen vor. Wahrscheinlich kam es nicht zu einer vollständigen Komplexierung der negativen Ladungen im Komplex. Die seitlich an das Molekül gekoppelte Aminododecansäure könnte das durch sterische Effekte verhindert haben.

Die in den Spektren der Abb. 61 und Abb. 62 beobachteten Verschiebungen sind weniger charakteristisch als die Verschiebungen der zuvor beschriebenen J-Aggregate. Deshalb entfällt bei diesen Systemen die Möglichkeit, die Plasmastabilität der Proben mit Hilfe von Absorptionsspektren zu untersuchen. Festgestellt wurde, dass eine verbesserte Farbstabilität gegenüber den PEI-TSC-Komplexen vorlag. Vermutlich ist dieser Effekt auf größere Ladungsabstände zwischen Farbstoffmolekül und Polykation zurückzuführen.

Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass im Falle einer zusätzlichen komplexierenden Komponente am Farbstoffmolekül (hydrophobe Laurinsäure) die J-Aggregatbildung unterdrückt wird. In den Absorptionsspektren zeichnen sich deutlich die entsprechend stark veränderten physikochemischen Eigenschaften der Komplexe ab. Weiterführende strukturaufklärende Untersuchungen dieser Komplexe waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4.1.3.2 Verwendung eines alternativen NIR-Farbstoffes

Der NIR-Farbstoff Indocyaningrün (ICG) ist als ICG-Pulsion[®] ein im europäischen Raum zugelassenes intravenöses Diagnostikum mit Anwendung in der Herz-Kreislauf-, Mikrozirkulations- und Leberfunktionsdiagnostik [172]. Aufgrund seiner begrenzten Stabilität im wässrigen Medium [173] wird das kommerziell verfügbare Lyophilisat erst kurz vor Injektion gelöst. Von Saxena et al. wurde gezeigt, dass sich eine Verkapselung von ICG in PLGA-Nanopartikel positiv auf die Stabilität in wässriger Lösung auswirkt [174]. Nachteilig sind die geringe Verkapselungseffizienz des hydrophilen Farbstoffes in der hydrophoben Partikelmatrix sowie die durch Polymerabbau gesteuerte langsame Freisetzung. Basierend auf der hohen Strukturverwandtschaft mit TSC sollte überprüft werden, ob sich dieser Farbstoff analog dem beschriebenen TSC in einen Ladungskomplex überführen lässt und welche Vorteile sich daraus gegenüber den bereits untersuchten TSC-Komplexen ergeben.

Es wurde versucht, ICG analog der Herstellung der PEI-TSC-Ladungskomplexe mit PEI zu komplexieren. Unabhängig von den eingesetzten Ladungsverhältnissen konnten keine

nanopartikulären Ladungskomplexe hergestellt werden. Ursache ist vermutlich die geringere Ladungsstärke des ICG im Gegensatz zu TSC. Eine Erklärung bietet der Vergleich der beiden Strukturformeln (siehe Abb. 64 und Abb. 65)

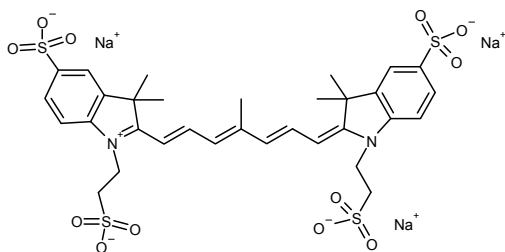


Abb. 64 Tetrasulfocyanin (TSC)

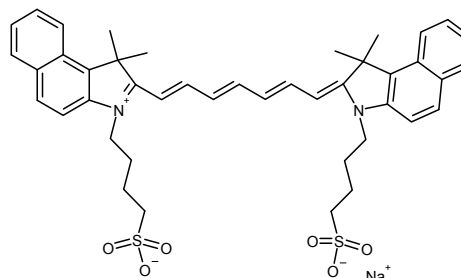


Abb. 65 Indocyaningrün (ICG)

Das ICG-Natrium Salz besitzt nur zwei geladene Sulfonat-Gruppen, wovon eine durch eine interne Ladung ausgeglichen wird und damit offenbar nicht für eine Komplexierung zur Verfügung steht. TSC hingegen hat nach Abzug der internen Ladung noch drei gleichmäßig am Molekül verteilte Ladungen für einen Komplexpартner frei verfügbar. Es wurde deshalb geschlussfolgert, dass ICG aufgrund zu geringer elektrostatischer Wechselwirkungen zum Polykation keine nanopartikulären Ladungskomplexe mit PEI ausbilden kann. Das deckt sich mit Erkenntnissen aus der LBL (*layer by layer*)-Technik, wo davon ausgegangen wird, dass für derartige Aggregate mehr als eine Ladung am Farbstoff zur Verfügung stehen muss [175].

Im folgenden Schritt wurde deshalb getestet, ob das ladungsschwache ICG durch Co-Verkapselung mit einem anionischen Polyelektrolyten in einen solchen Ladungskomplex überführt werden kann.

Ausgewählt wurde β CDPO₄, welches durch seinen Cyclodextrin-Grundkörper in der Lage ist, molekulare Einschlussverbindungen zu bilden. Im Kap. 4.1.1.3 ist bereits beschrieben worden, dass dieses Cyclodextrin aufgrund seiner Phosphatladungen in der Lage ist, Ladungskomplexe mit PEI auszubilden. Dieser Mechanismus ist nach Ladungstitration von PEI-TSC- und KS-TSC-Komplexen beobachtet worden. In beiden Fällen hatte das ladungsstärkere β CDPO₄ jeweils das ladungsschwache TSC aus dem Komplex verdrängt und substituiert.

Vor der Herstellung des eigentlichen Ladungskomplexes wurde eine äquimolare Mischung aus β CDPO₄ und ICG für ca. 30min gerührt. Eine schematische Darstellung der möglichen Einschlussverbindung ist in Abb. 66 dargestellt.

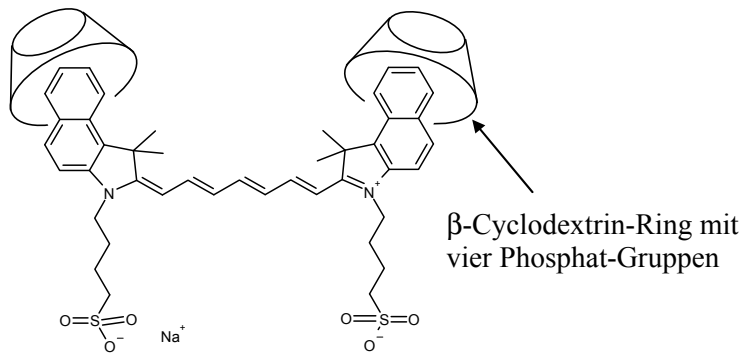


Abb. 66 Schematische Darstellung von möglichen CD-Einschlussverbindungen mit ICG

Beta-CDPO₄ besitzt einen inneren Ringdurchmesser von 0,6 bis 0,65 nm sowie eine Tiefe von 0,79 nm und ermöglicht damit den Einschluss von molekularen Strukturen, welche eine Größe von ca. 0,3 nm besitzen (siehe auch Kap. 2.3.2.2). Das entspricht ungefähr dem Durchmesser eines Benzolringes, der mit etwa 0,26 nm (2,6 Å) angegeben wird. Vorstellbar ist daher eine Komplexierung in den beiden aufgeführten Positionen. Die interne Ladung am Stickstoff begünstigt vermutlich einen Einschlusskomplex in dieser Position, weil hier eine zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung mit einem der Phosphatreste des Cyclodextrins möglich ist. Da die Molekülstruktur des ICGs in sich sehr flexibel ist und die gleichgeladenen Cyclodextrin-Ringe sich elektrostatisch abstoßen sowie sterisch behindern, ist nur von einer 1:1 Komplexierung auszugehen.

Durch Variation der eingesetzten Ladungsverhältnisse konnten stabile nanopartikuläre Komplexe sowohl mit einem kationischen Ladungsüberschuss als auch mit einem anionischen Ladungsüberschuss hergestellt werden. Die Ergebnisse der Komplexcharakterisierung hinsichtlich ihrer Partikelgröße und des Oberflächenpotentials sind in Abb. 67 dargestellt.

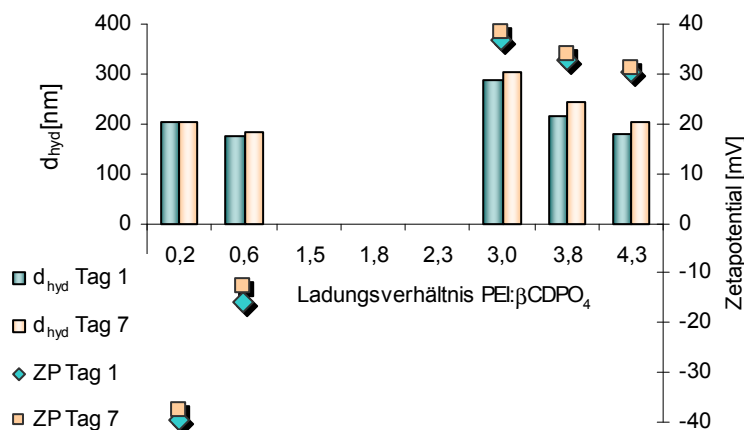


Abb. 67 Partikeldurchmesser d_{hyd} und Zetapotential der PEI-[βCDPO₄/ICG]-Komplexe

Wie aus Abb. 67 hervorgeht, führten nur bestimmte Ladungsverhältnisse zur Bildung stabiler Komplexe. Die stöchiometrischen Verhältnisse 1,5; 1,8 und 2,3 (PEI:βCDPO₄/ ICG) waren ohne ein ausreichend hohes Oberflächenpotential nicht stabil genug, wodurch es zum Ausfallen der Komplexe kam. Sofern ein Zetapotential kleiner als -15 mV bzw. größer als +30 mV vorlag, bildeten sich stabile Nanopartikel mit Partikeldurchmessern zwischen 170 nm und 300 nm. Anhand des Zetapotentials der βCDPO₄-stabilisierten Nanopartikel wird deutlich, dass bei diesen Komplexen die Höhe des Oberflächenpotentials stark durch die Menge des Ladungsüberschusses bestimmt wurde. PEI-stabilisierte Komplexe dagegen zeigten unabhängig vom Ladungsüberschuss nur geringfügige Potentialunterschiede, wie auch schon in Kapitel 4.1.1.1 gezeigt werden konnte. Abgesehen von einem geringen Partikelwachstum der PEI-stabilisierten Komplexe können diese Ladungsaggregate bei geeigneter Zusammensetzung der drei Ladungsträger als stabil eingestuft werden.

Die vollständige und dauerhafte Verkapselung des Farbstoffes durch den Hilfselektrolyten wurde durch kombinierte Filtration und Zentrifugation mit Hilfe von Centrisart Zentrifugenröhrchen überprüft. Durch eine Filterausschlussgrenze von 100 kDa wurde gewährleistet, dass der Filter für den freien ungebundenen Farbstoff durchlässig ist, jedoch nicht für die Komplexe. Bei der spektroskopischen Untersuchung des Filtrates konnte kein Farbstoff detektiert werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass er stabil im Komplex gebunden vorlag. Die Verwendung des Hilfselektrolyten βCDPO₄ behinderte in diesem System nicht die Ausbildung von J-Aggregaten, wie mit Hilfe der in Abb. 68 dargestellten Absorptionsspektren gezeigt werden kann.

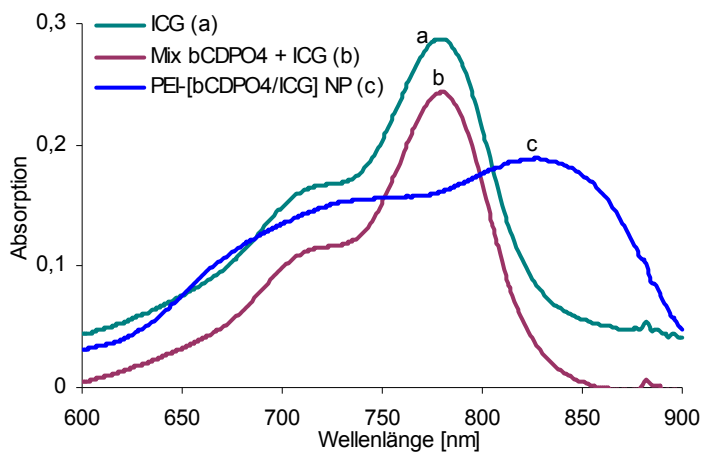


Abb. 68 Absorptionsspektren: (a) einer wässrigen ICG-Lösung, (b) einem Mix einer wässrigen βCDPO₄-Lösung mit ICG und (c) einer PEI-[βCDPO₄/ICG]-Nanopartikeldispersion

Die wässrige Lösung von ICG unterschied sich im Absorptionsspektrum nicht von dem wässrigen ICG- β CDPO₄-Gemisch. Das Spektrum der PEI-[β CDPO₄/ICG]-Komplexe zeigt dagegen die für J-Aggregate charakteristische bathochrome Verschiebung, wie sie bereits im Kapitel 4.1.1.2 beschrieben wurde. Bedingt durch die neue molekulare Packung des Farbstoffes im Komplex kam es zu einer Verschiebung des Wellenlängenmaximums um ca. 50 nm.

Fazit: Der alternativ nutzbare NIR-Farbstoff verfügt über zu wenige Ladungen, um durch den Polyelektrolyten PEI in einen nanopartikulären Ladungskomplex überführt zu werden. Durch die Verwendung eines Hilfselektrolyten wie β CDPO₄ kann dieses Ladungsdefizit mittels einer Co-Komplexierung ausgeglichen werden, wodurch stabile nanopartikuläre Komplexe hergestellt werden konnten. Bedingung dafür ist vermutlich die partielle Bildung von ICG-CD-Einschlusskomplexen, da ansonsten der Farbstoff nicht in den Komplex mit eingebunden werden würde. Aufgrund der speziellen molekularen Packung des Cyaninfarbstoffes im Komplex kam es wiederum zur Bildung von J-Aggregaten, deren Eigenschaften für eine sehr charakteristische Analytik genutzt werden können. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen PEI-TSC-Komplexen ist aber zu beachten, dass die Co-Verkapselung eines Hilfselektrolyten eine geringere Farbstoffbeladung nach sich zieht. Eine stabilere Komplexbildung, bedingt durch die höhere Ladungsstärke des Hilfselektrolyten, ist als positiver Aspekt dieses Systems festzuhalten. Auch eine Herstellung anionisch stabilisierter Komplexe wurde durch die Verwendung von β CDPO₄ möglich.

4.1.4 Zusammenfassung selbstaggregierende diagnostische Systeme

Hydrophile, gut wasserlösliche Cyaninfarbstoffe (TSC, TSCCS) wurden durch Komplexierung mit entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten (PEI, PEG-PEI, KS) in nanopartikuläre Ladungskomplexe überführt. Durch eine Modifikation der Partikeloberfläche auf der Basis von elektrostatischen Wechselwirkungen konnte die Stabilität der Komplexe in physiologisch relevantem Blutplasma entscheidend verbessert werden, wobei NADP als potientes Zielmolekül zusätzlich in diese Oberfläche integriert wurde. Durch die Bildung von J-Aggregaten ergibt sich eine charakteristische Analytik der Komplexe, welche diese Systeme zu interessanten Testsystemen für selbstaggregierende Ladungskomplexe macht. Für ähnliche therapeutische Systeme wie Polyplexe, angewandt im Bereich der nicht-viralen Gentherapie, können daraus wichtige Informationen hinsichtlich einer elektrostatischen

Oberflächenmodifikation gewonnen werden. Mit den Ergebnissen in Kapitel 4.1.1.3 d) wurden auch die Voraussetzungen geschaffen, die Eignung des Systems für diagnostische Zwecke in vivo zu untersuchen. Der eingekapselte, im NIR-Bereich fluoreszenzaktive Farbstoff ist dabei die Grundlage, solche Nanopartikel mittels Optical Imaging zu detektieren. Über die Verwendung variabler Oberflächen besteht die Möglichkeit, das Verteilungsmuster in vivo zu bestimmen, um zukünftig passive und aktive Targeting-Effekte besser steuern zu können. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zur Nutzung elektrostatischer Wechselwirkungen für Oberflächenmodifikationen liefern dafür wichtige Informationen.

Das zuvor beschriebene, neuartige kolloidale diagnostische System beinhaltet folgende Vorteile:

- effiziente Verkapselung eines hydrophilen, sehr gut wasserlöslichen NIR-Farbstoffes in einer hydrophoben, kolloidalen Matrix,
- hohe Modularität des Systems durch die Möglichkeit einer flexiblen Oberflächenmodifikation, basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen,
- intelligentes diagnostisches Farbstoffsystem, dessen Fluoreszenz während der Zirkulation im Kreislauf infolge von Quenching minimal ist, aber durch eine Desaggregation der Komplexe im angereicherten Gewebe infolge der Aufhebung des Quenching-Effektes verstärkt ist,
- relativ schnelle, vollständige Freisetzung des Farbstoffes durch die Desaggregation der Komplexe gewährleistet ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal am Ort der Partikelanreicherung.

Daraus ergeben sich folgende Vorteile für mögliche Anwendungen:

- diese Art von Systemen kann als diagnostische Grundlage für die Testung unterschiedlicher kolloidaler Oberflächenstrukturen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Verteilungsmuster am einzelnen Patienten dienen,
- eine Selektion geeigneter partikulärer Oberflächenstrukturen am Patienten für die optimale und gezielte Therapie mit kolloidalen Arzneistoffträgersystemen wird ermöglicht,

- Folge für die Therapie: Optimale Nutzung von aktivem und passivem Targeting mit kolloidalen Arzneistoffträgersystemen ermöglicht den Einsatz minimaler Arzneistoffdosen bei maximalem therapeutischen Effekt,
- Vorteil für die Prophylaxe: Je spezifischer die diagnostischen kolloidalen Systeme durch entsprechende Oberflächenstrukturen angereichert werden, desto frühzeitiger kann eine Diagnose erfolgen.

4.2 Selbstaggregierende therapeutische Systeme

Einleitung

Eine Vielzahl von Arzneistoffen ist aufgrund ihrer chemischen Struktur als Arzneistoffbase einzuordnen. Einige dieser Arzneistoffbasen sowie deren Salze zeigen ein sehr stark pH-abhängiges Lösungsverhalten. Im sauren pH-Bereich (pH 1-3) weisen diese Substanzen eine akzeptable oder auch gute Löslichkeit auf, welche entlang des intestinalen Resorptionsfensters bei pH 4,4 bis pH 7,5 drastisch abnimmt. Ein unkontrolliertes Ausfallen der freien Arzneistoffbase in diesem pH-Bereich ist die Folge. Da nach oraler Applikation der Ort der Arzneistoffresorption hauptsächlich der Dünndarm ist, treten bei diesen Arzneistoffen enorme Probleme, wie eine für die Resorption unzureichend hohe Arzneistoffkonzentration oder aber starke interindividuelle Resorptionsunterschiede, auf.

Das Problem der pH-abhängigen Löslichkeit von Arzneistoffbasen betrifft auch den Arzneistoff Vatalanib succinat (Vs) (siehe Abb. 69).

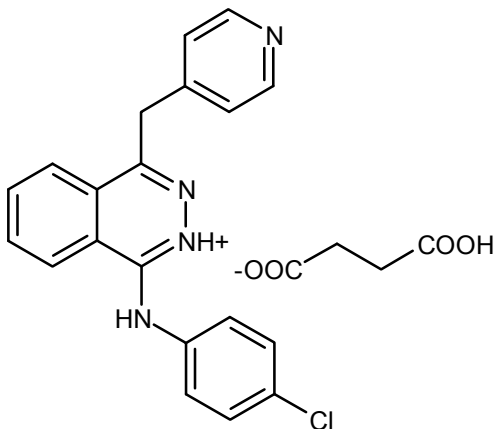


Abb. 69 Strukturformel von Vatalanib succinat

Es handelt sich um einen VEGF-Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher derzeit in klinischen Studien für den Einsatz in der Krebstherapie getestet wird. Die Löslichkeiten bei entsprechenden pH-Werten sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5 Löslichkeiten von Vatalanib succinat in Abhängigkeit von pH-Wert, Puffer und Temperatur

pH-Wert	Puffer	Löslichkeit [mg/ml]	
		37 °C	20 °C
1,0	Nein	108	
1,1	Ja		83
2,0	Nein	146	
3,0	Ja	7,9	
3,1	Ja		7,2
3,6	Nein	0,35	
3,7	Nein		0,34
4,5	Ja	0,02	
5,0	Ja	$3,7 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$
7,0	Ja	$7,1 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$

Die Inkorporierung von Vs in eine nanopartikuläre Formulierung stellt eine Möglichkeit dar, die genannte Problematik zu überbrücken. Eine höhere Sättigungslöslichkeit aufgrund kleinerer Partikeldurchmesser sowie die schnellere Auflösungsgeschwindigkeit entsprechend der größeren Oberfläche können sich positiv auf die Bioverfügbarkeit auswirken. Im Falle einer parenteralen Anwendung kann durch die Ausnutzung von passiven Targeting-Mechanismen die Substanz gezielt in pathologisch verändertem Gewebe angereichert werden (siehe Kap. 2.2.2.1). Vorteile wie eine hohe Beladung, Tensidfreiheit und eine unabhängig vom Polymerabbau steuerbare Freisetzung waren Gründe, diesen Arzneistoff in einem selbstaggregierenden nanopartikulären System durch Ladungsfällung zu formulieren. Wie schon zuvor beschrieben, können hoch geladene Ladungskomplexe sehr flexibel durch Nutzung elektrostatischer Wechselwirkungen oberflächenmodifiziert werden.

4.2.1 Nanopartikel aus Vatalanib succinat und β -Cyclodextrinphosphat

Cyclodextrine besitzen aufgrund ihrer einzigartigen Struktur die Fähigkeit, molekulare Strukturen einzuschließen. Erzielt wird unter anderem eine verbesserte Löslichkeit oder ein Schutz der Substanz vor zu schnellem Abbau (siehe Kap. 2.3.2.2). Im Falle von Vatalanib succinat (Vs) war bekannt, dass die Arzneistoffbase solche Einschlussverbindungen mit verschiedenen Cyclodextrinen durch eine entsprechende Molekülstruktur ausbilden kann. Die Tatsache, dass das anionisch modifizierte β CDPO₄ (Tetraphosphat) in einen nanopartikulären Ladungskomplex eingeschlossen werden kann, wurde bereits in Kap. 4.1.3.2 gezeigt. Ziel der

anschließenden Versuche war es, die protonierbare Arzneistoffbase Vs in einen nanopartikulären Ladungskomplex mit Hilfe des Polyelektrolyten β CDPO₄ zu überführen.

4.2.1.1 Komplexcharakterisierung: Partikelgröße, Zetapotential und Partikelgestalt

Eine Komplexierung von Vatalanib succinat (Vs) konnte durch Einspritzen einer methanolischen gesättigten Vs-Lösung (1,37%, w/v) in eine 0,1%ige β CDPO₄-Lösung erzielt werden (siehe Kap. 7.1.1.2). Für die Herstellung von Komplexen variierender Zusammensetzung wurde ein konstantes Volumen der β CDPO₄-Lösung mit steigenden Volumina der Vs-Lösung versetzt. Die Partikelgröße und der dazugehörige Polydispersitätsindex sind in Abb. 70 abgebildet.

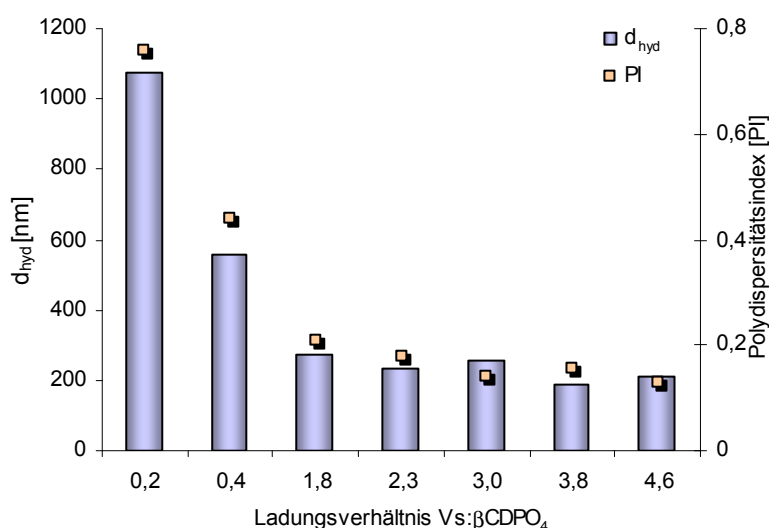


Abb. 70 Partikeldurchmesser d_{hyd} und Polydispersitätsindex (PI) von Vs- β CDPO₄-Ladungskomplexen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung

Aus Kap. 4.1.1.1 ist bekannt, dass 1:1 Ladungskomplexe mit einem schwachen Ladungspartner, wie er auch mit Vs vorliegt, keine ausreichende Stabilität besitzen und daher als makroskopische Komplexe ausfallen. Erläutert wurde auch, dass die Stabilisierung durch überschüssige Polymerladungen des PEI effektiver ist, da das Polymer im Komplexinnern verankert ist und eine schnelle Diffusion dadurch verhindert wird. Der Rückschluss dieser Ergebnisse bestand darin, dass stabile Aggregate mit Vs vermutlich durch Überschuss des ladungsstärkeren Polyelektrolyten β CDPO₄ gebildet werden.

Wie aber aus Abb. 70 hervorgeht, führte der Einsatz eines ca. zweifachen Ladungsüberschusses an β CDPO₄ zu großen und sehr breit verteilten Partikeln ($PI \geq 0,35$). Bei einer weiteren Steigerung des β CDPO₄-Überschusses kam es nicht mehr zur Ausbildung kolloidaler Ladungssaggregate. In den klaren Lösungen waren keine partikulären Komplexe per DLS bestimmbar, d.h. das Vs lag in Lösung bzw. als CD-Einschlusskomplex vor. Diese Schlussfolgerung konnte gezogen werden, weil mehr Vs eingesetzt wurde als in einer solchen wässrigen Lösung gemäß Tab. 5 hätte gelöst werden können. Interessanterweise konnten ab einem eingesetzten zweifachen Überschuss an Vs stabile und mit einem PI von 0,15 ausreichend eng verteilte Partikel hergestellt werden. Demzufolge ist für die Bildung stabiler Komplexe ein gewisser Überschuss an Vs während der Herstellung notwendig, welcher aber nicht komplett komplexiert wird. Das erklärt auch ein gemessenes Oberflächenpotential zwischen -25 mV und -60 mV, welches ein eindeutiges Indiz für eine durch Phosphatgruppen stabilisierte Oberfläche ist (siehe Abb. 72).

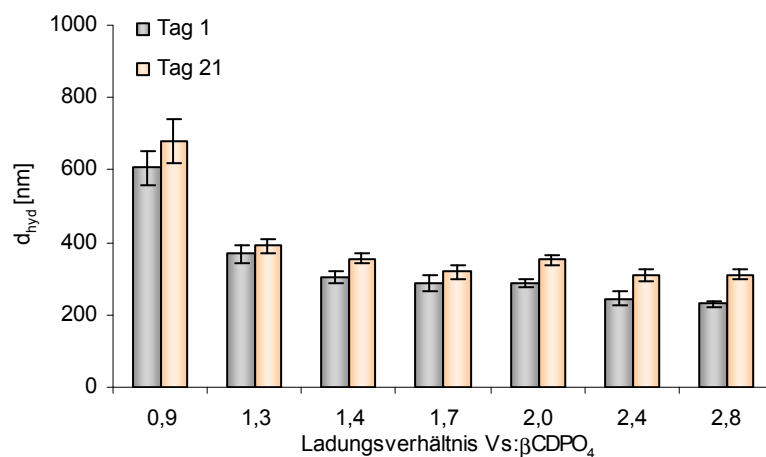


Abb. 71 Partikeldurchmesser d_{hyd} in Abhängigkeit von der Zusammensetzung: 1 Tag und 21 Tage nach Herstellung, Angabe als Verhältnis der Ladungen im Komplex

Für einen Lagerungszeitraum von 3 Wochen bei 20°C wurden die Komplexe in wässriger Lösung als stabil eingestuft, auch wenn es in einigen Zusammensetzungen zu einem geringen Partikelwachstum von ca. 30 nm kam (Abb. 71). Zu beachten ist, dass Tenside für eine zusätzliche Stabilisierung nicht verwendet wurden, jedoch optional einsetzbar sind. Das entsprechende Zetapotential dieser Komplexe ist in Abb. 72 dargestellt.

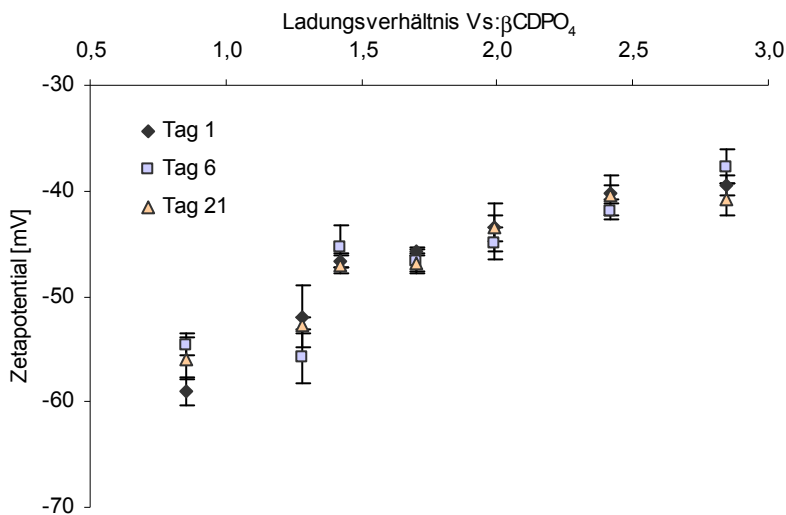


Abb. 72 Zetapotential der Vs-βCDPO₄-Komplexe in Abhängigkeit von der Zusammensetzung: 1, 6 und 21 Tage nach Herstellung; Angabe als Verhältnis der Ladungen im Komplex

Über den untersuchten Zeitraum kam es kaum zu einer Veränderung der Zetapotentiale der unterschiedlichen Komplexe. Anhand von Abb. 72 wird aber deutlich, dass die Komplexzusammensetzung stark die Höhe des resultierenden Oberflächenpotentials beeinflusste. Die Messdaten lassen den Schluss zu, dass sich ein stärkerer βCDPO₄-Überschuss auch in einem höheren negativen Oberflächenpotential widerspiegelt. Überraschend ist der Zusammenhang, dass die Partikel mit dem höchsten Oberflächenpotential nicht die kleinsten und stabilsten Aggregate bildeten, sondern in diesem Fall die größten Partikel mit der breitesten Verteilung vorlagen. Dieser Effekt ist konträr zu den sonst beobachteten Eigenschaften von Ladungskomplexen, vermutlich weil es sich um eine Kombination aus Ladungs- und Einschlusskomplex handelte.

Die REM-Aufnahmen in Abb. 73 beweisen, dass es sich bei den oben beschriebenen Komplexen um sphärische nanopartikuläre Strukturen handelt.

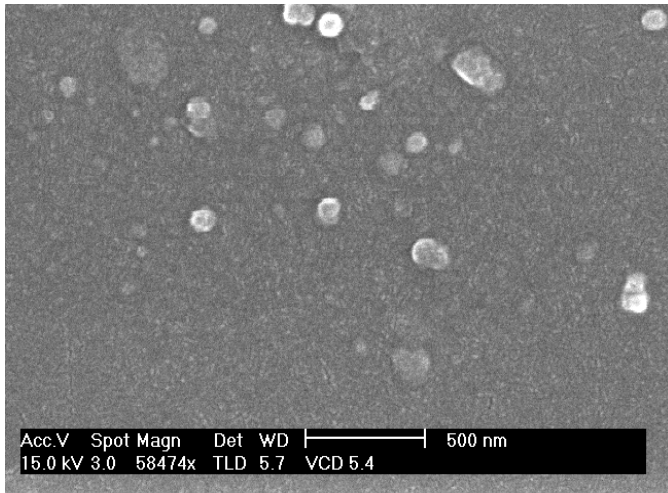


Abb. 73 REM-Aufnahme der Vs-βCDPO₄-Komplexe

Die kugelförmige Gestalt der Partikel als Voraussetzung für eine korrekte Bestimmung der Partikelgröße mittels DLS konnte damit bestätigt werden. Im REM wurde im Vergleich zur DLS eine minimal geringere Partikelgröße bestimmt. Effekte wie ein Eintrocknen der Aggregate bei der Probenvorbereitung bzw. die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers per DLS können als Ursachen dieser Größendifferenz angeführt werden (vgl. Kap. 4.1.1.1)

4.2.1.2 Komplexstabilität: Einfluss der Konzentration und der verwendeten Base

Die Herstellung von Ladungskomplexen erfordert ein Arbeiten in niedrig konzentrierten Lösungen (siehe Kap. 2.3.1). Deshalb war von Interesse, welchen Einfluss höhere Konzentrationen der Partikeldispersion auf die Stabilität besitzen.

Zu diesem Zweck wurde die Nanopartikeldispersion von 10 ml Ausgangsvolumen auf ein Volumen von 1,5 ml mittels eines Vakuumrotationsverdampfers eingeengt (35 mbar, 30°C, ca. 60 min). Ein Aufkonzentrieren durch Zentrifugation mit anschließendem Redispergieren war möglich, führte aber zu einer breiteren Verteilung der Partikel (PI 0,35). Die durch Vakuumrotationsverdampfung um etwa 65% eingeengte Partikeldispersion wurde bei 20°C gelagert und die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte über einen Zeitraum von knapp zwei Monaten.

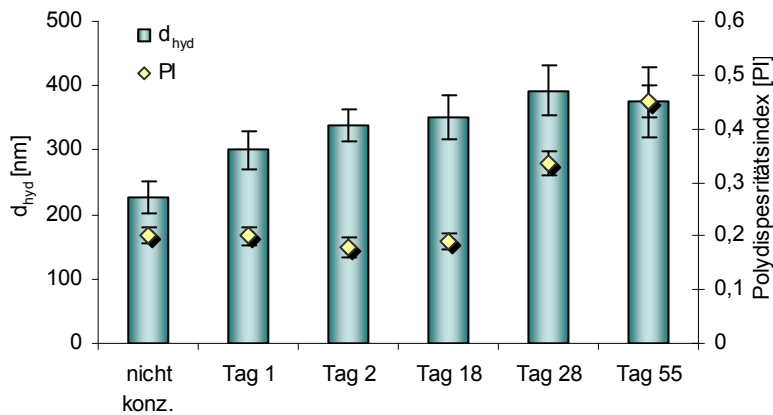


Abb. 74 Veränderung von Partikeldurchmesser d_{hyd} und Polydispersitätsindex der konzentrierten Vs- β CDPO₄-NP über einen Zeitraum von 55 Tagen

Innerhalb von 18 Tagen kam es zu einem Partikelwachstum von ca. 100 nm, wobei eine deutliche Veränderung bereits am ersten Tag festgestellt wurde. Die Agglomeration zu größeren Aggregaten deutet auf einen Stabilitätsverlust hin, welcher sich nach 28 Tagen in dem höheren PI und einem weiteren Partikelwachstum widerspiegelte.

Bei PEKs ist eine Gewinnung höherer Partikelkonzentrationen über den Herstellungsprozess nur begrenzt möglich. Untersucht wurde deshalb die Stabilität einer Partikeldispersion, bei welcher die Herstellungskonzentration der β CDPO₄-Lösung von 0,1% auf 0,2% erhöht wurde (siehe Abb. 75).

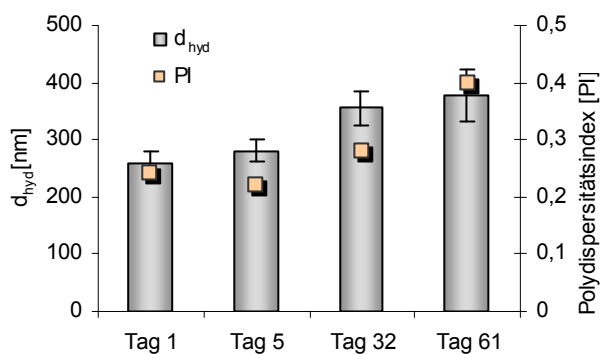


Abb. 75 Veränderung von Partikeldurchmesser d_{hyd} und Polydispersitätsindex nach verdoppelter Herstellungskonzentration über 61 Tage

Eine höhere Konzentration der Vs-Lösung konnte bei dieser Methode nicht verwendet werden, da es sich bereits um eine gesättigte methanolische Lösung handelte.

Das Stabilitätsverhalten der Partikel dieser doppelt konzentrierten Dispersion ist ähnlich den oben beschriebenen Ergebnissen in Abb. 74. Der Vergleich der Ergebnisse aus Abb. 74 und

Abb. 75 zeigt, dass bei geringfügig höheren Konzentrationen der Partikeldispersionen über den Zeitraum von 7 Tagen eine akzeptable Stabilität in wässriger Lösung ohne weiteren Tensidzusatz vorlag. Oberhalb dieses Zeitraumes wurde eine gesteigerte Tendenz zur Destabilisierung, erkennbar anhand des Partikelwachstums, beobachtet.

Alternativ zur Verwendung des Succinat-Salzes der Arzneistoffbase wurden die gleichen Komplexierungsversuche mit der reinen Base unternommen. Getestet werden sollte, ob die im Vergleich zum Salz geringere Löslichkeit der Base zur Bildung stabilerer Komplexe führt. Die aus Fällung der Base mit dem β CDPO₄ entstandenen Komplexe waren nicht stabil und lagen außerhalb des Nanometerbereiches.

Vermutet wird, dass bei der Verwendung des Salzes die noch im System befindlichen Succinat-Gegenionen als anionisches Tensid fungierten, welche im Laufe der Komplexierung und auch danach ein Kollidieren der Partikel durch zusätzliche elektrostatische Abstoßungskräfte verhinderten. Thünemann et al. beschrieben einen ähnlichen stabilisierenden Effekt durch mehrwertige Ionen (CaCl₂, FeCl₃), sofern diese als Gegenion zu der unterschüssigen Komponente im Komplexkern fungierten. Wenn sie allerdings das Gegenion zu der überschüssigen Komponente bildeten, kam es bedingt durch sekundäre Aggregation zur Agglomeration der Komplexe [77].

4.2.1.3 Einfluss simulierter intestinaler Medien auf die Komplexstabilität

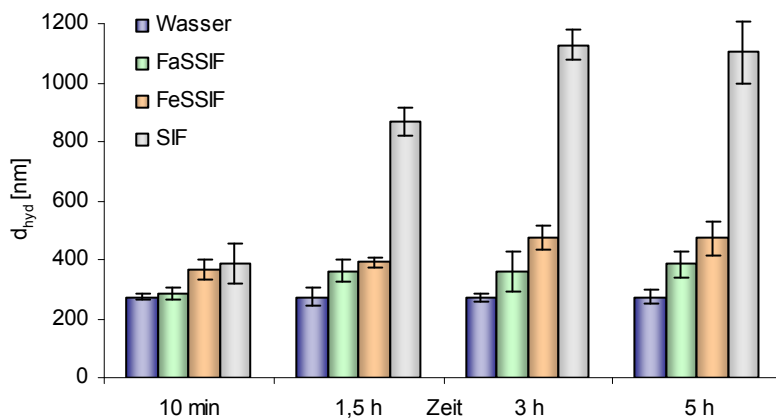
Um eine Vorhersage zur in vivo Stabilität nach oraler Applikation machen zu können, wurde das Komplexverhalten in simulierten intestinalen Freisetzungsmitteln getestet. Verwendet wurden die biorelevanten Medien FaSSIF und FeSSIF, welche eine Umgebung möglichst nah an physiologischen Bedingungen simulieren.

Die von Dressman et al. entwickelten Medien sollen die Flüssigkeit im proximalen Dünndarm sowohl im nüchternen Zustand (FaSSIF: Fasted State Simulated Intestinal Fluid) als auch im postprandialen Zustand (FeSSIF: Fed State Intestinal Simulated Fluid) nachempfinden [176][177]. Berücksichtigt wurden deshalb vor allem der pH-Wert, die Osmolalität sowie die Konzentration der enthaltenen Gallenkomponenten. Die Besonderheit gegenüber der im USP28-NF23 [179] beschriebenen simulierten Intestinalflüssigkeit (SIF) besteht in den zusätzlich enthaltenen Gallenkomponenten Natrium-Taurocholat und Lecithin. Die genauen Zusammensetzungen der Medien sind in Tab. 6 aufgelistet

Tab. 6 Zusammensetzung, Pufferkapazität und pH-Wert der simulierten intestinalen Medien

	SIF	FaSSIF	FeSSIF
KH ₂ PO ₄	0,05 M		
NaOH	15,4 mM	8,70 mM	100,97 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O		28,65 mM	
Eisessig			144,05 mM
NaCl		105,85 mM	203,18 mM
Na-Taurocholat		3 mM	15 mM
Lecithin		0,75 mM	3,75 mM
Pufferkapazität [mmol L ⁻¹ ΔpH ⁻¹]		12	76
pH-Wert	6,8	6,5	5

Für die Stabilitätsuntersuchung wurden nur gastrointestinale Medien mit pH-Werten von pH 5 bis pH 6,8 ausgewählt, da aufgrund der guten Löslichkeit von Vs bei sauren pH-Werten (pH < 3) keine nanopartikulären Ladungskomplexe mehr vorlagen. Die Partikeldispersionen wurden 1:1 mit FaSSIF, FeSSIF und zu Vergleichszwecken mit SIF versetzt und nach Inkubationszeiten von 10 min bis zu 5 h die Partikelgröße bestimmt (siehe Abb. 76).

Abb. 76 Partikeldurchmesser d_{hyd} nach Inkubation in biorelevanten Medien und SIF

Das deutliche Partikelwachstum der in SIF-inkubierten Dispersionen spiegelt eine Destabilisierung der Komplexe wider. Auslöser war vermutlich das enthaltene KH₂PO₄, welches starke Ladungswchselwirkungen mit dem im Komplex gebundenen Vs eingehen konnte. Im Vergleich dazu war die Stabilität in den biorelevanten Medien erheblich besser, auch wenn ein Partikelwachstum von 50 nm bis 100 nm zu festgestellt wurde. Offensichtlich bewirkten die enthaltenen Gallenkomponenten und das Lecithin eine Stabilisierung der

kolloidalen Ladungsaggregate. Für Lecithin ist diese Eigenschaft bekannt und wird genutzt bei der Stabilisierung von Emulsionen.

Aufgrund der Testergebnisse in biorelevanten Medien wurde geschlussfolgert, dass Vs als stabiler nanopartikulärer Vs- β CDPO₄-Komplex für eine Resorption im Dünndarm zur Verfügung gestellt werden kann. Der besondere Aufbau der Komplexe gewährleistet dabei eine Freigabe von Vs ohne vorherigen Polymerabbau, wie er bei festen Polymernanopartikeln meist in Form von Bioerosion oder Biodegradation an der Partikeloberfläche stattfindet [178]. Damit die Komplexe intakt den Dünndarm erreichen, sollte eine magensaftresistente Formulierung, beispielsweise in Form von filmüberzogenen Minitabletten oder Pellets, verwendet werden. Inwiefern mit Hilfe dieser Komplexe für Vatalanib succinat eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit bzw. eine Verringerung der Schwankungen erzielt werden kann, war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

4.2.1.4 Bestimmung der Beladungsrate / Verkapselungseffizienz

Es wurde vorab gezeigt, dass das eingesetzte Verhältnis Vs: β CDPO₄ einen entscheidenden Einfluss auf Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Oberflächenladung und Stabilität der kolloidalen Komplexe hat. In der folgenden Untersuchung wurde deshalb geprüft, ob auch die Wirkstoffbeladung der Komplexe durch unterschiedliche stöchiometrische Zusammensetzungen bei der Herstellung beeinflusst wird. Die Vs-Gehaltsbestimmung der in Abb. 77 und Abb. 78 charakterisierten Partikel erfolgte per HPLC. Das eingesetzte β CDPO₄ lag in einer konstanten Konzentration von 1 mg/ml vor.

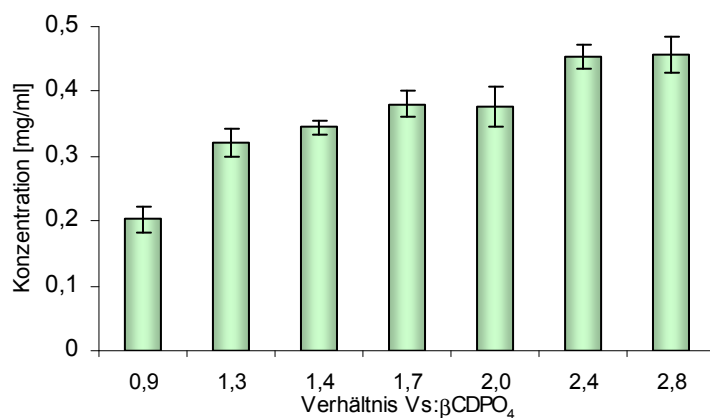


Abb. 77 Wirkstoffkonzentration Vs [mg/ml] in Abhängigkeit von der eingesetzten Zusammensetzung

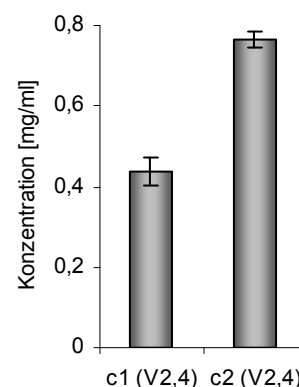


Abb. 78 Verhältnis 2,4; einfache und doppelte Startkonzentration

Aus Abb. 77 geht hervor, dass bis zu einem Ladungsverhältnis von 2,4 ($V_s:\beta\text{CDPO}_4$) eine permanente Steigerung des eingesetzten V_s auch eine Zunahme der Verkapselungsmenge zur Folge hatte. War eine Sättigung des verwendeten βCDPO_4 bezüglich der komplexierbaren Ladungen bzw. der möglichen Einschlusskomplexe eingetreten, so blieb die verkapselte Menge V_s konstant bei ca. 0,45 mg/ml. Überschüssiges V_s fiel aus und wurde durch Filtration abgetrennt. Für die Ladungsverhältnisse 2,4 und 2,8 konnte nach folgender Berechnung eine Beladung von 31% bestimmt werden.

$$\text{Beladungsrate}[\%w/w] = \frac{m(\beta\text{CDPO}_4) + m(V_{s,\text{verkapselt}})}{m(V_{s,\text{verkapselt}})} \times 100 \quad \text{Gl.4-1}$$

Bei einem Molekulargewicht des βCDPO_4 von 1542 g/mol und V_s von 465 g/mol ergibt sich bei einem 1:1 CD-Einschlusskomplex für V_s ein prozentualer Massenanteil von 23,2%. Demzufolge wurden bei einer Beladungsrate von $V_s = 31\%$ (w/w) auf 1 CD-Molekül maximal 1,3 V_s -Moleküle komplexiert. Das ist zum einen Hinweis dafür, dass es sich um Ladungskomplexe handelte, denn reine CD-Komplexe hätten bei einer maximalen Beladung von 1:1 eine geringere prozentuale Beladungsrate ergeben. Zum anderen konnte über dieses Verhältnis hinaus nicht mehr V_s verkapselt werden, obwohl nachweislich freie Ladungen des βCDPO_4 zur Verfügung standen. Geschlussfolgert wurde daraus, dass die Bildung eines Einschlusskomplexes entscheidend für die Stabilität der Komplexe ist und es sich um eine Kombination aus Ladungs- und Einschlusskomplex handelt.

Eine weitere Steigerung des Gehaltes von V_s pro ml Partikeldispersion war somit nur durch Verwendung höherer Ausgangskonzentrationen möglich. Der Einsatz der doppelten βCDPO_4 Konzentration führte bei gleichem stöchiometrischen Verhältnis (2,4) zu einer Steigerung der Konzentration von V_s um ca. 80% (siehe Abb. 78). Die prozentuale Beladungsrate lag mit 28% nur geringfügig unterhalb der entsprechenden halbkonzentrierten Ansätze. Die sowohl durch Herstellung oder aber durch anschließendes Aufkonzentrieren erzielten höheren Konzentrationen der Partikeldispersionen können sich jedoch nachteilig auf die Partikelstabilität auswirken.

4.2.1.5 Oberflächenmodifikation der Vatalanib- β -Cyclodextrinphosphat-Komplexe

Neben Vorteilen wie Tensidfreiheit und einer unabhängig vom Polymerabbau (Bioerosion, Biodegradation) steuerbaren Freisetzung war die flexible Oberflächenmodifikation durch elektrostatische Wechselwirkungen Auswahlkriterium für die Herstellung selbst-aggregierender nanopartikulärer Ladungskomplexe. Aufgrund der stark geladenen Partikeloberfläche von PEKs können entgegengesetzt geladene Verbindungen durch Ladungstitration in unterschiedlichem Ausmaß aufgebracht werden.

Im Zuge der Charakterisierung der Vs- β CDPO₄-Komplexe wurde festgestellt, dass eine Stabilisierung der Nanopartikel durch überschüssige Phosphatladungen stattfand. Indiz war das auf der Partikeloberfläche gemessene negative Zetapotential. Aus Kap. 4.1.1.3d) ist bekannt, dass das Modifizieren der Oberfläche durch eine zusätzlich sterisch stabilisierende Komponente wie einen PEG-Block vorteilhaft für die Gesamtstabilität der Komplexe ist. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurden deshalb die Vs- β CDPO₄-Komplexe mit dem Blockcopolymer PEG_{5000 Da}-b-KG(10) modifiziert, bestehend aus einem kationischen Ladungsanker mit 10 alternierenden Lysin-Glycin(=KG)-Untereinheiten und einem ungeladenen PEG-Block von ca. 5000 Da. Das neutrale Glycin fungierte zwischen den ladungstragenden Lysin-Untereinheiten als Platzhalter, um durch eine erhöhte Flexibilität des geladenen Polymerblockes eine optimale elektrostatische Interaktion auf der Partikeloberfläche zu ermöglichen.

Ziel der Versuche war es, die Partikeloberfläche für eine mögliche parenterale Anwendung vor Plasmakomponenten abzuschirmen, um dadurch eine ausreichende Stabilität und Zirkulationszeit im Plasma zu gewährleisten. Die Partikeldispersion wurde dafür mit jeweils steigenden Mengen des Blockcopolymers versetzt. In Abb. 79 ist die daraus resultierende Veränderung des Zetapotentials veranschaulicht.

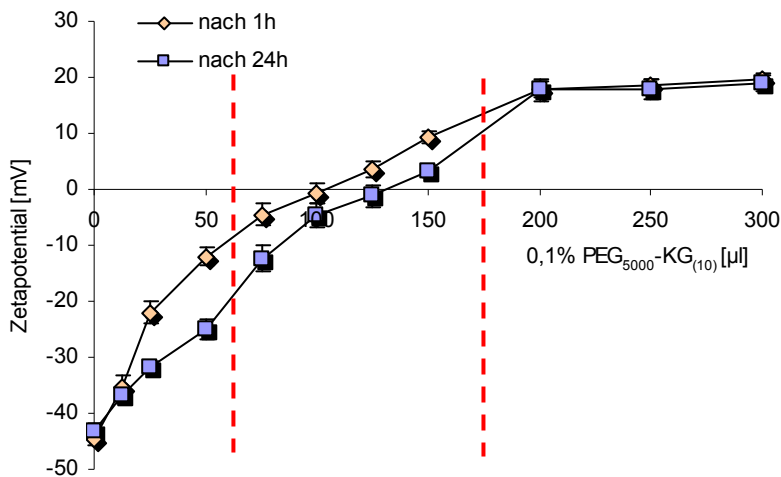


Abb. 79 Zetapotential der oberflächenmodifizierten Vs- β CDPO₄-Partikel 1h und 24 h nach Ladungstiration mit PEG_{5000 Da}-KG(10) (synthetisiert am MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm)

Durch eine stufenweise Titration mit dem Blockcopolymer wurde das negative Oberflächenpotential der Komplexe mit einem Startwert von -44 mV über den Neutralpunkt hinaus auf einen Wert von $+20$ mV titriert, d.h. die Partikel wurden umgeladen. An diesem Punkt stellte sich offensichtlich das Dissoziations-Gleichgewicht ein, weshalb eine weitere Erhöhung nicht erzielt werden konnte. Die Kontrolle der Partikelgrößen 1 h nach Titration erbrachte keine signifikante Veränderung der Partikelgröße.

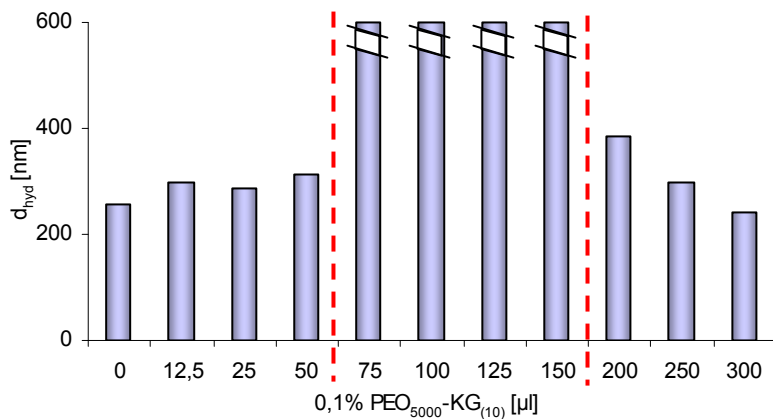


Abb. 80 Partikeldurchmesser d_{hyd} der oberflächenmodifizierten Vs- β CDPO₄-Partikel 24 h nach Ladungstiration mit PEG_{5000 Da}-KG(10)

Die Partikelgrößenbestimmung 24 Stunden nach Titration machte bei denjenigen Dispersionen einen Stabilitätsverlust sichtbar, welche bedingt durch die Modifikation ein Oberflächenpotential um den Neutralpunkt herum aufwiesen (siehe Abb. 80 und Abb. 79). Trotz des sterisch stabilisierenden PEG-Blockes waren die Komplexe in diesem Fall nicht

stabil. Vermutlich lösten sich β CDPO₄-Moleküle bei Ladungsneutralität von der Partikeloberfläche, da das geringe Molekulargewicht des Cyclodextrins eine stabile Verankerung im Komplex nicht ermöglichte. Die Folge war eine Destabilisierung mit anschließendem Partikelwachstum. Diejenigen Komplexe, bei denen nach Titration ein Zetapotential von $>\pm 10$ mV bestimmt wurde, wiesen auch nach 24 Stunden kaum veränderte Partikelgrößen auf. Eine Absättigung der Oberfläche mit dem Blockcopolymer gewährte die beste Partikelstabilität, nachweisbar durch die identische Partikelgröße vor und nach Titration. In diesem Fall verhinderten möglicherweise eine kompaktere PEG_{5000 Da}-b-KG(10)-Hülle sowie die zusätzliche elektrostatische Stabilisierung ein Partikelwachstum.

4.2.1.6 Untersuchung und Charakterisierung der Komplexstruktur

Ist eine Substanz in der Lage, kolloidale Ladungskomplexe auszubilden, können meist verschiedene Polyelektrolyte zur Komplexierung verwendet werden. Gezeigt wurde das am Beispiel von PEI-TSC-Komplexen, welche alternativ mit kationisch modifizierter Stärke hergestellt werden konnten (siehe Kap. 4.1.2.2). Um den Nachweis für die Bildung eines Ladungskomplexes von Vs mit anderen anionischen Polyelektrolyten zu erbringen, wurde Polysterensulfonat zur Komplexierung verwendet. Polymerstabilisierte Komplexe mit einer Größe um 280 nm (PI 0,15) und einem Zetapotential von -45 mV konnten hergestellt werden. Diese Komplexe zeichneten sich durch eine geringere Stabilität aus und nahmen binnen drei Wochen eine gelbliche Verfärbung an. Eine solche Farbveränderung wurde bereits im Zusammenhang mit Vs-Abbauprodukten in wässriger Lösung beobachtet, trat aber nicht im Zuge der Komplexbildung durch β CDPO₄ auf. Vermutlich verursacht die partielle Bildung von CD-Einschlussverbindungen einen Schutz vor Abbaureaktionen. Genutzt wird dieser Effekt z.B. auch bei sehr instabilen Prostaglandinen, wobei der Einschluss in ein α CD eine Verbesserung der Haltbarkeit von wenigen Monaten auf einige Jahre bewirkt (Prostavasine[®]) [85].

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist vermutet worden, dass es sich bei den Vs- β CDPO₄-Nanopartikeln um eine Kombination aus Ladungs- und Einschlusskomplex handelt. Demnach kommt es durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Phosphat-Gruppen des Cyclodextrins mit der protonierten Arzneistoffbase zur Ausbildung von Ladungskomplexen. Gleichzeitig bildeten die Vs-Moleküle partielle Einschlussverbindungen mit dem hydrophoben Innenraum des Cyclodextrins. Anhand der

schematischen Darstellung in Abb. 81 soll veranschaulicht werden, an welchen Positionen des Moleküls eine Interaktion mit dem β CDPO₄ möglich ist.

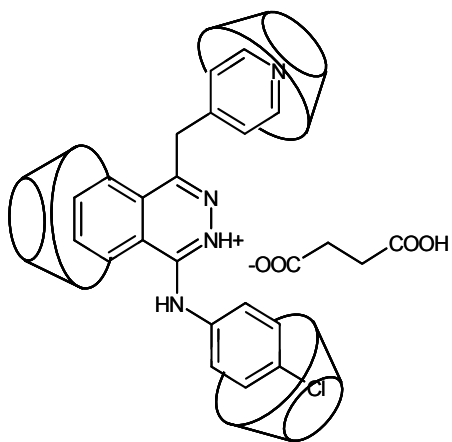


Abb. 81 Schematische Darstellung der möglichen Positionen für die Ausbildung einer CD-Einschlussverbindung

Von Szejtli et al. ist bekannt, dass größere Moleküle mehr als nur eine Unterstruktur in die Kavität verschiedener Cyclodextrine einlagern können, sofern die einzulagernden Strukturen für mehrere Cyclodextrine zugänglich sind und der Größe der Kavität entsprechen. ¹³C-NMR Spektren von Cholecalciferol gaben deutlichen Hinweis darauf, dass der Einschluss eines Moleküls durch zwei β CD-Moleküle erfolgte [180][181].

Im Falle von Vs wird die Bildung einer Einschlussverbindung am chloresubstituierten Benzol-Rest vermutlich sterisch durch den Substituenten blockiert, ist aber nicht unmöglich (siehe Abb. 81). Wahrscheinlicher ist eine Einschlussverbindung am nicht-substituierten Aromaten des Phthalazin-Grundgerüsts. In dieser Position können die Phosphatgruppen des CDs zusätzlich mit der protonierten Base elektrostatisch wechselwirken. Ebenso vorstellbar ist eine Inkorporierung des Pyridin-Restes in das Cyclodextrin. Aus sterischen und elektrostatischen Gründen wurde vermutlich nur in einer der Positionen eine Einschlussverbindung ausgebildet.

In den zuvor beschriebenen Ergebnissen wurde erläutert, dass Vs sowohl in der Lage ist, reine Ladungskomplexe mit Polysterensulfonat auszubilden, als auch durch Einschluss in CDs verbesserte Lösungseigenschaften aufzuweisen. Es liegt deshalb die bereits genannte Vermutung nahe, dass Vs in einem kombinierten Ladungs- und Einschlusskomplex mit β CDPO₄ vorlag. Um dies zu untermauern, wurden mit den Komplexen weitere physikochemische Untersuchungen durchgeführt, welche in den folgenden Unterkapiteln diskutiert werden.

a) Spektroskopische Untersuchung der Komplexe

Bei der Auswertung der IR-Spektren war von Interesse, inwiefern eine Komplexbildung durch die Veränderung spektroskopisch charakteristischer Banden belegt werden kann (siehe Abb. 82).

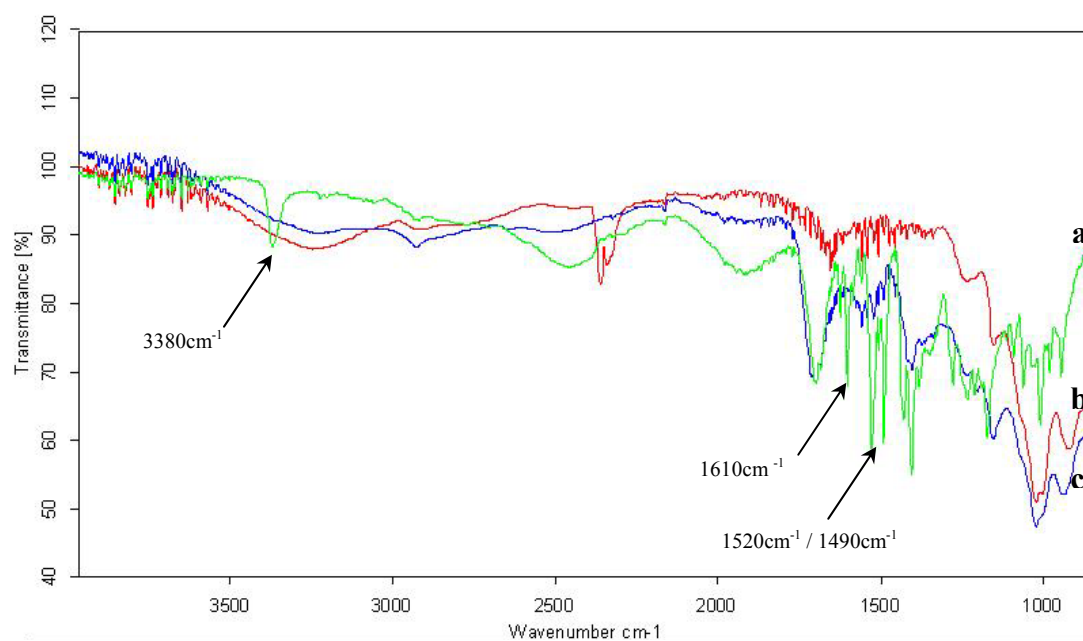


Abb. 82 FT-IR Spektren: grün (a)-Vs, rot (b)- β CDPO₄, blau (c)-Komplexe

Charakteristisch für das IR-Spektrum von Vs ist die scharfe Bande bei 3380 cm^{-1} . Diese ist einer N-H-Valenzschwingung des sekundären Amins in vier-Position des Phthalazingerüsts zuzuordnen. Die scharfe Bande bei 1610 cm^{-1} stammt vermutlich von den C=N-Valenzschwingungen des Phthalazin-Grundgerüsts [182]. Eine eindeutige Zuordnung der Banden bei 1520 cm^{-1} und 1490 cm^{-1} ist nicht möglich. Vergleiche mit ähnlichen Spektren deuten darauf hin, dass es sich bei den Banden um 1490 cm^{-1} und 1510 cm^{-1} um eine Kombination von C-N-Valenz- und N-H-Deformationsschwingung handelt, betrachtet man die Verbindung als azaanaloges Amid bzw. Amidin [182]. Die im Fingerprintbereich ($1600\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$) sehr ausgeprägten Schwingungen werden vorwiegend durch die aromatischen Strukturen des Vs-Moleküls verursacht. Das IR-Spektrum des β CDPO₄ besitzt keine Banden, welche eindeutig einer Molekülschwingung zugeordnet werden können.

Beim Spektrenvergleich der Komplexe mit Vs kann festgestellt werden, dass die Banden ν N-H (3380 cm^{-1}), ν C=N (1610 cm^{-1}) und die Schwingungen um 1500 cm^{-1} mit ν C-N sowie δ N-H im Spektrum der Komplexe nicht mehr vorhanden sind. Das ist ein Hinweis darauf,

das das CD eine Einschlussverbindung mit Vs gebildet hatte. Vor allem der Fingerprintbereich der Komplexe wird hauptsächlich durch die Bandenstruktur des β CDPO₄ bestimmt. Erklärt werden könnte dies durch die Einlagerung der aromatischen Strukturen des Vs in die Kavität des CDs (vgl. Abb. 81), wodurch aromatische Schwingungen unterdrückt werden oder nicht möglich sind.

b) DSC-Untersuchung der Komplexe

Thermoanalytische Verfahren wie DSC stellen eine weitere wichtige Methode dar, um CD-Einschlussverbindungen oder auch so genannte Kavitare zu charakterisieren [183][184]. Bedingt durch die molekulare Verkapselung im Cyclodextrin können die Schmelzpeaks der kristallinen Ausgangssubstanz nach Einschluss nicht mehr detektiert werden. Ein solcher Effekt konnte auch für die hier untersuchten Vs- β CDPO₄-Komplexe gefunden werden (siehe Abb. 83).

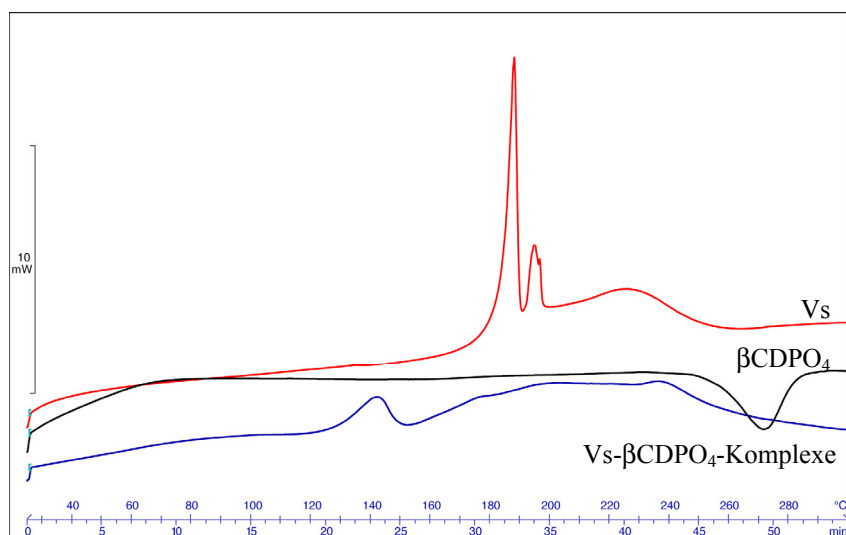


Abb. 83 DSC-Thermogramme der Untersuchung von reinem Vs, β CDPO₄ und den Vs- β CDPO₄-Komplexen

Die Reinsubstanzen von Vs und β CDPO₄ sowie ein getrockneter Film der nanopartikulären Komplexe wurden in einem Temperaturintervall von 0 bis 300 °C kalorimetrisch untersucht. Charakteristisch für das reine Vs ist der stark exotherme Schmelzpeak bei 190 °C. Das Thermogramm des β CDPO₄ zeigt einen endothermen Peak bei 275 °C, welcher vermutlich durch eine Dehydratisierung verursacht wird und damit die Zersetzung anzeigt. Die Komplexe unterschieden sich deutlich in den thermischen Eigenschaften vom reinen Vs, da der Schmelzpeak der kristallinen Substanz bei 190 °C fehlte und statt dessen nur ein geringfügiger exothermer Peak bei 140 °C detektiert wurde. Die physikalische Mischung

ergab bei der DSC-Messung eine Übereinstimmung mit den Thermogrammen der Reinsubstanzen. Der fehlende Schmelzpeak des kristallinen Vs in den Komplexen ist ein weiterer Hinweis, dass es zur Ausbildung einer Einschlussverbindung kam.

c) Röntgenstreuungsuntersuchungen der Komplexe (XRPD)

Supramolekulare Strukturen wie das Vorliegen von CD-Einschlussverbindungen können auch mit Hilfe von Röntgenstreuungsuntersuchungen aufgeklärt werden.

Beim Vergleich der Diffraktogramme in Abb. 84 wird erkennbar, dass das charakteristische Streuungsmuster des kristallinen Vs durch Komplexbildung fast vollständig verloren ging und auch das amorphe β CDPO₄ als Reinsubstanz ein anderes Streuungsmuster als die resultierenden Komplexe ausbildete. Das Diffraktogramm der physikalischen Mischung zeigte dagegen die kristallinen Streureflexe von Vs.

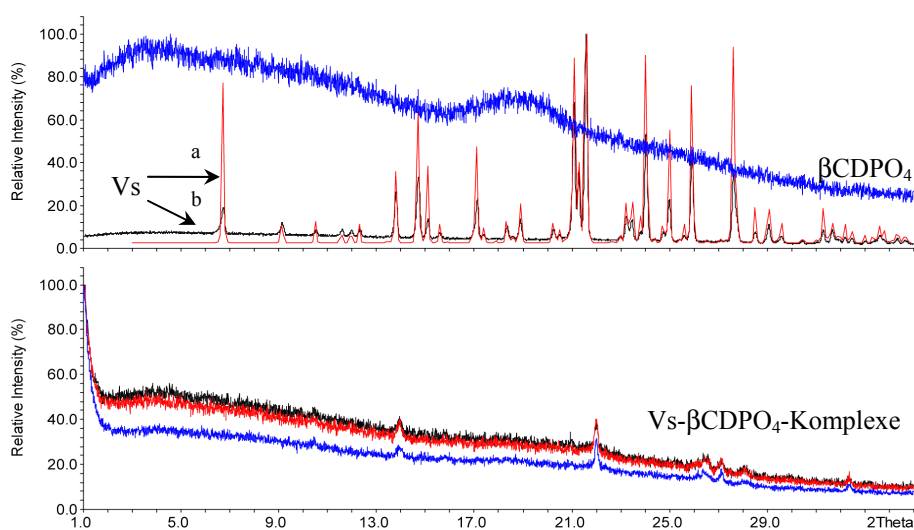


Abb. 84 Röntgendiffraktogramme von reinem Vs, β CDPO₄ und den Vs- β CDPO₄-Komplexen; Vs a) Diffraktogramm (theoretisch) von Polymorph 1, Vs b) Diffraktogramm der verwendeten Substanz

Die Abwesenheit der kristallinen Beugungsreflexe und das Auftreten eines neuen röntgenamorphen Beugungsmusters sind deshalb als Hinweis für das Vorliegen eines Einschlusskomplexes zu bewerten. Ein eindeutiger Beweis der Komplexbildung mittels Röntgendiffraktometrie kann jedoch nur erbracht werden, wenn es zur Bildung einer neuen kristallinen Struktur durch den CD-Einschlusskomplex kommt. Wie im Falle der untersuchten Vs- β CDPO₄-Komplexe entstehen aber meist röntgenamorphe Strukturen, weshalb diese

Ergebnisse nur ergänzenden Charakter haben. Umsalzeffekte könnten ebenfalls Ursache für das veränderte Diffraktogramm der Komplexe gewesen sein.

Die Ergebnisse der FTIR-, DSC- und XRPD-Untersuchungen der Vs- β CDPO₄-Komplexe lassen den Schluss zu, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine Kombination aus Ladungs- und Einschlusskomplex handelt.

4.2.1.7 Lyophilisationsversuche

Für Vs- β CDPO₄-Komplexe wurde in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, dass es sich um eine stabile nanopartikuläre Formulierung sowohl in wässriger Lösung als auch in biorelevanten Medien handelt. Um die Verarbeitung zu einer festen oralen Arzneiform zu ermöglichen und die Lagerungsstabilität zu verbessern, wurden Lyophilisationsversuche durchgeführt. Als Kryoprotektoren wurden Mannit, PEG 4000 und Trehalose verwendet. Die in Abb. 86 abgebildeten Lyophilisate wurden in Wasser redispergiert und anschließend die Partikelgröße bestimmt (siehe Abb. 85).

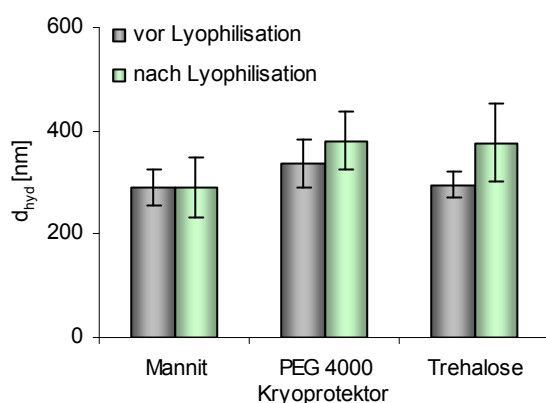


Abb. 85 Partikeldurchmesser d_{hyd} vor und nach Lyophilisation mit verschiedenen Kryoprotektoren



Abb. 86 Lyophilisate entsprechend der Reihenfolge der Abb. links; leichte gelbliche Verfärbung von Mannit

Das beste Ergebnis bezüglich einer konstanten Partikelgröße nach Redispergieren konnte mit Hilfe von Mannit erzielt werden. Nach ca. einer Woche nahm allerdings das Mannit-Lyophilisat eine gelbliche Verfärbung an. Dies könnte ein Hinweis für eine Inkompatibilität zwischen Vs und Mannit sein und sollte deshalb bei weiteren Entwicklungsschritten berücksichtigt werden. Mit Trehalose lyophilisierte Partikel zeigten eine schlechte Redispergierbarkeit und die Zunahme der Partikelgröße war Zeichen für ein partielles Agglomerieren der Partikel bzw. für ein Partikelwachstum. Bei Verwendung von PEG 4000

konnten die Partikel gut redispergiert werden, jedoch wiesen diese ein leichtes Partikelwachstum auf. Als Fazit aus den ersten Lyophilisationsversuchen kann festgehalten werden, dass durch Auswahl eines geeigneten Kryoprotektors die Überführung der Partikeldispersion in ein gut redispergierbares Lyophilisat möglich ist. Damit ist eine Voraussetzung gegeben, diese nanopartikuläre Formulierung als feste orale Arzneiform weiter zu entwickeln.

4.2.2 Nanopartikel aus Vatalanib succinat und Sulfobutylether- β -Cyclodextrin

Die Verwendung eines weiteren anionisch modifizierten β CDs sollte zeigen, inwiefern die Struktur der ladungstragenden Gruppen einen Einfluss auf die Stabilität der Vs-CD-Ladungs- und Einschlusskomplexe hat. Verwendet wurde Captisol[®] der Firma Cydex, bei welchem es sich um ein hepta-Sulfobutylether- β CD (SB β CD) handelt [185]. Auswahlkriterium war, dass die über den Butylether an das Cyclodextrin gebundenen Sulfonat-Gruppen eine höhere Flexibilität im Vergleich zu den direkt an das Cyclodextrin gebundenen Phosphat-Gruppen aufweisen. Basierend auf der höheren Beweglichkeit der ladungstragenden Gruppen wurde eine verbesserte Interaktion mit der protonierten Base vermutet, ebenso wie eine erhöhte elektrostatische Stabilisierung der Oberfläche durch eine optimierte Ionenhülle.

Analog der Beschreibung für Vs- β CDPO₄ Komplexe erfolgte die Herstellung von Vs-SB β CD Ladungskomplexen in unterschiedlichen stöchiometrischen Ladungsverhältnissen. Die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung sind in Abb. 87 veranschaulicht.

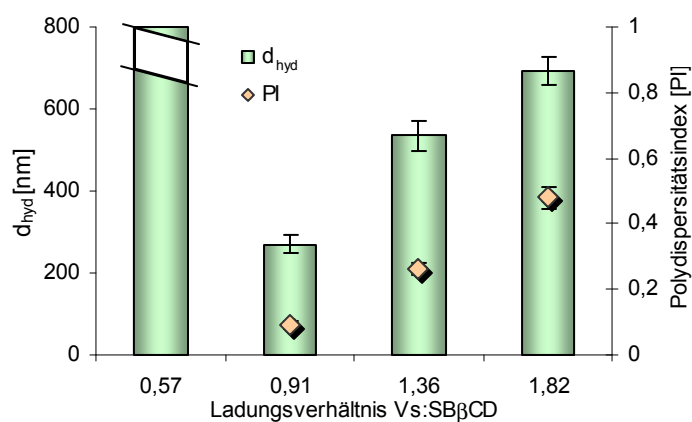


Abb. 87 Partikeldurchmesser d_{hyd} der Vs-SB β CD-Komplexe in Abhängigkeit von Zusammensetzung

Anhand der Grafik ist zu erkennen, dass diese nanopartikulären Komplexe im Unterschied zu den Vs- β CDPO₄-Komplexen mit steigendem Anteil Vs nicht stabiler wurden, sondern die Partikelgröße und der PI zunahm. Wie auch β CDPO₄ bildete SB β CD keine kolloidalen Komplexe aus, wenn es in sehr großem Überschuss eingesetzt wurde. Die Komplexe mit einem Ladungsverhältnis von 0,91(Vs:SB β CD) wurden aufgrund geeigneter Größe und enger Partikelgrößenverteilung auf ihre Stabilität in wässrigem Milieu über einen Zeitraum von 16 Tagen untersucht.

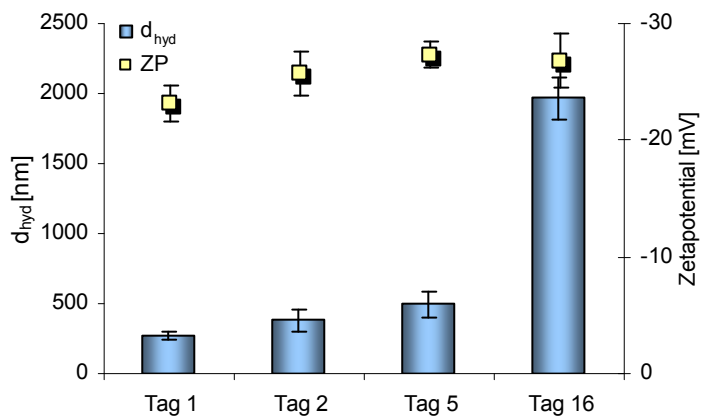


Abb. 88 Veränderung des Partikeldurchmessers d_{hyd} von Vs-SB β CD-Komplexen innerhalb von 16 Tagen

Zu Beginn der Untersuchung hatten diese Partikel einen hydrodynamischen Durchmesser von 270 nm und der PI war $<0,1$. Innerhalb der ersten 5 Tage konnte eine leichte Zunahme der Partikelgröße festgestellt werden. Bei der Bestimmung des Zetapotentials wurde in dem gesamten Zeitraum nur eine leichte Schwankung um einen Wert von -27 mV beobachtet. Der drastische Anstieg der Partikelgröße zwischen Tag 5 und Tag 16 bis in den Mikrometerbereich belegt einen deutlichen Stabilitätsverlust, weshalb diese Komplexe nicht für eine nanopartikuläre Formulierung verwendbar sind.

Die Vs-SB β CD-Komplexe werden aufgrund ihrer kurzen Lagerstabilität in wässriger Lösung für eine pharmazeutische Anwendung als ungeeignet eingestuft. Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, dass der strukturelle Unterschied der ladungstragenden Gruppen die Charakteristik der Komplexbildung vollständig verändert hatte und sich nachteilig auf die resultierende Stabilität auswirkte.

4.2.3 Zusammenfassung selbstaggregierende therapeutische Systeme

Die schwache Arzneistoffbase Vatalanib succinat konnte mit Hilfe anionisch modifizierter Cyclodextrine in nanopartikuläre Komplexe überführt werden. Größe und Wirkstoffbeladung der Partikel waren vor allem über die Zusammensetzung während der Herstellung steuerbar, wobei nur durch einen Überschuss der nicht stabilisierenden Komponente Vatalanib succinat eng verteilte Nanopartikel präpariert werden konnten. Für die Komplexstabilität ist die Art und vermutlich auch die Anzahl der ladungstragenden Gruppen am Cyclodextrin entscheidend, wie durch einen Vergleich mit Vs-SB β CD-Komplexen deutlich gemacht werden konnte. Anhand physikochemischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine Kombination aus Ladungs- und Einschlusskomplex handelt, welcher ausreichende Stabilität auch in biorelevanten Medien wie FaSSIF und FeSSIF aufwies. Eine Lyophilisation der Partikeldispersionen war unter Zusatz von Kryoprotektoren möglich und ist eine Grundlage für die weitere Entwicklung zu einer festen oralen Arzneiform, beispielsweise in Form von überzogenen Minitabletten.

An dem untersuchten System konnte eine Oberflächenmodifikation, basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen, erfolgreich umgesetzt werden. Dabei gewährleistete eine Umladung der Partikeloberflächenladungen durch Überschuss des Blockcopolymers eine ausreichende Stabilität nach der Titration. Bei Ladungskompensierung auf 0 mV wurde dagegen eine Destabilisierung des Systems beobachtet. Eine Optimierung des Systems z.B. in Form einer elektrostatisch aufgetragenen mukoadhäsiven Oberfläche (z.B. Chitosan-PEG-Chitosan), könnte entsprechend einer besseren Partikelhaftung im GIT eine erhöhte Resorption von Vatalanib succinat bewirken.

Fazit: Eine neuartige kolloidale Formulierung der Arzneistoffbase Vatalanib succinat wird hiermit zur Verfügung gestellt, um das Problem der pH-abhängigen Löslichkeit, insbesondere bei Menschen mit einem erhöhten Magen-pH-Wert, zu überbrücken. Betroffen davon sind vor allem Patienten mit Achlorhydrie, AIDS, ältere Menschen (>65 Jahre), Asiaten sowie Patienten, die mit Antazida, H₂-Antagonisten und Protonenpumpenhemmern behandelt werden. In diesen Fällen kann die notwendige Auflösung des Arzneistoffes im Magen kaum oder nur unvollständig stattfinden. Entsprechend wenig Wirkstoff steht somit für eine Resorption zur Verfügung, wodurch eine geringe Bioverfügbarkeit verursacht wird.

Folgende Vorteile des beschriebenen Systems können festgehalten werden:

- voraussichtlich verbesserte Bioverfügbarkeit, da die Resorption unabhängig von einem vollständigen Auflösen der Arzneistoffbase im Magensaft durch Verwendung einer magensaftresistenten, nanopartikulären, oralen Darreichungsform ist,
- es kann potentiell mehr Arzneistoff für eine Resorption im Dünndarm nach oraler Gabe zur Verfügung gestellt werden, da durch die partikuläre Formulierung eine erhöhte Sättigungslöslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit vorliegen,
- zusätzlich Aufnahme des intakten, nanopartikulären Trägersystems nach oraler Gabe durch die Peyerschen Plaques und über die Lymphe in die systemische Zirkulation,
- schnelle Freigabe des Wirkstoffes durch Desaggregation der Komplexe aufgrund der besonderen Struktur der Ladungs- und Einschlusskomplexe, d.h. für die Freisetzung von Vatalanib succinat ist kein Polymerabbau der Partikel im Sinne einer Bioerosion oder Biodegradation notwendig,
- Modularität des Systems und Möglichkeit der Optimierung durch elektrostatisch modifizierbare Oberfläche:
 - bioadhäsive Oberflächen für verbesserte Arzneistoffresorption im GIT nach oraler Gabe,
 - verbessertes passives und aktives Targeting nach intravenöser Gabe, vor allem eine tumorspezifische Akkumulation unter Ausnutzung des EPR-Effektes,
- wenig aufwendige Partikelpräparation und einfacher Grundaufbau des nanopartikulären Komplexes aus nur zwei Komponenten (Wirkstoff und Hilfsstoff),
- angestrebter therapeutischer Effekt: Eine erhöhte Bioverfügbarkeit und minimierte interindividuelle Schwankungen ermöglichen ein einheitliches Dosieren dieses Arzneistoffes bei allen Patientengruppen, ohne einzelne Patienten durch Überdosierungen zu belasten oder im Falle von Unterdosierungen einen therapeutischen Effekt zu verfehlen.