

### 4.3 Feste Polymernanopartikel

#### *Einleitung*

Seit den 70er Jahren wird der Einsatz von Liposomen intensiv beforscht, wobei in den letzten Jahrzehnten feste Polymernanopartikel aus bioabbaubaren Materialien in den Fokus der Wissenschaft gerückt sind. Entscheidend für diese Entwicklung waren Kriterien wie eine deutlich bessere Stabilität, höhere Beladungsraten und mittels gezielter Polymersynthese besser steuerbare Freisetzungseigenschaften. Mit den Kenntnissen zur passiven Anreicherung über den EPR-Effekt nach i.v. Applikation wuchs das Interesse, für feste Polymernanopartikel eine spezifische zelluläre Erkennung der Zielstruktur durch Modifikation der Partikeloberfläche zu ermöglichen.

Zu den sehr umfassend untersuchten Polymerpartikeln gehören Polyalkylcyanoacrylat (PACA)-Nanopartikel. In frühen Arbeiten wurde vor allem der Einfluss der stabilisierenden Schutzkolloide auf der Partikeloberfläche untersucht. Bereits 1995 konnte Kreuter et al. anhand von in vivo Studien zeigen, dass Polysorbat 80 beschichtete PACA-Nanopartikel in der Lage waren, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden [186]. Der lange unbekannt Mechanismus beruht nach dem derzeitigen Stand darauf, dass Apo E bevorzugt auf dieser Partikeloberfläche angereichert wird. Apo E wiederum nutzt den LDL-Transporter der BHS und kann auf diesem Weg die Nanopartikel ins Gehirn einschleusen [187]. Peracchia et al. stellte PEG-modifizierte PACA-Partikel her, indem er zuerst das Monomer Hexadecylcyanoacrylat (HDCA) pegylierte und dieses anschließend im Verhältnis 1:4 mit dem reinen Monomer copolymerisierte. In vivo Versuche zeigten, dass diese Nanopartikel effizienter die BHS überwinden konnten als die von Kreuter PS80-beschichteten Partikel [110]. Die Verwendung bestimmter Polysaccharide auf der Partikeloberfläche stellte sich als sehr effizientes Targeting für Hepatozyten heraus [118].

Um spezielle Zielstrukturen wie z.B. Antikörper auf der Oberfläche von Nanopartikeln integrieren zu können, werden meist funktionelle Gruppen in das matrixbildende Polymerrückgrat chemisch eingefügt [46]. Nach der Partikelherstellung ist es dadurch möglich, die Zielstrukturen über diese funktionellen Gruppen mittels kovalenter Kopplung auf die Oberfläche aufzubringen. Da die Stabilität kolloidaler Dispersionen durch die Reagenzien bzw. unter den Reaktionsbedingungen häufig stark verringert wird, ist die chemische Durchführung meist aufwendig und problematisch [8].

Ziel der folgenden Versuche war es deshalb, eine im Vergleich zur kovalenten Modifikation flexibel veränderbare Oberfläche auf festen Polymernanopartikeln zu entwickeln. Überlegung war, dass durch den Einbau von Verbindungen mit Aminogruppen in eine feste Polymermatrix eine kationisch geladene Oberfläche erzeugt werden kann. Diese wiederum ermöglicht eine einfach durchführbare Modifikation auf der Basis elektrostatischer Wechselwirkungen.

Für die folgenden Versuche wurde PBCA verwendet, da es zu den bioabbaubaren Polymeren gehört, in welche sowohl lipophile als auch hydrophile Substanzen eingeschlossen werden können [106]. Die Herstellung mit Hilfe der anionischen Polymerisation erfolgt über einen gut steuerbaren Polymerisationsprozess, welcher unter moderaten Bedingungen abläuft. Durch die zusätzliche Verkapselung einer fluoreszenzaktiven Substanz sollte eine Detektion der Partikel ermöglicht werden.

#### **4.3.1 Herstellung von PBCA-Nanopartikeln durch anionische Polymerisation**

Der Versuch, wasserlösliche Aminoverbindungen wie PEI oder Spermidin direkt in die entstehenden Partikel mittels anionischer Polymerisation (siehe Kap. 7.1.1.3) einzubauen, scheiterte durch makroskopische Ausfällung des gesamten Ansatzes. Von Yang et al. ist berichtet worden, dass durch Co-Polymerisation von BCA in einer Chitosanlösung stabile, kationisch modifizierte Partikel hergestellt werden können. In diesem Fall wird davon ausgegangen, dass das Chitosan als nukleophiler Initiator an der anionischen Polymerisation beteiligt war, wodurch es nach Polymerisation als Endgruppe des Polymers vorlag [119]. Chitosan ist mit einem  $pK_s$  von 6,5 eine deutlich schwächere Base im Vergleich zu PEI und Spermidin. Bei Anwesenheit dieser stärker basischen Verbindungen kam es vermutlich zum extremen Überschuss an Initiatormolekülen, so dass das Gemisch vollständig polymerisierte und ausfiel.

In den anschließenden Versuchen sollte getestet werden, ob durch einen schnellen Fällungsprozess mittels Nanopräzipitation (SESD-Verfahren) Aminoverbindungen gemeinsam mit dem Polymer verkapselt werden können. Aus diesem Grund wurde BCA allein polymerisiert und das als Nanopartikeldispersion vorliegende polymere PBCA wieder durch Zugabe von Methanol ausgefällt. Das Präzipitat wurde mehrfach gewaschen und

anschließend im Trockenschrank getrocknet. Das Molekulargewicht der gewonnenen PBCA-Festschubstanz wurde per GPC mit  $M_n$  2000 g/mol bestimmt.

### 4.3.2 Co-Verkapselung von Aminoverbindungen in PBCA-Nanopartikel

#### 4.3.2.1 Nanopräzipitation

Es handelt sich um ein modifiziertes SESD-Verfahren, welches aufgrund der gleichzeitigen Fällung von Polymer und Wirkstoff auch unter dem Begriff Nanopräzipitation beschrieben wird [111] (siehe auch Kap. 2.3.3.2).

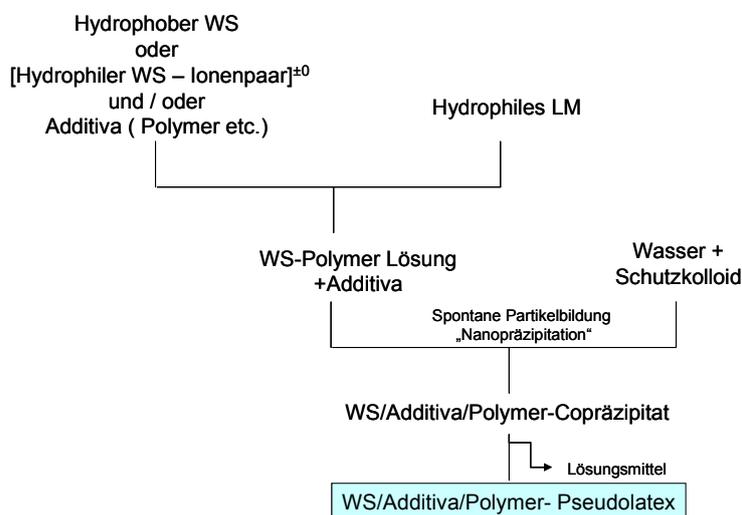


Abb. 89 Nanopräzipitation modifiziert nach [111]

Im folgenden Versuch sollte getestet werden, ob mittels Nanopräzipitation Aminogruppen tragende Verbindungen stabil in eine hydrophobe Partikelmatrix verkapselt werden können.

#### 4.3.2.2 Verkapselung von Aminoverbindungen

Für die Verkapselung von Aminoverbindungen mittels Nanopräzipitation wurden Aminoalkane unterschiedlicher Kettenlänge verwendet (C9 - C16). Der hydrophobe Alkanrest mit Affinität zur hydrophoben Partikelmatrix sollte in diese als Anker eingekapselt werden und die endständige Aminogruppe aufgrund der Affinität zu Wasser aus der Partikelhülle herausragen. Für die Partikelherstellung wurde eine acetonische PBCA-Aminoalkan-Lösung in einer 1%igen wässrigen Tensidphase gefällt. Die Messergebnisse führten zu dem Schluss,

dass der hydrophobe C16-Alkanrest als Anker zu kurz war und somit nicht während der Präzipitation in die Partikelmatrix fest eingeschlossen werden konnte. Dementsprechend konnten die Aminoalkane von der Partikeloberfläche durch Waschprozesse entfernt werden. Offensichtlich hatte nur eine adsorptive Anlagerung auf der Oberfläche stattgefunden, denn es konnte kein stabiles positives Oberflächenpotential gemessen werden.

Im folgenden Schritt wurden Polykationen wie Spermidin, Spermin und PEI (1,8 kDa) für eine Co-Präzipitation mit PBCA getestet. Als Lösungsmittel wurden Isopropanol oder Aceton verwendet. Die Ergebnisse der Zetapotential-Messung ergaben, dass anscheinend eine Verkapselung der Aminoverbindungen in die PBCA-Partikel stattgefunden hatte. Die Annahme beruhte darauf, dass für alle Partikeldispersionen ein positives Oberflächenpotential zwischen +30 mV und +50 mV bestimmt wurde. Im Vergleich dazu lag das Oberflächenpotential der reinen PBCA-Nanopartikel im Bereich um -30 mV, erklärbar durch freie Carbonsäurereste auf der Partikeloberfläche nach Abspaltung des Butylesters. Spermidin und Spermin konnten aber ebenso wie die Aminoalkane aufgrund einer zu geringen Molekülgröße nicht stabil eingeschlossen werden und wurden deshalb durch Waschprozesse aus der äußeren Partikelhülle herausgelöst bzw. von der Oberfläche entfernt.

Die erfolgreiche Verkapselung von PEI in die PBCA-Matrix könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Teil des Polymers im Zuge des sehr schnellen Fällungsprozesses von PBCA mit in die Matrix eingeschlossen wurde. Das höhermolekulare Polymer ist vermutlich durch eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit nicht in der Lage, während des Fällungsprozesses schnell genug in die wässrige Phase zu wechseln. Dadurch wurde ein Teil der PEI-Kette in die Polymermatrix eingeschlossen, wohingegen sich der Rest auf der Partikeloberfläche zur wässrigen Phase ausrichtete. Die resultierenden Partikel waren demnach durch kationische Polymerketten stabilisiert. Hinweis ist das trotz der anschließenden Waschprozesse messbare positive Oberflächenpotential von ca. +30 mV. Daraus wurde geschlussfolgert, dass das PEI als integrierter Bestandteil der PBCA-Partikel betrachtet werden kann.

Um eine Detektion der Partikel unter in vivo Bedingungen zu ermöglichen, sollte der NIR-Farbstoff Indodicarbocyanin (IDCC) eingekapselt werden. IDCC (siehe Abb. 90) ist ein mit TSC (siehe Abb. 91) strukturverwandter Farbstoff, welcher auch mittels Optical Imaging nicht-invasiv im Gewebe über Fluoreszenz lokalisiert werden kann. Eine tumorspezifische Detektion von IDCC in vivo wurde bereits von Becker et al. gezeigt. Eine Anreicherung

wurde durch Kopplung des Farbstoffes an das somatostatinanaloge Peptid Octreotat erzielt [142].

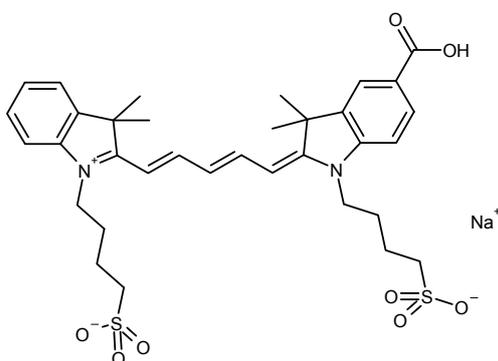


Abb. 90 Indodicarbocyanin / IDCC

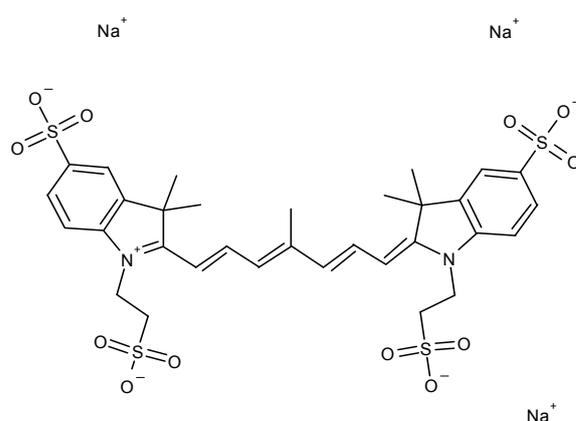


Abb. 91 Tetrasulfocyanin / TSC

Bedingt durch die geringere Anzahl an Sulfonat-Gruppen ist IDCC weniger hydrophil als TSC und deshalb für eine Einkapselung in die hydrophobe PBCA-Polymermatrix besser geeignet. IDCC zeichnete sich außerdem durch eine bessere Farbstabilität in PEI-haltiger Lösung aus.

#### 4.3.2.3 PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel

Zur Herstellung von PBCA-[PEI-IDCC] Nanopartikeln wurde eine acetoneische Lösung aus PBCA und PEI (1,8kDa) mit einer ethanolischen IDCC-Lösung versetzt (siehe Kap. 7.1.1.4). Dieses Gemisch wurde in eine schnell rührende tensidhaltige Lösung eingebracht. Eine sofortige Ausfällung des PBCA-PEI-IDCC-Gemisches bewirkte eine Einkapselung von PEI und IDCC. Begünstigt wurde der Einschluss dieser beiden Komponenten vermutlich dadurch, dass sie als Ionenpaar einen nach außen neutralen Komplex bildeten und dieser neutrale Komplex weniger stark mit der wässrigen Tensidphase interagiert als die ionischen Einzelverbindungen. Erst durch die geminderte Affinität zur äußeren wässrigen Phase war eine Einkapselung möglich.

Zu Überprüfung dieser Hypothese wurde das nur in Wasser lösliche TSC einmal mit und einmal ohne PEI durch Nanopräzipitation verkapselt. Nur durch die Co-Verkapselung mit PEI war ein Einschluss des Farbstoffes in die Matrix zu beobachten. Das bestätigte, dass eine hydrophile, gut wasserlösliche Substanz mit geringem Molekulargewicht in eine hydrophobe Polymermatrix mittels Nanopräzipitation verkapselt werden kann. Voraussetzung scheint eine

Einbindung in einen Ionenkomplex mit einem geladenen Polymer zu sein, welcher gemeinsam mit dem Matrixpolymer gefällt wird. Die hohe Geschwindigkeit, mit der der Prozess abläuft, ist dabei entscheidend. Liegt eine sehr gute Löslichkeit des Farbstoffes in Wasser vor, kann dieser jedoch durch Waschprozesse herausgelöst bzw. durch *burst*-Effekte relativ schnell freigegeben werden.

Für die Herstellung der PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel wurden die Tenside Pluronic F68, Triton X-100 und Synperonic T707 als 1%ige Lösung (w/w) verwendet. Die Partikel wiesen eine Größe von ca. 200 nm auf und das Oberflächenpotential schwankte um einen Wert von +45 mV.

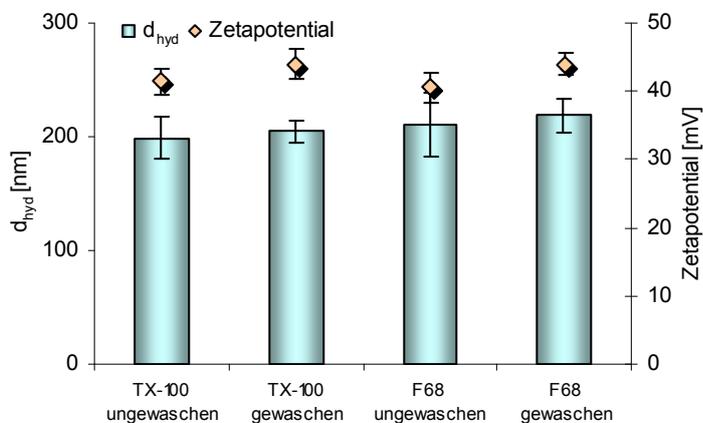


Abb. 92 Partikeldurchmesser  $d_{hyd}$  und Zetapotential von PBCA-[PEI-IDCC]-NP

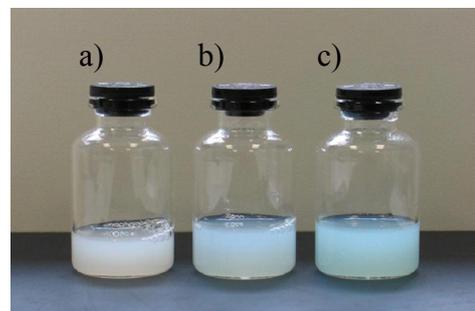


Abb. 93 a) PBCA-PEI-NP; b) gewaschene, c) ungewaschene PBCA-[PEI-IDCC]-NP

Ein Abtrennen nicht verkapselter Substanzen erfolgte durch Zentrifugation und Redispersieren der Partikel in neuer Tensidlösung. Die Verwendung des kationischen Tensids Cetyltrimethylammoniumchlorid (CETAC) (1% w/w) als Waschtensid war dabei entscheidend für die Aufrechterhaltung der Stabilität der Partikel. Größe und Oberflächenpotential der nach dem Waschprozess im Herstellungstensid redispersierten Partikel wiesen keine Veränderung im Vergleich zu den ungewaschenen Partikeln auf (siehe Abb. 92).

### 4.3.3 Oberflächenmodifikation von PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikeln

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel zeigten eine sehr gute Stabilität sowohl bei der Aufarbeitung (Waschprozess) als auch bei Lagerung über vier Wochen unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.

Aufgrund des eingekapselten kationischen Polyelektrolyten PEI bestand die Partikelhülle der PBCA-Partikel aus PEI-Polymerketten, welche eine kationische, elektrostatische Stabilisierung bewirkten. Durch mehrfache Waschprozesse wurde sichergestellt, dass adsorptiv bzw. elektrostatisch gebundenes Polymer und nicht verkapselter Farbstoff entfernt wurden. Die auch nach dem Waschprozess stabil vorhandene kationische Ladungshülle, nachweisbar durch das gemessene positive Zetapotential (siehe Abb. 92), konnte nun als Grundlage für eine elektrostatische Oberflächenmodifikation verwendet werden.

#### 4.3.3.1 Modifikation der PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel mit Adenosintriphosphat

Für die folgende Modifikation wurde als potentielles Zielmolekül ATP verwendet. Durch zunehmende Ladungstitration der Partikeldispersion erfolgte eine schrittweise Minderung des Zetapotentials der PBCA-[PEI-IDCC]-Partikel bis zum Erreichen des Dissoziationsgleichgewichtes um 0 mV (siehe Abb. 94).

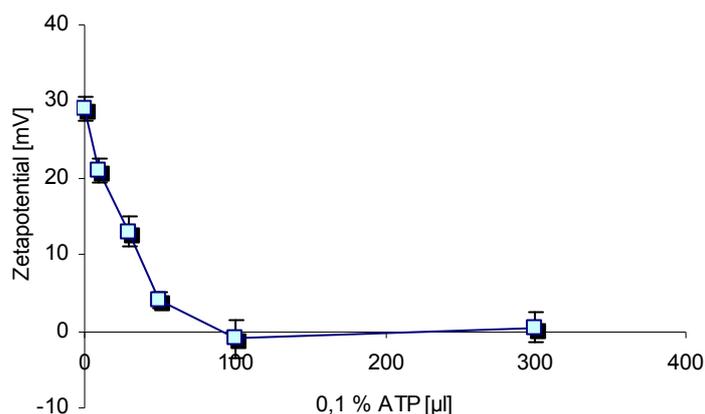


Abb. 94 Zetapotential ATP-modifizierter PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel

Die Titration der PEI-TSC-Ladungskomplexe mit ATP (vgl. Kap. 4.1.1.3a), bei welchen sich das Dissoziations-Gleichgewicht auch um 0 mV eingestellt hatte, resultierte in einer Substitution des Farbstoffes. Eine derartige Substitution war bei diesen Polymernanopartikeln

nicht zu erwarten, da PEI und IDCC in den festen PBCA-Polymerkern eingekapselt worden waren. Bedingt durch die Titration kam es allerdings zur Ladungsneutralität der Partikeloberfläche, wodurch die elektrostatische Stabilisierung stark verringert bzw. ganz aufgehoben wurde. Entsprechend der geringen Dicke der diffusen Schicht näherten sich die Partikel über den kritischen Punkt hinaus an. Durch überwiegende *van der Waals*-Anziehung kam es zur Agglomeration und einem Ausfallen der Partikel binnen weniger Stunden (siehe Kap. 2.4).

In dem folgenden Versuch sollte deshalb getestet werden, wie sich eine sterisch stabilisierende Komponente bei einer elektrostatischen Oberflächenmodifikation fester Polymernanopartikel auswirkt.

#### 4.3.3.2 Modifikation der PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel mit Glu(10)-b-PEG(110)

Für die Ladungstitration wurde das Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) verwendet, dessen 10 Glutaminsäure-Untereinheiten als Ladungsanker auf der kationischen Partikeloberfläche fungierten.

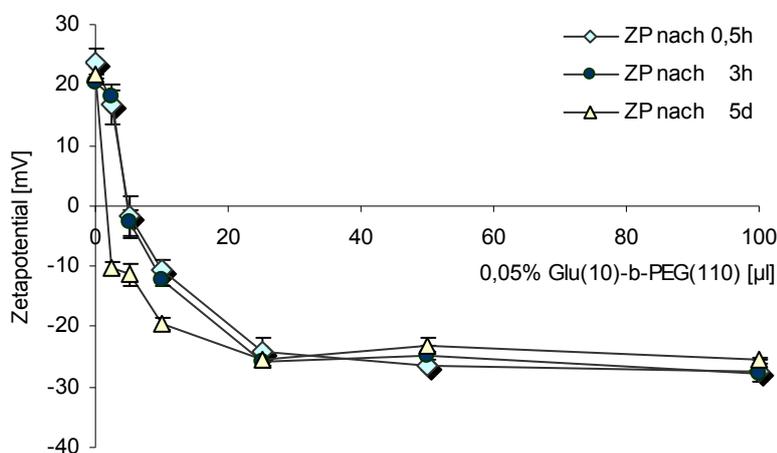


Abb. 95 Zetapotential Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel

Anhand von Abb. 95 wird deutlich, dass die Oberfläche über den Neutralpunkt hinaus titriert werden konnte und sich das Dissoziations-Gleichgewicht bei ca. -30 mV ergab.

Die Einstellung des neuen Zetapotentials der titrierten Partikel erfolgte binnen 30 Minuten. Nur bei Proben mit einem nahezu neutralen Oberflächenpotential fand innerhalb von fünf Tagen nochmals eine leichte Veränderung statt. Möglicherweise führte eine kompaktere

Anordnung des Titranten auf der Partikeloberfläche dazu, dass zuvor noch in Lösung befindliches Glu(10)-b-PEG(110) nachträglich auf der Partikeloberfläche gebunden werden konnte. Resultat war eine weitere Abnahme des Zetapotentials um ca. 10 mV. Die Titration mit dem Blockcopolymer führte zu oberflächenmodifizierten Partikeln, welche bei einer titrationsbedingten Änderung des Partikeldurchmessers von weniger als 20 nm als größenstabil bezeichnet werden können.

Fazit: Mit diesem System konnte gezeigt werden, dass mittels Nanopräzipitation der wasserlösliche Polyelektrolyt PEI in die hydrophobe PBCA-Matrix verkapselt werden kann. Voraussetzung ist die schlagartige Verdrängung des PBCA-Lösungsmittels, wodurch das Polymer während eines schnellen Fällungsprozesses auch hydrophile Substanzen höheren Molekulargewichtes partiell einschließen kann. Gut wasserlösliche, kleine Moleküle wie der Farbstoff TSC können während dieser Fällung durch schnelle Diffusionsprozesse in die äußere wässrige Phase übertreten und demzufolge allein nicht verkapselt werden. Liegt der Farbstoff während der Fällung mit einem Polyelektrolyten als Ionenkomplex vor, so ist eine Einkapselung zusammen mit dem Polyelektrolyten möglich. Die kationisch geladene Partikelhülle, Resultat der Verkapselung des Polyelektrolyten PEI in die PBCA-Partikelmatrix, kann durch Ladungstitration mit einem partiell anionisch geladenen Blockcopolymer stabil modifiziert werden kann, sofern dieses eine sterisch stabilisierende Komponente enthält. Kleine Moleküle wie ATP, ohne sterisch stabilisierenden Effekt, führten zur Destabilisierung der kolloidalen Dispersion.

#### **4.3.4 PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel**

Modifizierte Polymethacrylate finden aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften breite Anwendung als pharmazeutische Hilfsstoffe [87]. Das kationisch modifizierte Polyacrylat Poly(2-(dimethylamino)ethyl-methacrylat) (P(DMAEMA)) sollte in dem folgenden Versuch als bioabbaubare Alternative zu dem zuvor verwendeten PEI in die PBCA-Polymermatrix eingekapselt werden. Ziel war es, erneut Aminogruppen in die Partikeloberfläche zu integrieren, um sie anschließend für eine elektrostatische Modifikation der Partikeloberfläche zu nutzen.

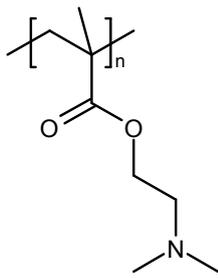


Abb. 96 Strukturformel von Poly(2-(dimethylamino)ethyl-methacrylat) = P(DMAEMA)

#### 4.3.4.1 Farbstoffbeladene PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel

Analog der Verkapselung des PEI konnte auch P(DMAEMA) in die PBCA-Matrix eingekapselt werden, wobei stabile Partikel mit einem Oberflächenpotential von ca. +40 mV entstanden. Die Größe der Nanopartikel konnte vor allem durch Variation der Polymerkonzentration in einem Bereich von ca. 100-300 nm eingestellt werden (siehe Abb. 103).

Für eine Detektion der Partikel im Rahmen von zellmikroskopischen Untersuchungen wurden im folgenden Schritt die Farbstoffe Cumarin 6, Diethyloxadicarbocyanin (DODC) und Sulforhodamin B eingekapselt (siehe Partikeldispersionen Abb. 98).

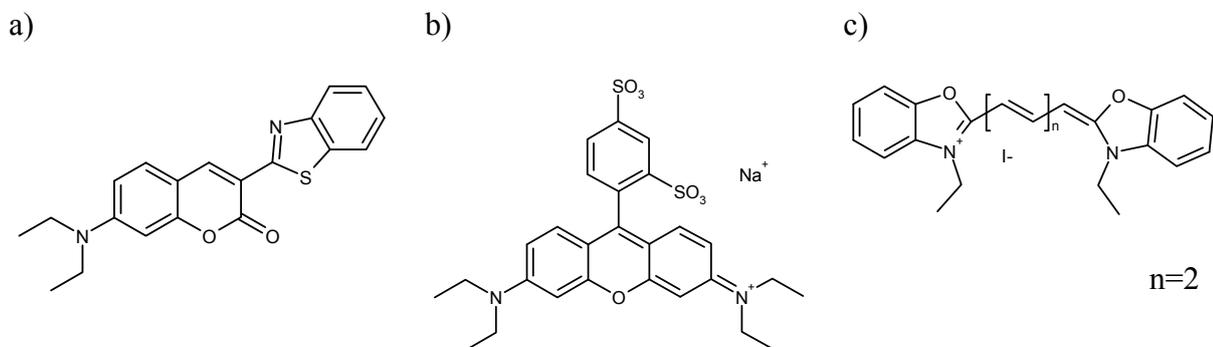


Abb. 97 Strukturformeln der Farbstoffe: a) Cumarin 6, b) Sulforhodamin B, c) DODC

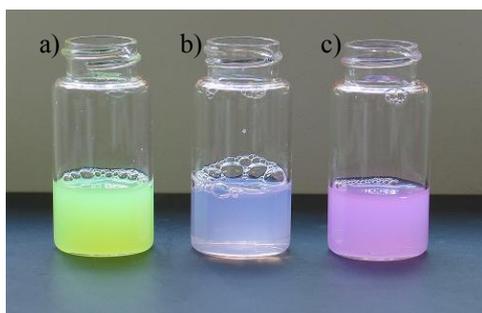


Abb. 98 PBCA-P(DMAEMA)-NP mit a) Cumarin 6, b) Sulforhodamin B und c) DODC

Bei der Herstellung wurden mit dem Tensid Synperonic T707 (1% w/w) die besten Ergebnisse bezüglich Partikelstabilität und Größenverteilung erzielt. Für weitere Modifikationsschritte wurden die Partikel aufgearbeitet, d.h. durch Waschprozesse nicht verkapseltes Polymer und Farbstoff entfernt (siehe PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel). Die Verwendung von CETAC als Waschtensid gewährleistete eine gute Redispersierbarkeit nach Zentrifugation. Die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung sind in Abb. 99 und Abb. 100 dargestellt.

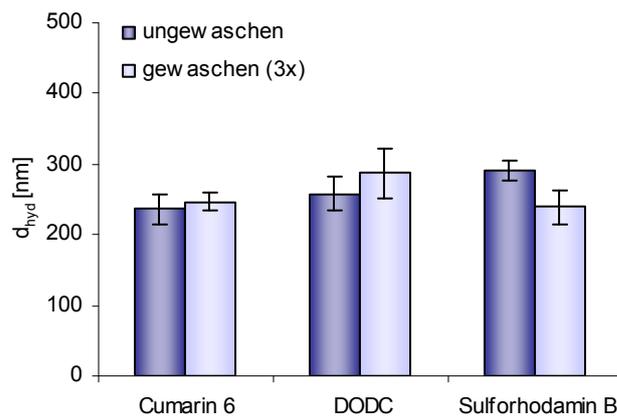


Abb. 99 Partikeldurchmesser  $d_{hyd}$  gewaschener und ungewaschener PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel

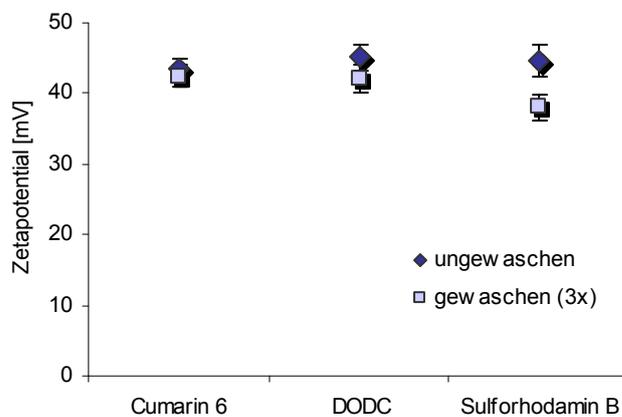


Abb. 100 Zetapotential gewaschener und ungewaschener PBCA-P(DMAEMA)- Nanopartikel

Bei der Aufarbeitung der Sulforhodamin B beladenen Partikel stellte sich heraus, dass dieser Farbstoff, vermutlich aufgrund seines hydrophileren Charakters, größtenteils ausgewaschen wurde. Für weitere Versuche wurden deshalb nur mit Cumarin 6 und DODC- beladene Partikel verwendet.

Eine optische Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte mit Hilfe von REM-Aufnahmen. Wie aus Abb. 101 und Abb. 102 hervorgeht, waren sphärische Nanopartikel mit einem Durchmesser um 150 nm entstanden. Die mit Hilfe der REMs bestimmten Partikelgrößen deckten sich mit den zuvor durch dynamische Lichtstreuung gemessenen Partikelgrößen. Eine kugelförmige Gestalt, Voraussetzung für eine korrekte Bestimmung der Partikelgrößen mittels DLS, konnte anhand der REM-Aufnahme bestätigt werden.

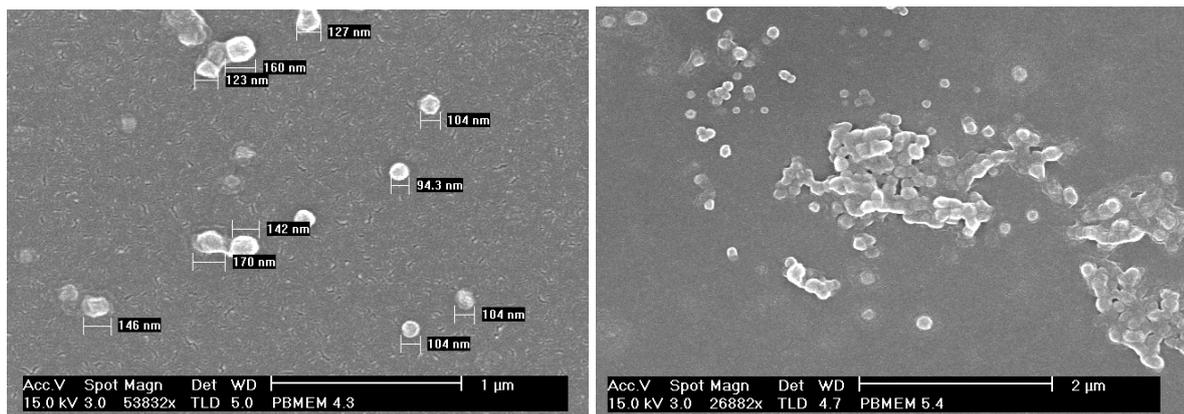


Abb. 101 REM-Aufnahme DODC-beladener PBCA-P(DMAEMA)-NP

Abb. 102 REM-Aufnahme Cumarin 6-beladener PBCA-P(DMAEMA)-NP

Die Partikelgröße der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel konnte während der Herstellung durch Variation der Polymerkonzentration gesteuert werden (siehe Abb. 103). Dafür wurde das in die Tensidphase injizierte Volumen der organischen Polymerlösung konstant gehalten und nur die Polymerkonzentration entsprechend verändert. Ergebnis war ein Partikelgrößenunterschied von ca. 50 nm, sofern ansonsten konstante Herstellungsbedingungen (Tensidkonzentration, Polymerverhältnis PBCA:P(DMAEMA)=10:1, Farbstoffkonzentration, Temperatur, Rührgeschwindigkeit / Rührfisch, Gefäß, Art der Injektion) vorlagen. Somit konnten aufgrund eines geringeren Feststoffanteils in der Tensidphase kleinere Partikeldurchmesser stabilisiert werden. Demzufolge ist ein größeres Flottenverhältnis  $S$ , welches definiert ist als Quotient aus der Masse von Tensid zu Polymer, entscheidend für die Stabilisierung kleinerer Partikeldurchmesser. Auch Horn et al. kamen zu dem Schluss, dass die Partikelgröße mit sinkender Polymerkonzentration in der Lösungsphase aufgrund der Materialbilanz und der abnehmenden Viskosität abnimmt [111].

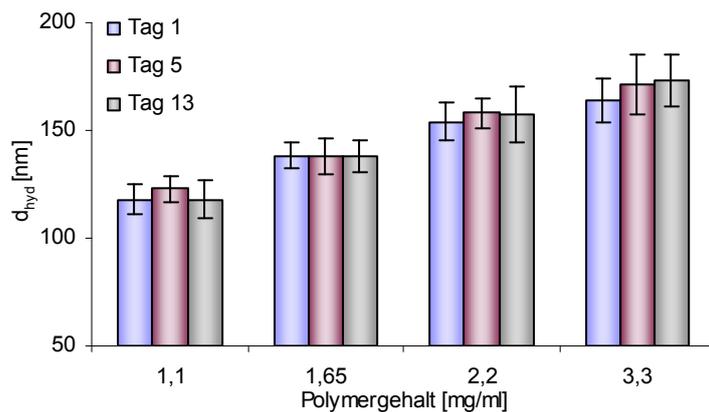


Abb. 103 Steuerung des Partikeldurchmessers  $d_{\text{hyd}}$  durch Änderung der Polymerkonzentration

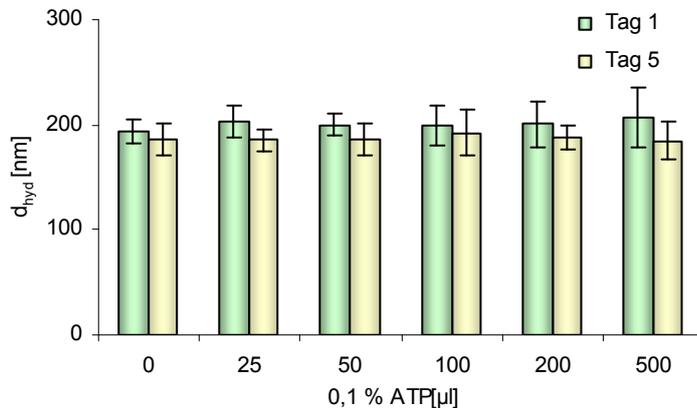
Durch eine sehr hohe Rührgeschwindigkeit sowie ein gleichmäßiges, schnelles Einspritzen des Polymer-Substanzgemisches in die Tensidphase konnten Nanopartikel mit einer engen Größenverteilung hergestellt werden ( $PI < 0,15$ ).

Um ein nachträgliches Partikelwachstum zu verhindern, wurde das Lösungsmittel auf hoher Rührstufe über einen Zeitraum von mindestens 15 Stunden entfernt. Anschließend war ein Aufkonzentrieren der Partikel durch Zentrifugation und Redispergieren in einem geringeren Tensidvolumen ohne Stabilitätsverlust durchführbar.

#### 4.3.4.2 Oberflächenmodifikationen mit Adenosintriphosphat

Die zuvor mit ATP durchgeführte Oberflächenmodifikation von PBCA-PEI-Nanopartikeln hatte gezeigt, dass eine Titration bis zum Dissoziations-Gleichgewicht von 0 mV ohne zusätzliche sterische Stabilisierung zur Agglomeration der Partikel führt.

In dem anschließenden Versuch sollte geprüft werden, ob die Verwendung einer alternativen polykationischen Oberfläche (P(DMAEMA) statt PEI) einen Einfluss auf das Stabilitätsverhalten der Partikel nach Titration mit ATP besitzt. Von Interesse war auch, ob die verkapselten Fluoreszenzfarbstoffe einen Einfluss auf die Titration haben.

a) *Cumarin 6* beladene PBCA-P(DMAEMA)-NanopartikelAbb. 104 Partikeldurchmesser  $d_{hyd}$  der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel nach Titration mit ATP

Die Titration der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel mit ATP führte nicht wie bei PBCA-PEI-Nanopartikeln zu einem Dissoziations-Gleichgewicht um 0 mV, sondern dieses stellte sich bei ca. +15 mV ein. Vermutlich waren die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen P(DMAEMA) und ATP weniger stark ausgeprägt, weshalb ab einem Zetapotential von +15 mV keine weiteren ATP Moleküle auf der Oberfläche elektrostatisch angelagert werden konnten, sondern stattdessen frei in Lösung diffundierten. Die offensichtlich zwischen PEI und ATP stärkere Wechselwirkung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass PEI eine höhere Ladungsdichte als P(DMAEMA) aufweist.

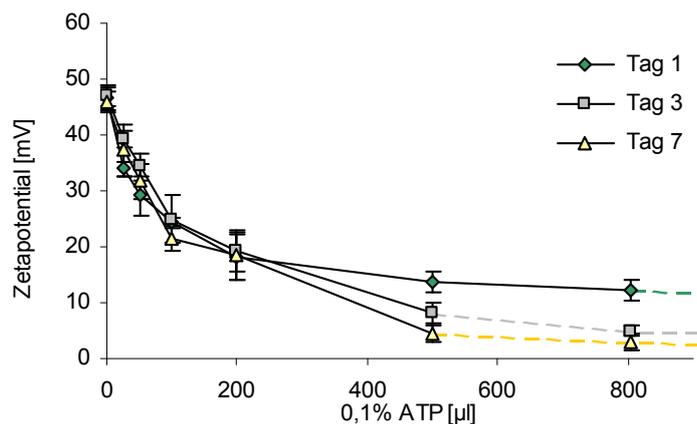


Abb. 105 Zetapotential der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel nach Titration mit ATP

Bis zur Titrationsstufe 500  $\mu$ l konnte das Zetapotential kontinuierlich gesenkt werden, jedoch führte auch bei dieser Titration ein Überschuss von ATP zur Destabilisierung der Partikel. Nanopartikel mit einem Oberflächenpotential zwischen +15 mV und +20 mV nach Titration

besaßen trotz partieller Kompensierung der Ladungen noch ein ausreichend hohes Oberflächenpotential für eine elektrostatische Stabilisierung, weshalb kein Partikelwachstum stattfand. Die geringfügig kleineren Partikeldurchmesser sind eventuell auf die durch Ladungstitration verringerte Ionenhülle (diffuse Schicht) zurückzuführen. Eine schwächere Hydratisierung, verursacht durch die veränderten Ladungsverhältnisse auf der Partikeloberfläche, würde ebenso einen geringeren hydrodynamischen Durchmesser erklären.

*b) DODC-beladene PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel*

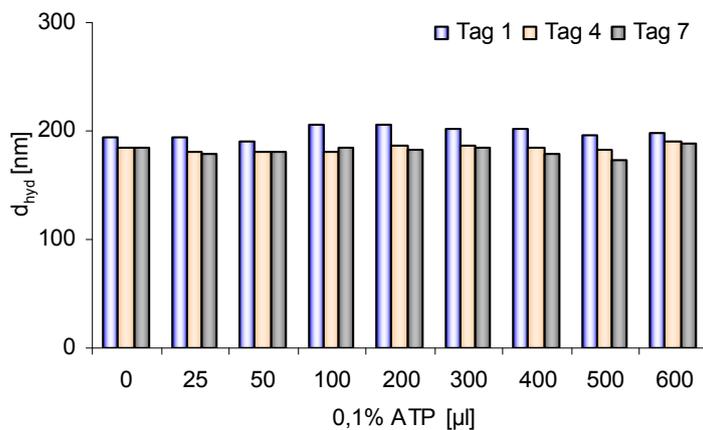


Abb. 106 Partikeldurchmesser  $d_{hyd}$  der DODC beladenen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel nach Titration

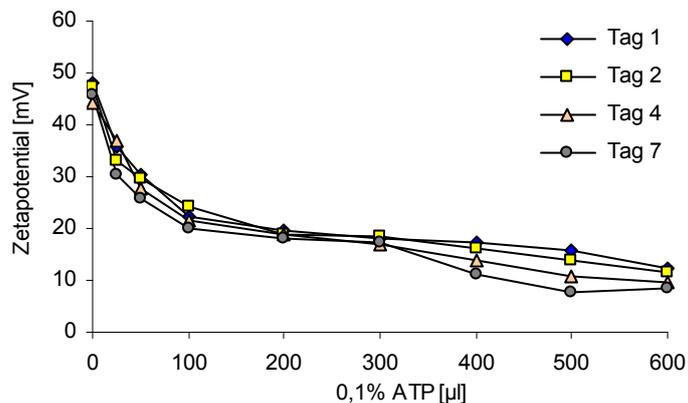


Abb. 107 Zetapotential der DODC beladenen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel nach Titration

Die Ergebnisse der Titration der DODC beladenen Nanopartikel mit ATP glichen im Wesentlichen der zuvor beschriebenen Titration unter Kap. 4.3.4.2 a). Auch hier stellte sich ein Dissoziations-Gleichgewicht bei ca. +15 mV ein. Erst bei einem deutlichem Überschuss von ATP in der Dispersion kam es zur Destabilisierung der Partikel. Die titrierten Partikel

zeigten eine leichte Partikelgrößenabnahme, möglicherweise auch durch Verdünnungs- und anschließende Auswascheffekte verursacht.

#### 4.3.4.3 Oberflächenmodifikation mit Folsäure

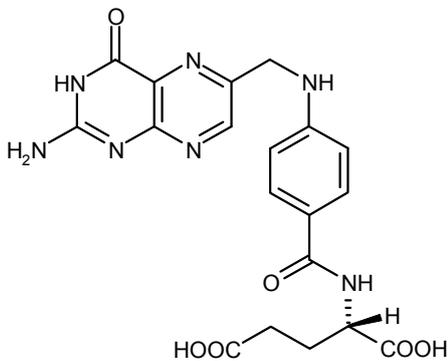


Abb. 108 Strukturformel Folsäure (FS)

Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass bestimmte Tumorarten auf der Zelloberfläche verstärkt Folsäure-Rezeptoren exprimieren. Mit Hilfe verschiedener Markierungen an der Carbonsäurefunktion wurde bereits der Nachweis erbracht, dass ein Folsäure-vermitteltes aktives Targeting *in vitro* und *in vivo* aufgrund der beschriebenen Rezeptor-Überexpression möglich ist [188].

Durch eine geringfügige chemische Abwandlung der Pteroinsäure-Struktur wurden Folsäureantimetaboliten wie das Methotrexat entwickelt [189]. Ihre höhere Affinität zur Dihydrofolsäurereductase macht deutlich, dass es sich bei dem rezeptorrelevanten Molekülteil um die veränderte Pteroinsäure-Unterstruktur handeln muss. Deshalb wurde auch die Rezeptorinteraktion durch eine Kopplung von Farbstoffen oder Wirkstoffen am Glutaminsäurerest nicht behindert. Daraus wurde geschlossen, dass der Glutaminsäurerest genutzt werden kann, um Folsäure durch elektrostatische Interaktion auf eine kationische Partikeloberfläche aufzubringen. Der für die Bindungsaktivität verantwortliche Molekülteil würde auf der Partikeloberfläche für eine Rezeptor-Wechselwirkung zur Verfügung stehen.

Die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung nach stufenweiser Ladungstitration mit Folsäure sind in Abb. 109 und Abb. 110 dargestellt.

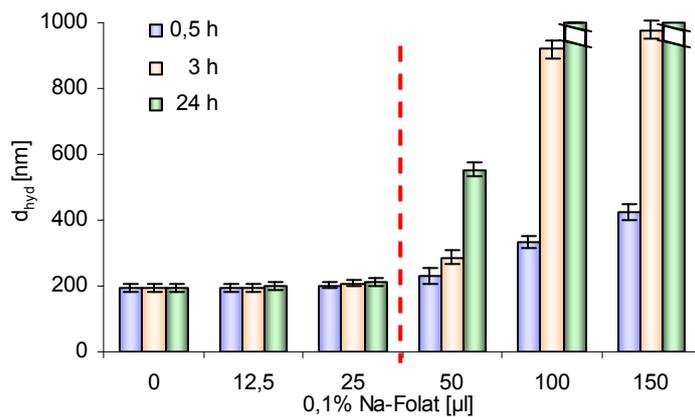


Abb. 109 Partikeldurchmesser  $d_{hyd}$  von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln nach Titration mit Folsäure; Balken markiert beginnende Destabilisierung der Komplexe

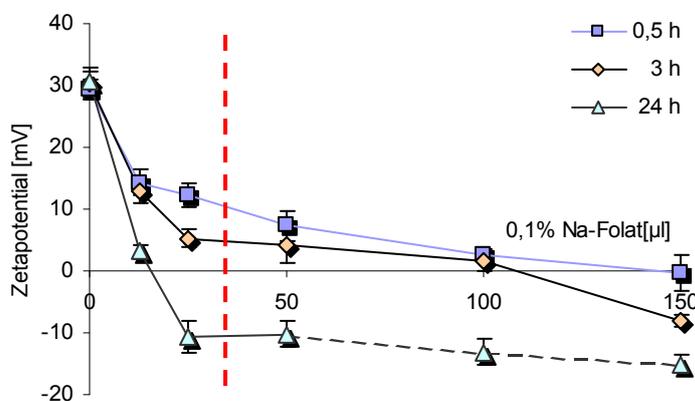


Abb. 110 Zetapotential von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln nach Titration mit Folsäure; Balken markiert beginnende Destabilisierung der Komplexe

Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Ladungstitrationen mit ATP oder Glu(10)-b-PEG(110) erfolgte die Einstellung des Oberflächenpotentials und damit die elektrostatische Anlagerung der Folsäure sehr langsam. Das Dissoziations-Gleichgewicht um -12 mV wurde erst ungefähr 24 h nach Titration erreicht.

Ein möglicher Grund könnte die geringere Ladungsstärke der Carbonsäure mit einem  $pK_s(1)$  von 2,19 und einem  $pK_s(2)$  von 4,25 sein [122]. Der für die elektrostatische Interaktion der Carbonsäure entscheidende  $pK_s(2)$  mit 4,25 ist deutlich schwächer als der  $pK_s(1)$  2,16 der Phosphat-Gruppen des ATP. Das erklärt aber nicht, warum das ladungsstärkere ATP nur eine Senkung des Zetapotentials auf 0 mV bewirkte. Die insgesamt stärkere Minderung des Oberflächenpotentials könnte darauf zurückzuführen sein, dass Folsäure eine deutlich schlechtere Löslichkeit in Wasser (0,0016 mg/ml bei 25°C; [190]) aufweist im Vergleich zum sehr gut löslichen ATP. Somit ist im Fall der Folsäure aufgrund der geringeren Ladungsstärke

der Carbonsäure die Salzbildung auf der Partikeloberfläche zwar deutlich langsamer, aber stabiler. Die Tendenz der oberflächenassoziierten Moleküle wieder in Lösung zu gehen wird aufgrund der schlechteren Löslichkeit nicht unterstützt. Das könnte die insgesamt stärkere Minderung des Oberflächenpotentials durch Folsäure gegenüber ATP erklären.

Die Titration von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln mit Folsäure durch Ausnutzung elektrostatischer Wechselwirkungen ist grundsätzlich möglich, zeigte aber auch bei diesem System, dass die kolloidale Stabilität nachteilig beeinflusst werden kann.

#### 4.3.4.4 DSC-Untersuchung

Mit Hilfe von DSC-Messungen wurde untersucht, inwiefern die einzelnen Bestandteile der Nanopartikel sich auf das kalorimetrische Verhalten der Partikel auswirken bzw. darin widerspiegeln.

Aus Abb. 111 ist erkennbar, dass das thermische Verhalten der gewaschenen und lyophilisierten Partikeldispersion vor allem durch das Tensid T707 bestimmt wird, welches die äußere stabilisierende Partikelhülle in wässriger Lösung bildet. Die DSC-Kurve zeigt weder die Charakteristika des PBCA, noch sind die typischen Peaks des Farbstoffes oder des Polymers P(DMAEMA) aufgetreten. Das ist ein Hinweis dafür, dass die nicht detektierbaren Substanzen im Partikelkern eingeschlossen waren und auf der Partikeloberfläche befindliches Material vollständig durch Waschprozesse abgetrennt wurde.

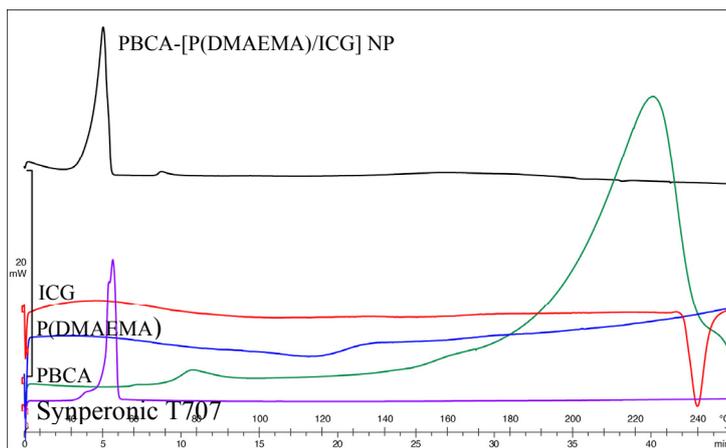


Abb. 111 DSC-Thermogramme der lyophilisierten PBCA-[P(DMAEMA)/ICG]-NP und ihrer Ausgangssubstanzen

### 4.3.5 Zusammenfassung feste Polymernanopartikel

Anhand von zwei verschiedenen Systemen (PBCA/PEI und PBCA/P(DMAEMA)) konnte gezeigt werden, dass mittels Nanopräzipitation eine Verkapselung von höhermolekularen Polykationen in die hydrophobe PBCA-Matrix möglich ist. Dagegen konnten hydrophile, niedermolekulare Verbindungen wie der Farbstoff TSC oder kurzkettige Polyamine allein nicht stabil in den Polymerkern verkapselt werden. Eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit und die starke Affinität zu Wasser sind vermutlich die Ursache dafür, dass diese Verbindungen während des Fällungsprozesses in die wässrige Tensidphase wechselten, bevor sie in den festen PBCA-Polymerkern eingeschlossen werden konnten. Die Bildung eines Ionenkomplexes aus niedermolekularem Farbstoff und Polykation könnte Ursache dafür sein, dass der Gesamtkomplex eine geringere Affinität zu Wasser hatte und sich deshalb durch schlagartige Fällung mit dem Matrixpolymer PBCA in den Partikelkern einbauen ließ. Die geringere Diffusionsgeschwindigkeit höhermolekularer Verbindungen spielt dabei offenbar eine entscheidende Rolle.

Basierend auf einer Verkapselung von Aminverbindungen in die Polymermatrix konnten funktionalisierte PBCA-Nanopartikel hergestellt werden. Mittels elektrostatischer Wechselwirkungen wurden verschiedene Modifikationen der kationischen Partikeloberfläche durchgeführt. Als entscheidende Parameter für eine erfolgreiche Modifikation wurden identifiziert: (i) die Stärke der Ladungswchselwirkungen, (ii) die Löslichkeit des Titranten im umgebenden Medium sowie (iii) eine sterisch stabilisierende Komponente zum Ausgleich der geminderten elektrostatischen Stabilisierung. Die zu Detektionszwecken eingesetzten bzw. als Modellarzneistoff dienenden Farbstoffe Cumarin 6 und DODC hatten keinen Einfluss auf die Ladungstitration. Inwiefern sich diese funktionalisierten PBCA-Partikel bei der zellulären Aufnahme und Freisetzung aus Endolysosomen verhalten, wird im folgenden Kapitel mit Hilfe von Zellkulturversuchen untersucht werden.

Fazit: Diese Art der kolloidalen Systeme bietet die Möglichkeit, sowohl hydrophobe als auch anionisch geladene, hydrophile Komponenten in kationisch funktionalisierte Polymernanopartikel zu verkapseln, woraus sich eine Reihe von Vorteilen ergeben:

- Verkapselung sowohl gut wasserlöslicher diagnostischer Farbstoffe wie TSC als auch hydrophober Wirkstoffe möglich,

- Möglichkeit der flexiblen Oberflächenmodifikation auf Basis elektrostatischer Wechselwirkungen, welche aufgrund der einfachen Umsetzung auch durch verschiedene Nutzer direkt vor der Anwendung durchgeführt werden kann,
- kationischer Kernpartikel kann unmodifiziert separat gelagert werden, ein positiver Aspekt vor allem für die kolloidale Langzeitstabilität,
- separate Herstellung und Lagerung der Zielstruktur (des Titranten) verbessert Handhabung und Stabilität, vor allem im Hinblick auf die Nutzung von Peptiden oder Antikörpern,
- Möglichkeit eines Oberflächen-Screening: unterschiedliche Oberflächen bzw. Zielstrukturen auf dem diagnostischen Kernpartikel werden hinsichtlich einer optimalen Anreicherung im Zielgewebe direkt am Patienten getestet,
- Therapeutischer Nutzen: Kombination einer durch ein Oberflächen-Screening selektierten, erfolgreich getesteten Zielstruktur mit einem therapeutischen Nanopartikel ermöglicht den gezielten Transport des Wirkstoff zum Wirkort, wodurch dem Patienten ein optimales nanopartikuläres Drug Delivery System zur Verfügung gestellt wird.

Die im Anschluss diskutierten Zellkulturversuche werden zeigen, dass der kationische Kernpartikel innerhalb der Zellen zusätzlich Vorteile bezüglich einer verbesserten Freisetzung aus den Endolysosomen bietet.

## 4.4 Zellkulturversuche

### *Einleitung*

Um einen optimalen Wirkungsgrad mit partikulär verkapselten Arzneistoffen zu erzielen ist es notwendig, genaue Kenntnisse über die Aufnahme und Verteilung der Nanopartikel in speziellen Zellpopulationen oder bestimmten Geweben zu besitzen [191][192]. Neben einer effektiven Internalisierung ist vor allem die endolysosomale Freisetzung der Partikel entscheidend.

Ziel der zellmikroskopischen Untersuchungen war es, nähere Informationen über das Zellaufnahmeverhalten elektrostatisch oberflächenmodifizierter Nanopartikel zu erlangen. Bei den verwendeten Partikeln handelt es sich um die im Kap. 4.3.4 beschriebenen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel. Es wurde bereits gezeigt, dass PBCA-Partikel durch die Verkapselung des kationischen Polyacrylates P(DMAEMA) eine positive Oberflächenladung besitzen. Diese Partikeloberflächen wurden durch Ladungstitration modifiziert.

Um die Aufnahme, Verteilung und Stärke der Anreicherung der Partikel in der Zelle nach Inkubation detektieren zu können, wurde zusätzlich der Farbstoff Cumarin 6 in die Partikel verkapselt. Dieser Farbstoff ist als Fluoreszenzmarker in Nanopartikeln geeignet, da er in Wasser sehr schwer löslich ist und in physiologischen Pufferlösungen nur geringste Mengen diffusionsvermittelt freigesetzt werden. Panyam et al. hatten gezeigt, dass in Nanopartikel verkapseltes Cumarin 6 über einen Zeitraum von 48 h bei pH 7,4 zu 0,45% und bei pH 4 zu 0,1% freigesetzt wird [125][194]. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass Cumarin 6 bei entsprechenden physiologischen pH-Werten nicht oder nur minimal aus der Partikelhülle diffundiert [193]. Hinzu kommt, dass die hier beschriebenen Zellkulturuntersuchungen bei einer maximalen Inkubationszeit von 1 h stattfanden.

Für die Versuche wurden HeLa-Zellen verwendet. Die von einem Zervix-Karzinom stammende adhärente Zelllinie bildet in Kultur eine einschichtige Zellschicht (*Monolayer*) aus, welche gute Voraussetzungen für zellmikroskopische Untersuchungen liefern. In Abb. 112 ist ein Ausschnitt unbehandelter HeLa-Zellen nach Aufnahme durch ein Lichtmikroskop dargestellt. Erkennbar sind die für diese Zelllinie typische Morphologie unter geeigneten Kulturbedingungen (siehe Kap. 7.1.2).

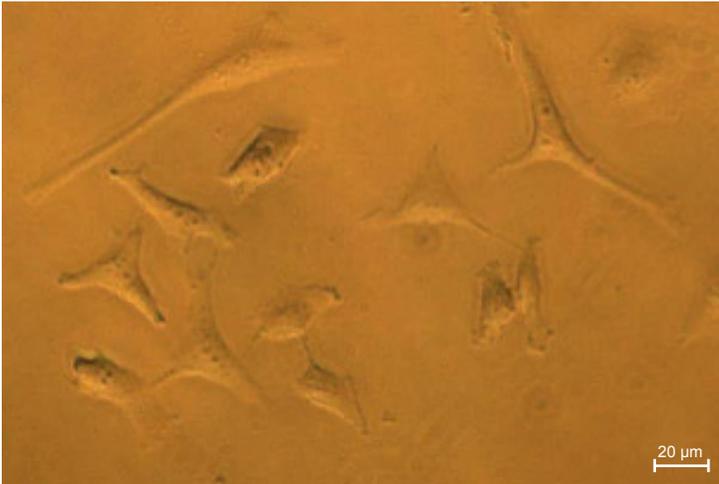


Abb. 112 HeLa-Zellen (unbehandelt) nach Aufnahme durch ein Lichtmikroskop

#### 4.4.1 Einfluss der Partikelauflösung

Um generelle Effekte der Partikeldispersion auf die Zellen einschätzen zu können, wurden zu Beginn der Untersuchungen ungewaschene, Cumarin 6 beladene PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel inkubiert. Die digitale Aufnahme der fluoreszierenden Zellen erfolgte als 16bit Graustufen-Intensitätsverteilung. Um eine gemeinsame Darstellung verschiedener Fluoreszenzfarbkanäle zu ermöglichen, wurden entsprechend der Fluoreszenzemission der eingesetzten Farbstoffe die Bilder für die Aufbereitung eingefärbt. Ein Großteil der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dieses Kapitels können zur genaueren Betrachtung in höherer Auflösung noch einmal im Bildanhang nachgeschlagen werden.

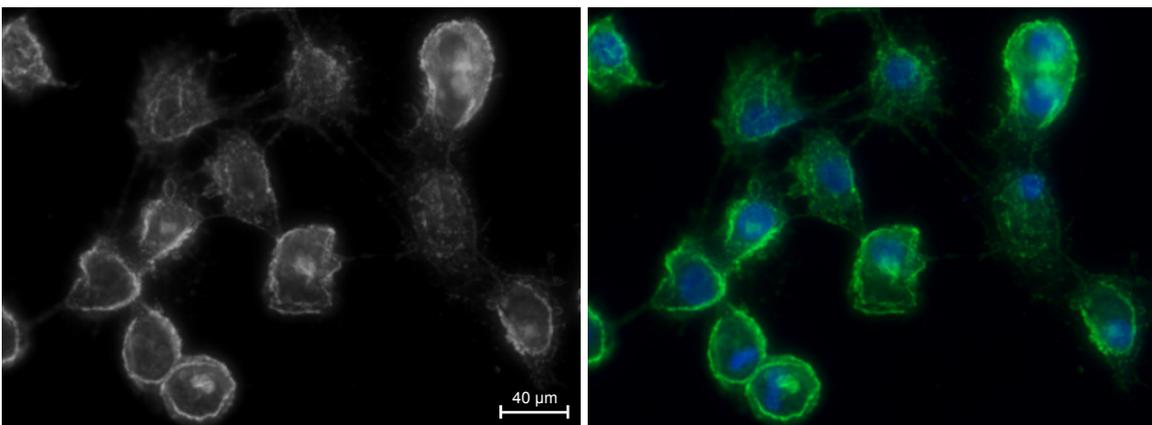


Abb. 113 HeLa-Zellen nach Inkubation mit ungewaschenen Partikeln a) Fluoreszenz der NP in Graustufen, b) Einfärbung: grüne Fluoreszenz der NP, blaue Fluoreszenz markiert den Zellkern (Höchstfärbung)

Der Vergleich der Abb. 112 und Abb. 113 macht deutlich, dass nicht verkapselte Bestandteile wie P(DMAEMA) und Cumarin 6 einen Einfluss auf die Zellmorphologie hatten. Typische

längliche Strukturen wie bei unbehandelten Zellen waren bei diesen Zellen eher abgerundet. Eine veränderte Morphologie ist ein Zeichen dafür, dass die normalen Zellprozesse gestört worden sind, wahrscheinlich durch zu hohe Konzentrationen der nicht verkapselten Bestandteile. Der äußere helle Kranz um die gesamte Zelle lässt vermuten, dass aufgrund des überschüssigen kationischen Polyacrylates die Partikel eine sehr hohe Affinität zur Zelloberfläche besaßen und dadurch extrem fest hafteten. Trotzdem nach Inkubation mehrere Waschprozesse durchgeführt wurden, konnten die Partikel nicht von der Zelloberfläche entfernt werden. Die Anfärbung des Zellkerns mit dem blauen Höchstfarbstoff lässt deutlich erkennen, dass sich durch die Probeneinwirkung die Zellmembran teilweise in welligen Einstülpungen um den Kern zusammengezogen hat. Auch dieser Prozess ist Zeichen für eine Beeinträchtigung der zellphysiologischen Prozesse.

#### 4.4.2 Einfluss funktionalisierter Partikeloberflächen auf die Zellaufnahme

Für den folgenden Versuch war von Interesse, welchen Einfluss die elektrostatisch aufgetragenen Partikeloberflächen Folsäure und das Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) im Vergleich zu unmodifizierten Partikeln bei der Zellaufnahme haben. Die Partikel wurden vor der Inkubation hinsichtlich ihrer Größe und des Oberflächenpotentials nach der Modifikation vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7 Partikeldurchmesser  $d_{\text{hyd}}$ , Polydispersitätsindex und Zetapotential (nicht)-funktionalisierter cumarinbeladener PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel (NP)

	Größe $d_{\text{hyd}}$ [nm]	Polydispersitätsindex [PI]	Zetapotential [mV]
Unmodifizierte NP	191	0,13	+ 31,5 ± 1,5
NP mit Folsäure	195	0,06	+ 8,1 ± 3,7
NP mit Glu-PEG	208	0,08	- 28,4 ± 1,2

Anhand eines Vergleiches der Zetapotentiale ist erkennbar, dass aufgrund der Titration die positiven Oberflächenladungen der Ausgangspartikel im Fall von Folsäure zum Teil kompensiert wurden bzw. eine vollständige Umladung der Oberflächenladungen in den negativen Bereich mit Glu(10)-b-PEG(110) stattgefunden hatte. Die Absättigung der

Oberfläche mit dem Blockcopolymer führte zu einem geringfügigen Anstieg der Partikelgröße, welche aber gegenüber dem Ladungseinfluss für die Zellaufnahme vermutlich eine untergeordnete Rolle spielte.

In der für den Versuch verwendeten 96-Wellplatte hatten alle Wells die gleiche Zelldichte (Aussaat 24 h vor Versuch:  $1 \times 10^4$  Zellen). Inkubiert wurde eine konstante Partikelkonzentration der in der Tabelle aufgeführten Partikel über einen Zeitraum von 60 Minuten im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, fixiert und am Folgetag vermessen (Details siehe Kap. 7.1.2). Die Aufnahme der fluoreszierenden Zellen erfolgte mit einem automatischen Fluoreszenzmikroskop bei 20-facher Vergrößerung und konstanter Belichtungszeit.

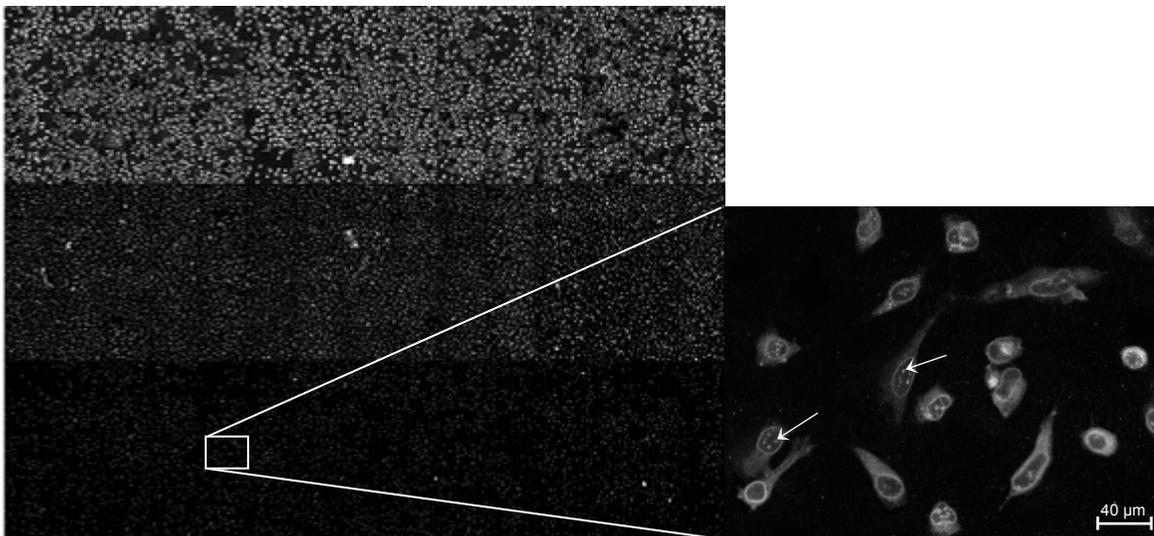


Abb. 114 a) Vergleich des Zellaufnahmeverhaltens nach Oberflächenmodifikation; Reihe 1: unmodifizierte Partikel; Reihe 2: NP mit Folsäure; Reihe 3: NP mit Glu(10)-b-PEG(110); Abb.106 b) Ausschnitt: Reihe 3/ Well 1/ Site 15; Pfeile markieren deutliche Fluoreszenzverstärkung im Zellkern

Bei der in Abb. 114 dargestellten Übersicht handelt es sich pro Reihe um je 3 Wells einer 96-Platte, wobei von jedem Well 25 einzelne Felder (*Sites*) aufgenommen worden waren. Da die Zellen in der Übersicht nur als helle Punkte wahrgenommen werden, ist zur Veranschaulichung ein Feld vergrößert dargestellt. Analog der Reihenfolge der Partikel in Tab. 7 wurden inkubiert: Reihe 1: unmodifizierte Partikel; Reihe 2: NP mit Folsäure; Reihe 3: NP mit Glu(10)-b-PEG(110).

Die vergrößerte Aufnahme lässt erkennen, dass bei aufgereinigten Partikeln die Morphologie der Zellen weniger beeinflusst wird. Anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität wird deutlich, dass durch ein gemindert positives Oberflächenpotential offensichtlich weniger

Partikel in die Zellen aufgenommen wurden. Eine Erklärung hierfür ist, dass stark kationisch geladene Partikel besser elektrostatisch mit den sulfatierten Proteoglykanen der Zelloberfläche interagieren, wodurch eine bessere Partikeladhäsion verursacht wird. Dieser Effekt wurde vor allem für hoch kationisch geladene Polyplexe oder Lipoplexe beschrieben [195][196][197].

Kationische Polyplexe, eine Alternative für virale Genvektoren, entstehen durch elektrostatische Komplexierung (Kondensation) von DNA mit kationischen Polyelektrolyten [198][199]. Sie sollen aufgrund ihrer ähnlichen Oberflächeneigenschaften bei der Diskussion der hier untersuchten Partikel näher mit einbezogen werden.

Polyplexe können durch Variation der Prozessbedingungen sowohl im Nano- als auch im Mikrometerbereich hergestellt werden [200][201][202]. Je höher die Nettooberflächenladung durch Überschuss des kationischen Polyelektrolyten ist, desto besser erfolgt eine Transfektion [203]. Vor allem mit PEI, dem Polykation mit der höchsten Ladungsdichte, konnten hervorragende Transfektionsraten erzielt werden [204]. Als eine Ursache wird die bessere Adhäsivität auf Zellen, bedingt durch die stark kationische Partikeloberfläche, angenommen.

Das scheint auch bei den hier untersuchten Partikeln der Fall zu sein. Je mehr Partikel durch starke elektrostatische Wechselwirkungen direkt auf der Zelloberfläche lokalisiert waren, desto mehr konnten mittels Endozytose internalisiert werden. Unmodifizierte Partikel mit einem Zetapotential von +31,5 mV ergaben entsprechend den stärksten Fluoreszenzkontrast. Im Vergleich dazu wurde ein deutlich geringerer Kontrast bei Partikeln mit einer negativen Oberflächenladung von -28 mV und PEG-Hülle erzielt.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass nicht zwischen den auf der Oberfläche haftenden und wirklich internalisierten Partikeln unterschieden werden kann. Wie anhand von Abb. 113 gezeigt wurde, werden durch elektrostatische Wechselwirkungen auf der Partikeloberfläche stark haftende Partikel auch nicht durch Waschprozesse entfernt. Dementsprechend wirkt die äußere Zellumrandung wie eine leuchtende Hülle. Eine quantitative Bestimmung der Fluoreszenz mittels *Flow-Cytometrie* (FACS), wie häufig für derartige Untersuchungen verwendet, unterscheidet nicht zwischen der Fluoreszenz internalisierter und außen haftender Partikel. Welche Partikeloberflächenladung die beste Zellaufnahme zur Folge hat, kann deshalb per FACS nicht korrekt bzw. mit absoluten Werten festgestellt werden.

Anhand der Übersicht in Abb. 114 kann aber gezeigt werden, dass durch kationische Oberflächenladungen die Partikeladhäsivität auf HeLa-Zellen erhöht ist und dadurch die Aufnahme in die Zelle verstärkt erfolgen kann.

#### **4.4.3 Zellaufnahmeverhalten Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel**

In dem folgenden Abschnitt soll der allgemeine Aufnahmeprozess der Glu(10)-b-PEG(110) modifizierten Partikel in die Zellen betrachtet werden, bevor auf Konzentrations- und Zeiteffekte dieser Partikel näher eingegangen wird. Die Aufarbeitung und Inkubation der hier untersuchten Partikel ( $d_{\text{hyd}} = 171 \text{ nm}$ ;  $ZP = -33 \text{ mV}$ ) ist identisch mit dem experimentellen Teil im folgenden Kapitel. Die Bildaufarbeitung inklusive der Falschfarbendarstellungen wurden mit der Software ARIVIS Browser 1.6 erstellt [205].

Nach derzeitigem Wissensstand besitzt die elektrostatisch aufgebraute PEG-Oberfläche keine spezifische Affinität zu einem auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptor. Da bei diesen modifizierten Partikeln die messbaren oberflächenassoziierten Ladungen durch die Glutaminsäurereste des Blockcopolymers negativ sind, ist auch eine elektrostatische Interaktion mit den sulfatierten Proteoglykanen oder anderen anionischen Membranbestandteilen nicht anzunehmen. Demzufolge findet vermutlich die Aufnahme der Partikel ohne die Vermittlung eines Rezeptors über *Clathrin-coated pits* oder *Calveoli* statt (siehe Kap. 2.2.2.3).

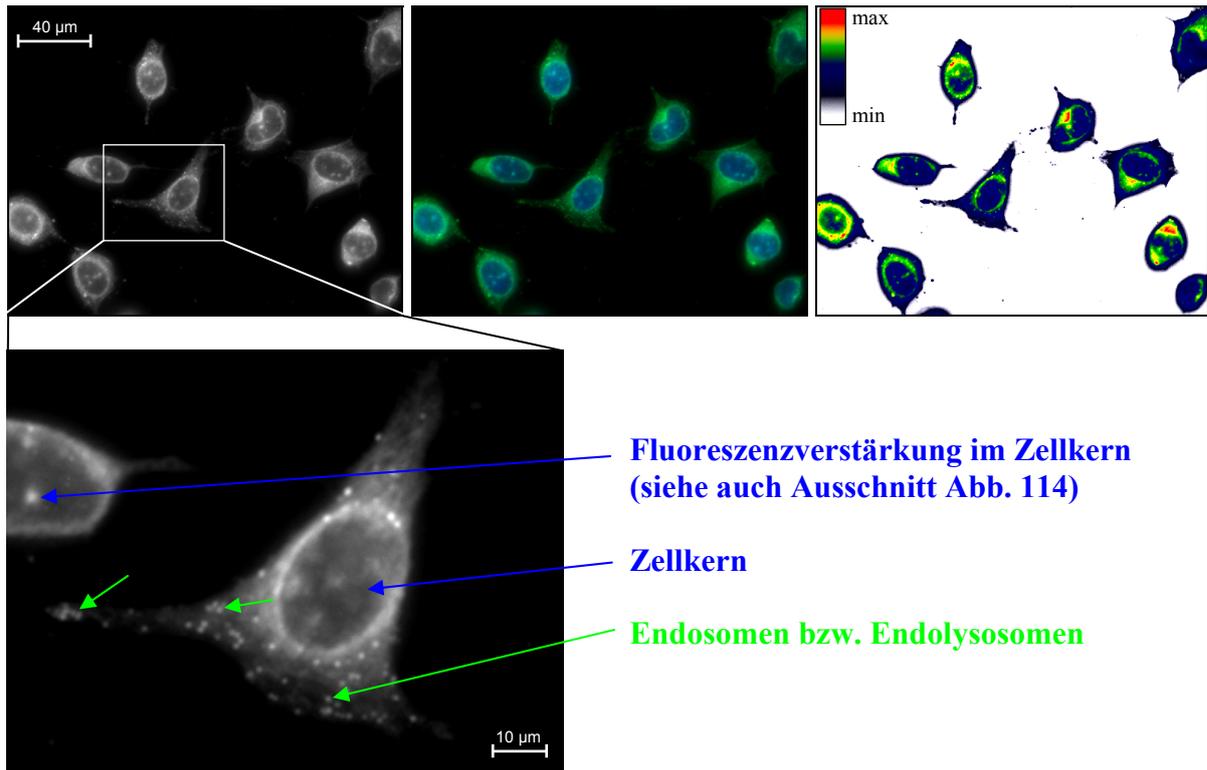


Abb. 115 Nanopartikelaufnahme in HeLa-Zellen; a) Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung; b) farbliche Abgrenzung der Fluoreszenz der NP (grün) und des Zellkerns (blau); c) Intensitätsverteilung der durch die NP-Aufnahme verursachten Fluoreszenz (Falschfarbendarstellung)

Indiz für eine durch Endozytose gesteuerte Aufnahme sind die hell fluoreszierenden Punkte, bei welchen es sich offensichtlich um Endosomen oder Endolysosomen handelt. Der Maßstab der Vergrößerung belegt, dass in dieser Aufnahme einzelne Partikel aufgrund ihrer Größe von weniger als 200 nm nicht sichtbar sein können. Demzufolge muss es sich um eine Vielzahl von Partikeln innerhalb dieser Vesikel handeln, wodurch auch der starke Fluoreszenzkontrast zu Stande kommt.

Betrachtet man Abb. 112, so ist erkennbar, dass um den zentral gelegenen Kern der größte Volumenanteil von Zytoplasma lokalisiert ist. Vorausgesetzt es findet eine gleichmäßige Verteilung der Endolysosomen und freigesetzten Partikel im Zytoplasma statt, können im Volumen um den Zellkern herum die meisten Partikel übereinander gelagert vorliegen. Das könnte erklären, warum in der mikroskopischen Draufsicht der Fluoreszenzkontrast um den Kern für den Betrachter am stärksten erscheint. Eine erhöhte Affinität der freigesetzten Partikel zur Kernmembran kann als weitere Ursache der Korona um den Zellkern angeführt werden. In diesem Zusammenhang ist die anschließende Hypothese zum Prozess der Partikelfreisetzung aus den Endolysosomen von entscheidender Bedeutung (siehe Abb. 116).

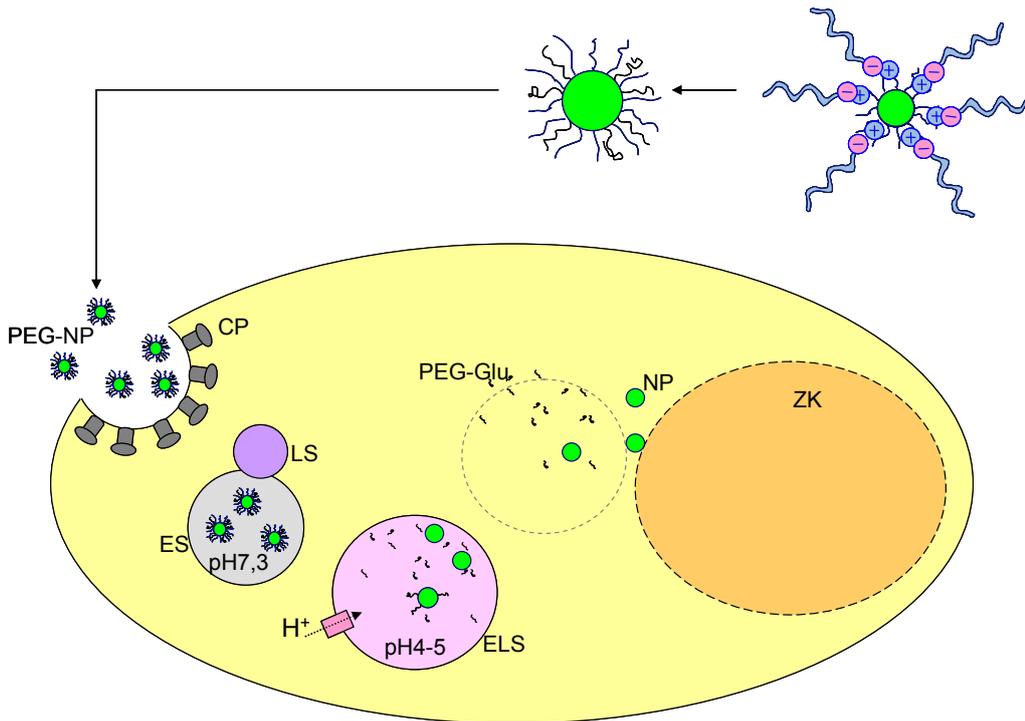


Abb. 116 Schematische Darstellung der Zellaufnahme von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln oberflächenmodifiziert mit Glu(10)-PEG(110); verwendete Abkürzungen =PEG-NP: pegylierte cumarinhaltige PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel; NP: cumarinbeladene PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel; CP: Clathrin-coated pits; ES: Endosomen; LS: Lysosomen; ELS: Endolysosomen; ZK: Zellkern;  $H^+$ :  $H^+$ ATPase; PEG-Glu: freies Glu(10)-b-PEG(110) Blockcopolymer; Größenrelationen entsprechen nicht der Realität

Gelangen die Endosomen nach Abschnüren der Clathrin-gecoateten Membran oder auch Calveoli von der Zelloberfläche in das Zellinnere, so verschmelzen sie anschließend mit Lysosomen zu Endolysosomen (siehe Kap. 2.2.2.3). Mittels einer ATPase werden Protonen entgegen einem Konzentrationsgefälle in das Innere dieser Vesikel transportiert. Ziel ist eine pH-Absenkung von ca. pH 7,3 auf pH 4-5, welche für eine Aktivierung der lysosomalen Enzyme notwendig ist. Der niedrigere pH-Wert hat wahrscheinlich zur Folge, dass nur noch ca. 50% der Glutaminsäurereste des Blockcopolymers deprotoniert vorliegen (Glutaminsäure  $pK_s$ -Werte: N = 9.67; C = 2.19; R = 4.25) [122]. Infolge der geschwächten elektrostatischen Wechselwirkungen kann sich vermutlich die auftrittierte Oberfläche durch Diffusionsprozesse von den Partikeln lösen. Dementsprechend wäre nun das kationische Acrylat P(DMAEMA) mit seinen Aminfunktionen auf der Partikeloberfläche bestimmend.

In Kap. 2.2.2.3 wurden bereits mehrere Hypothesen betrachtet, wodurch kationische Verbindungen und v.a. Aminogruppen enthaltende Substanzen eine Ruptur der Endolysosomenmembran verursachen können. Vermutlich wird durch eine Interaktion mit solchen Substanzen die Membran derart geschädigt, dass es zur Zerstörung derselben kommt

und die Partikel in das Zytoplasma gelangen. Eine solche Freisetzung wird auch hier angenommen. Nach der Zerstörung der Endolysosomenmembran ist eine gleichmäßigere und etwas schwächere Fluoreszenz durch Verteilung der Partikel in der Zelle zu beobachten. Merkmal der intakten Endolysosomen sind dagegen die kleinen, stark fluoreszierenden Punkte.

Infolge des Verlustes der Glu(10)-b-PEG(110) Oberfläche in den Endolysosomen wären die kationischen Ladungen auf den Partikeln dominierend. Das könnte erklären, warum freigesetzte Partikel sich ladungsbedingt verstärkt um die Kernmembran anreichern. Bei den in Abb. 115a abgebildeten Zellen ist die leicht dunklere, zentral gelegene Fläche der Zellkern, welcher durch die Kernmembran vor einem schnellen Eindringen der Partikel oder anderer Substanzen geschützt wird. Zur eindeutigen Unterscheidung des Zellkerns ist dieser in Abb. 115b durch Verwendung einer zusätzlichen blauen Fluoreszenzfärbung (Höchst) hervorgehoben. In Abb. 115c ist die durch Aufnahme der Nanopartikel erzielte Fluoreszenzverteilung in der Zelle mit Hilfe einer Falschfarbendarstellung verdeutlicht. Rot markiert hierbei Flächen mit der stärksten Fluoreszenz, grün signalisiert mittelstarke Fluoreszenz und blau veranschaulicht Flächen mit schwacher Fluoreszenz. Besonders um den Zellkern herum kann aus dieser Darstellung eine verstärkte Partikelanreicherung festgestellt werden. Das deckt sich mit den Ergebnissen, welche für PEI-DNA-Polyplexe gefunden wurden. Eine verstärkte Lokalisation um den Zellkern konnte auch hier beobachtet werden [206]. Basierend auf den Ergebnissen von *multiple particle tracking* wird für PEI-DNA-Komplexe ein aktiver Transportmechanismus über Mikrotubuli in Richtung Zellkern angenommen, womit sich auch die dortige Anreicherung erklären lässt. Der Nachweis erfolgte durch Vergleich des partikulären Transportes mit und ohne Hemmung der Mikrotubuli [206]. Da PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel ähnlich schnell um den Zellkern angereichert werden, wird auch hier ein aktiver Transportmechanismus als Ursache vermutet. Besonders deutlich wird das beim zeitabhängigen Aufnahmeverhalten in einem der folgenden Kapitel.

Die Partikel scheinen teilweise in der Lage zu sein, die Kernmembran mit Kernporen von ca. 30-100 nm Durchmesser (meist um 80 nm; [207]) überwinden zu können. Hinweis geben die heller leuchtenden Punkte innerhalb der Kernfläche, welche u.a. sehr gut in Abb. 114 erkennbar sind. Bei Vergleich mit der Kernfärbung können identische Fluoreszenzpunkte gefunden werden, was die These der Kernlokalisierung der Partikel bestärkt. Untersuchungen

mit einem konfokalen Mikroskop bestätigten den Hinweis, dass die stärker fluoreszierenden Anreicherungen in der Kernfläche sich innerhalb des Zellkerns befinden (siehe Abb. 117). Der Farbstoff allein kann diesen Effekt nicht verursacht haben. Sofern eine geringe Menge wasserunlöslichen Cumarin 6 aus den gewaschenen Partikeln freigeworden sein sollte, hätte das nicht zu einer punktförmigen Anreicherung im Kern geführt. Geprüft wurde dieser Sachverhalt durch Inkubation einer reinen Cumarin 6 Lösung (Ethanol/ Wasser) auf den HeLa-Zellen.

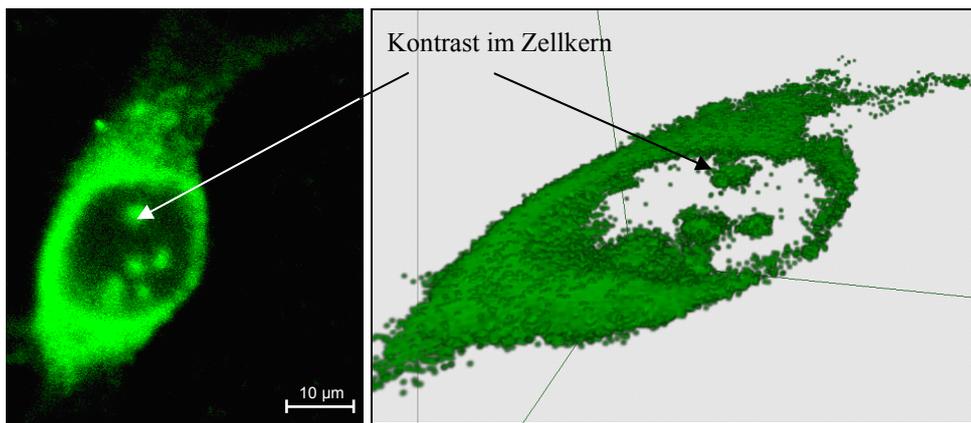


Abb. 117 a) Darstellung der Fluoreszenz in der mittleren Zellebene (CLSM, konfokales Laser-Raster-Mikroskop), b) 3D-Darstellung der Fluoreszenz

Bei einer Größe der intakten Kernporen von ca. 80 nm und einer Partikelgröße um 170 nm scheint allerdings eine Aufnahme in den Kern unwahrscheinlich. Auch hier kann es aber durch Wechselwirkungen der kationischen Partikeloberfläche mit der Kernmembran zu einer Veränderung der Kernporen gekommen sein. Eine entsprechende Vergrößerung der Poren könnte einen Partikeltransfer an solchen Stellen ermöglicht haben. Hinzu kommt, dass es sich bei den Kernporen nicht um einen statischen Proteinkomplex handelt, wie in früheren Theorien angenommen wurde. Wissenschaftler des MPI für Biochemie in Martinsried konnten anhand der Auswertung von Transportvorgängen an physiologisch aktiven Zellkernen feststellen, dass der Kanal der Kernporen eine dynamische Struktur darstellt [208]. Auf dieser Basis ist es auch vorstellbar, dass Nanopartikel mit etwas größerem Durchmesser unter bestimmten Voraussetzungen die Kernporen passieren können. Die kreisförmigen Anreicherungen der Fluoreszenz im Kern (siehe Pfeile Abb. 117 und Abb. 114) unterstützen die These, dass die Kernmembran in solchen Fällen nur partiell, also über die Kernporen, durchlässig war. Auch für PEI-DNA-Komplexe ist beschrieben worden, dass diese intakt in den Zellkern gelangen, d.h. dass die DNA gebunden an PEI die Kernporen überwindet. Die Anreicherungen zeichneten sich wie bei den hier untersuchten Partikeln als rundliche

Strukturen im mikroskopischen Bild ab [209]. Bei Umgehung des endozytotischen Aufnahmeweges durch Mikroinjektion der PEI-DNA-Komplexe in die Zelle konnten ebenso PEI-DNA-Komplexe im Zellkern identifiziert werden [210]. Polyplexe besitzen allerdings als Ladungsaggregate eine erhöhte Flexibilität, wodurch im Vergleich zu festen Polymernanopartikeln physiologische Barrieren wie die Kernmembran möglicherweise besser überwunden werden können. Eine solche erhöhte Flexibilität ist auch von Transferosomen und Liposomen bekannt [211].

Fazit: Die Glu(10)-b-PEG(110) modifizierten Partikel werden sehr wahrscheinlich über nicht-rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Durch die pH-Wert-Änderung in den Endolysosomen löst sich vermutlich die PEG-Hülle von den kationischen Kernpartikeln, wodurch eine Ruptur der Endolysosomenmembran begünstigt wird. Die freigesetzten Nanopartikel mit ladungsbedingt erhöhter Affinität zu den Phospholipiden der Membranen werden verstärkt um die Kernmembran angereichert. Auch aktive Transportmechanismen über die Mikrotubuli in Richtung Zellkern können Grund für die kernnahe Lokalisierung sein. Durch Interaktion mit den kationischen Partikeln könnte eine Veränderung der Kernmembran Ursache für die verstärkte Durchlässigkeit sein, welche einen teilweisen Partikeltransfer in den Zellkern ermöglichte. Eindeutiger mikroskopischer Hinweis sind die Fluoreszenzkontraste im Zellkern.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass ein nanopartikuläres System dieses Aufbaus optimal von den untersuchten Zellen aufgenommen und im Zytoplasma freigesetzt wird. Im Falle der Verkapselung therapeutisch wirksamer Substanzen, welche interne Zellmechanismen beeinflussen oder außer Kraft setzen sollen, besitzt dieses System somit gute Voraussetzungen, den Wirkstoff intakt sowie in hoher Konzentration an seinen Wirkort zu transportieren. Von großer Bedeutung ist hierfür auch die mögliche Überwindung der Kernmembran. Damit wurden insgesamt wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Anwendung dieser neuartigen Polymernanopartikel beispielsweise im Bereich der Krebstherapie geschaffen.

#### **4.4.4 Einfluss der Partikelkonzentration**

Zur Untersuchung des Einflusses der Partikelkonzentration auf das Zellaufnahmeverhalten wurden die aufgereinigten PBCA-P(DMAEMA)-Partikel mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) oberflächenmodifiziert. Diese Partikel hatten nach Ladungstitration

einen Durchmesser von 171 nm (PI 0,07) und besaßen ein Zetapotential von -33,5 mV. Durch Mischen der Partikeldispersion (Gesamtpolymergehalt 4,25 mg/ml) mit serumfreiem Medium wurden unterschiedliche Partikelkonzentrationen eingestellt. Die Inkubation der HeLa-Zellen mit identischen Volumina erfolgte für 60 Minuten im Brutschrank. Die inkubierte Partikelkonzentration wurde in dem folgenden Versuch gesteigert von Abb. 118: 0,21 mg/ml, Abb. 119: 0,85 mg/ml bis Abb. 120: 1,28 mg/ml. Eine zusätzliche Kernfärbung wurde am Folgetag vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung durchgeführt.

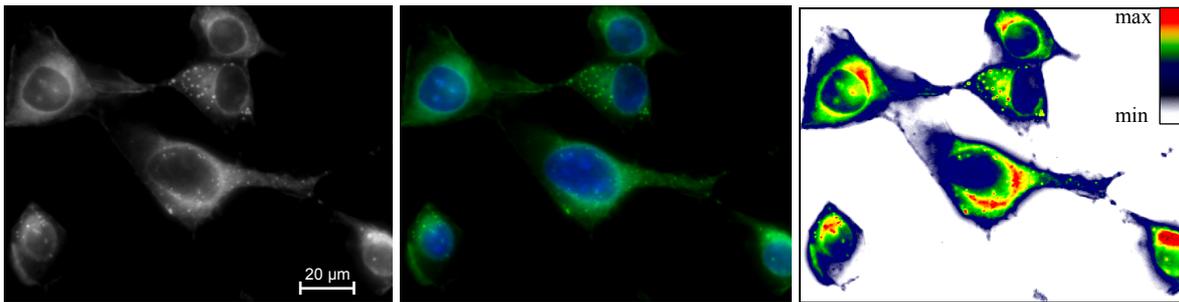


Abb. 118 Inkubierte Konzentration: 0,21 mg/ml; a) Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung; b) farbliche Abgrenzung der Fluoreszenz der NP (grün) und des Zellkerns (blau); c) Intensitätsverteilung der durch die NP-Aufnahme verursachten Fluoreszenz (Falschfarbendarstellung)

Bei Inkubation einer sehr niedrigen Partikelkonzentration (siehe Abb. 118) ist der Zellkern großräumig von Zytoplasma umgeben (vgl. Abb. 112) und die Zellen sind im Randbereich relativ schwach fluoreszierend. Die dunklere bzw. blaue Kernfläche in der Zellmitte zeichnet sich deutlich ab und ist von der beschriebenen hellen Korona durch Partikelansammlungen umgeben. Anhand der Falschfarbendarstellung wird die Anreicherung um den Kern am deutlichsten. Die Zelle links oben weist drei fluoreszierende Punkte im Zellkernbereich auf. Wie bereits zuvor beschrieben, weist das auf eine teilweise Anreicherung im Kern hin. Eine Aufnahme durch Endozytose ist gut erkennbar an den stark leuchtenden Fluoreszenzpunkten, verursacht durch noch intakte Endosomen oder Endolysosomen.

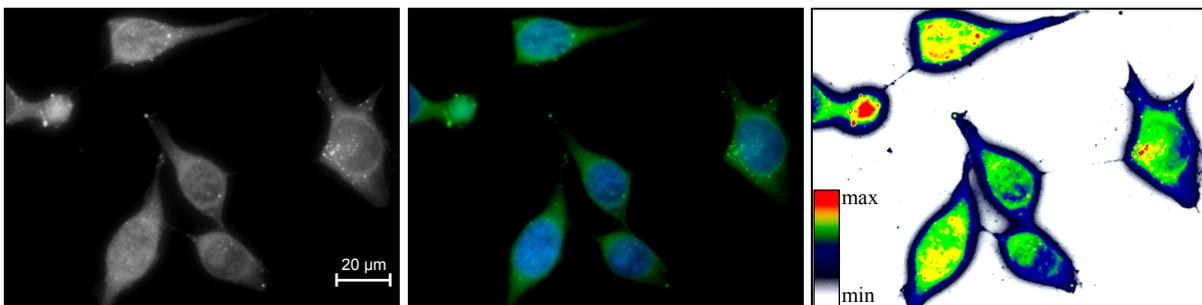


Abb. 119 Inkubierte Konzentration: 0,85 mg/ml; a) Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung; b) farbliche Abgrenzung der Fluoreszenz der NP (grün) und des Zellkerns (blau); c) Intensitätsverteilung der durch die NP-Aufnahme verursachten Fluoreszenz (Falschfarbendarstellung)

Abb. 119 zeigt verglichen mit Abb. 118 einen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenzverteilung auf. Die 4-fach höhere Partikelkonzentration führte offensichtlich zu einer deutlich stärkeren Partikelaufnahme, vor allem im Randbereich der Zellen. Zellkern und Zytoplasma sind optisch kaum mehr voneinander abgrenzbar aufgrund der gleichmäßig flächigen Fluoreszenz (z.B. Abb. 119a, Zelle mittig-unten-links). Kernfärbung und Partikelanreicherung sind bei der zweiten Zelle oben links identisch, d.h. die Partikel haben sich vollständig im Kern angereichert und die Zelle hat eine kugelförmige Gestalt angenommen (siehe auch rote Kernfläche in der Falschfarbendarstellung). Vermutlich war in diesem Fall die Kernmembran durch hohe Partikelkonzentrationen stark verändert und somit für die Partikel vollständig durchlässig geworden. Die Folge war ein ungehindertes Eindringen der Partikel in den Kern. Möglich wäre auch eine verstärkte Partikelaufnahme während eines vorangegangenen Zellteilungsprozesses. Besonders bei Polyplexen hat man eine Abhängigkeit zwischen Transfektionsrate und Zellzyklus gefunden. Sich häufig teilende Zellen wurden wesentlich stärker transfiziert im Vergleich zu Zellen in der Ruhephase [212].

Die höhere Partikelkonzentration im Zytoplasma könnte auch eine schnellere Endolysosomenruptur verursacht haben, denn eine zusätzliche Interaktion der Partikel an der Außenseite der Vesikelmembran ist denkbar. Indiz für diese Vermutung sind die flächige Fluoreszenz und die geringe Anzahl an Endolysosomen in Abb. 119. Ein Großteil der Endolysosomen muss sich demzufolge schon aufgelöst haben, wodurch die Partikel in das Zytoplasma freigesetzt wurden. Ursache ist eventuell auch ein Sättigungseffekt, d.h. der Prozess der Endozytose wird verlangsamt bzw. stark eingeschränkt, weshalb weniger Endolysosomen in der Zelle lokalisiert sind. Sättigungs- und Konzentrationseffekte wurden auch bei der Aufnahme von PLGA-Nanopartikeln durch Endozytose beschrieben [57].

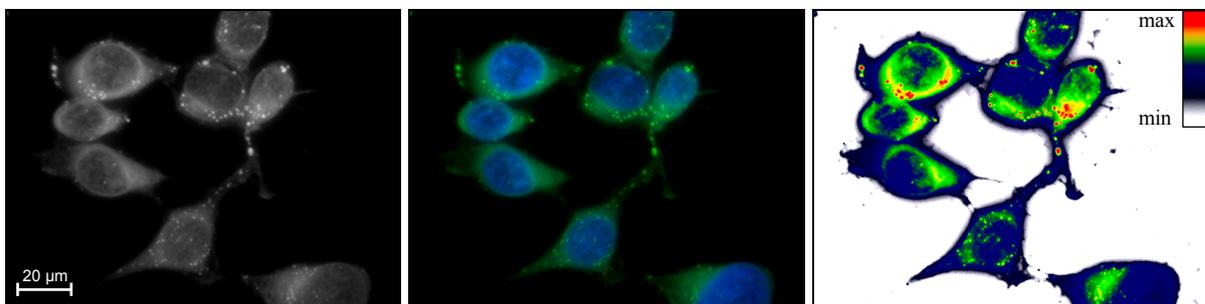


Abb. 120 Inkubierte Konzentration: 1,28 mg/ml; a) Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung; b) farbliche Abgrenzung der Fluoreszenz der NP (grün) und des Zellkerns (blau); c) Intensitätsverteilung der durch die NP-Aufnahme verursachten Fluoreszenz (Falschfarbendarstellung)

In den Zellen der Abb. 120 sind neben einer schon vorhandenen, sehr stark flächigen Fluoreszenz zusätzlich eine Vielzahl von Endolysosomen lokalisiert, Zeichen einer verstärkten Endozytose. Der Zellkern hebt sich nur noch leicht vom umgebenden Zytoplasma ab. Die stärker um den Zellkern zusammengezogene Zellmembran ist ein Zeichen dafür, dass die physiologischen Zellprozesse beeinträchtigt worden sind.

Fazit: Durch Inkubation höher konzentrierter Partikeldispersionen über einen Zeitraum von 60 Minuten konnte eindeutig die Partikelaufnahme in die Zelle gesteigert werden. Anhand des Vergleiches der mikroskopischen Aufnahmen wurde auch gezeigt, dass es mit zunehmender Konzentration zu einer veränderten Verteilung der Partikel in der Zelle kam. Die Veranschaulichung der Fluoreszenzintensität durch eine Falschfarbendarstellung bringt diesen Sachverhalt besonders gut zur Geltung.

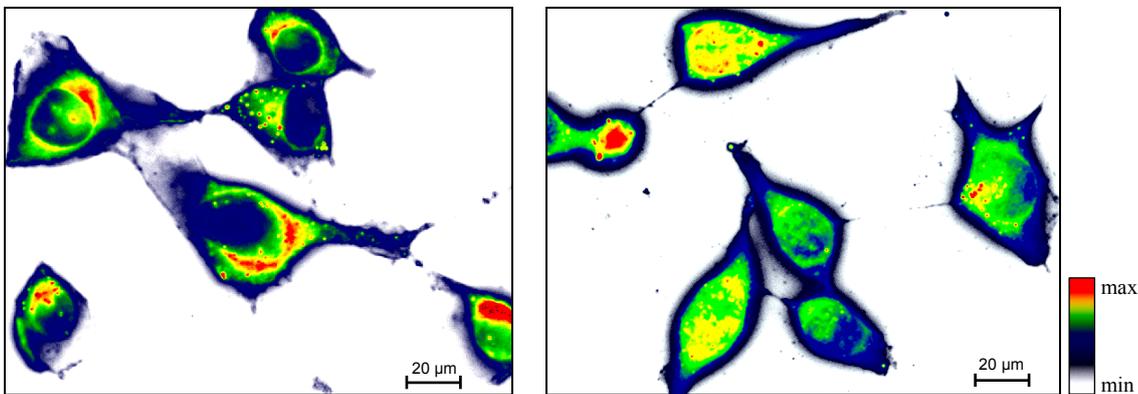


Abb. 121 Vergleich der Fluoreszenzintensitätsverteilung der Konzentrationen a) 0,25mg/ml und b) 0,85mg/ml durch Falschfarbendarstellung

Eine verstärkte Anreicherung um den Zellkern fand vermutlich über einen aktiven Transportmechanismus statt. Erkennbar ist dies an der den Kern umhüllenden Fluoreszenz. Dass diese Intensitätsverteilung nicht nur durch Überlagerung einer Vielzahl von Partikeln im Volumen um den Zellkern verursacht wurde, kann deutlich an Abb. 121b gezeigt werden. Bei höheren Konzentrationen wurden auch morphologische Veränderungen der Zellen sichtbar.

#### 4.4.5 Einfluss der Inkubationszeit

Die für diesen Versuch verwendeten Partikel wurden wie im Kapitel zuvor aufgearbeitet und ihre Oberfläche mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) modifiziert ( $d_{\text{hyd}} = 171 \text{ nm}$ ,  $\text{ZP} = -33,5 \text{ mV}$ ). Die Dispersion der modifizierten Partikel wurden in serumfreiem Medium auf 1,21 mg/ml verdünnt.

Eine Steigerung der Inkubationszeit von 10 Minuten auf 60 Minuten führte bei konstanter Partikelkonzentration eindeutig zu einer Verstärkung der Fluoreszenz. Um diese Fluoreszenzsteigerung optisch sichtbar zu machen, wurden die Aufnahmen unter einer konstanten Belichtungszeit von 1175 ms und 20-facher Vergrößerung gemacht (siehe Abb. 122).

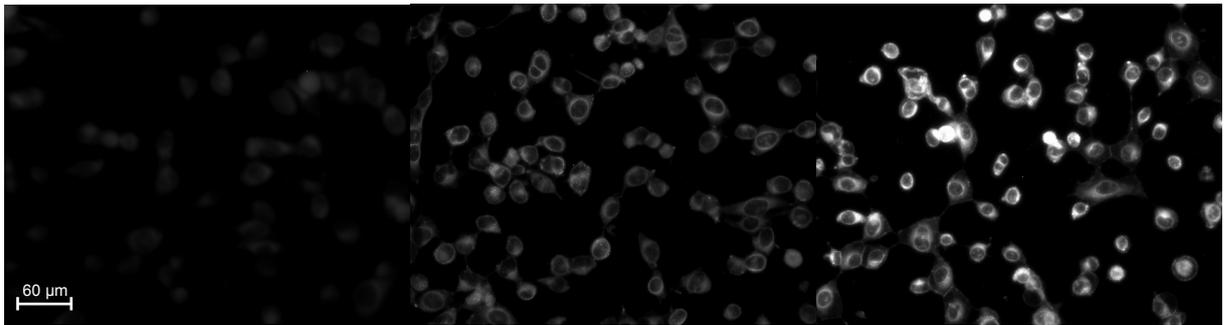


Abb. 122 Einfluss der Inkubationszeit auf die Partikelaufnahme; von links nach rechts: 30, 40 und 50 min Inkubationszeit; Aufnahme erfolgte unter konstanter Belichtungszeit bei 20-facher Vergrößerung

Der Kontrastunterschied zwischen den Zellen, welche für 10, 20 und 60 Minuten inkubiert wurden, war zu stark, um ihn durch Verwendung einer Belichtungszeit darstellen zu können. Bei den drei abgebildeten Aufnahmen wurde die Zellen jeweils für einen Zeitraum von 30, 40 und 50 Minuten inkubiert. Die deutliche Fluoreszenzverstärkung macht die starke Zeitabhängigkeit des Aufnahmeprozesses deutlich.

Die enorme Geschwindigkeit, mit welcher die PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel in die Zelle internalisiert wurden, kann anhand von Abb. 123 veranschaulicht werden.

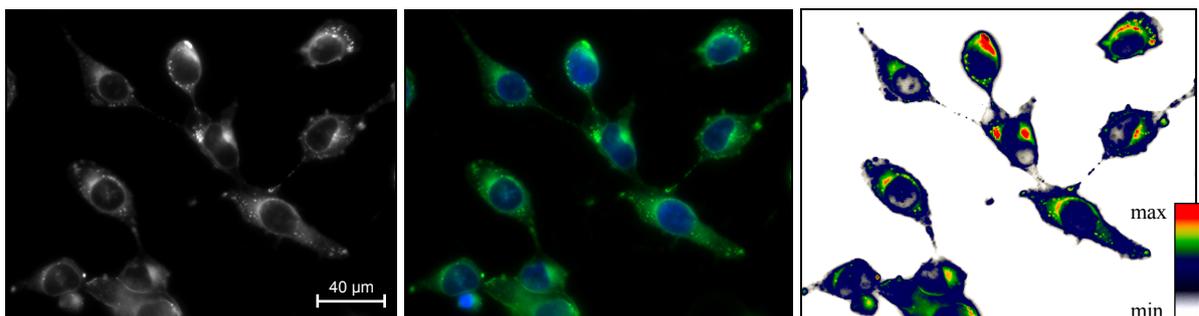


Abb. 123 Partikelaufnahme nach einer Inkubationszeit von 10 min; a) Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung; b) farbliche Abgrenzung der Fluoreszenz der NP (grün) und des Zellkerns (blau); c) Intensitätsverteilung der durch die NP-Aufnahme verursachten Fluoreszenz (Falschfarbendarstellung)

Nach einer Inkubationszeit von nur 10 Minuten wurden die Partikel von den hier abgebildeten Zellen herunter gewaschen und die Zellen fixiert wie zuvor. Innerhalb dieser kurzen Kontaktzeit wurden eine Vielzahl von Partikeln durch Endosomen in die Zelle internalisiert,

wie eindeutig an den kleinen, intensiv fluoreszierenden Punkten erkennbar ist. Wahrscheinlich wurde auch bereits ein Teil der Endolysosomen zerstört und diese Partikel ins Zytoplasma freigesetzt. Hinweis hierfür ist die flächige Fluoreszenz, welche nur in bestimmten Arealen der Zelle auftritt (siehe grün-rote Flächen der Falschfarbendarstellung). Der Zellkern hebt sich noch sehr dunkel vom Rest der Zelle ab, ein Zeichen dafür, dass die Kernmembran größtenteils intakt und die Partikel um diese herum lokalisiert sind. Beachtlich ist jedoch, dass bei der Zelle unten links Kernfärbung und Partikelanreicherung scheinbar identisch sind, d.h. hier bereits eine Anreicherung im Zellkern stattgefunden hatte. Wie schon zuvor vermutet, könnte ein Zellteilungsprozess in diesem Inkubationszeitraum zu dieser vollständigen Anreicherung im Kern geführt haben. Hinweis für einen gerade abgeschlossenen Zellteilungsprozess ist das Vorliegen der Kerne direkt nebeneinander (siehe blaue Kernfärbung).

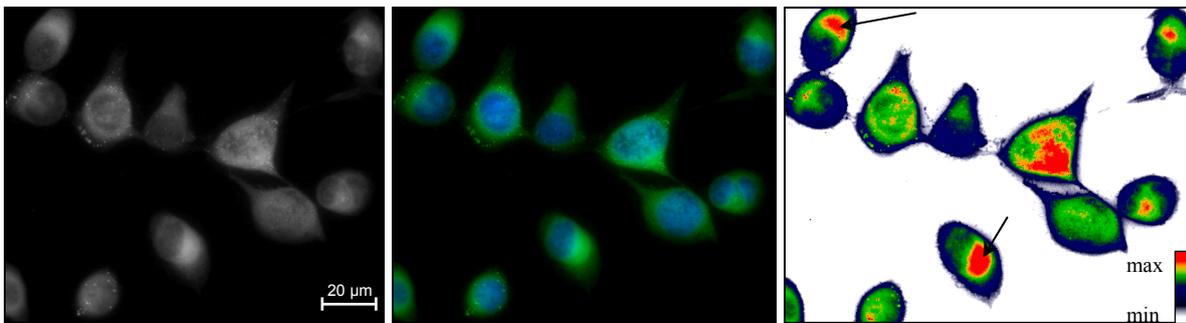


Abb. 124 Partikelaufnahme nach einer Inkubationszeit von 30 min; a) Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung; b) farbliche Abgrenzung der Fluoreszenz der NP (grün) und des Zellkerns (blau); c) Intensitätsverteilung der durch die NP-Aufnahme verursachten Fluoreszenz (Falschfarbendarstellung)

Der Vergleich der Abb. 124 mit Abb. 123 zeigt eine vielfach intensivere und einheitlichere Fluoreszenz in der gesamten Zelle. Anhand der Falschfarbendarstellung ist gut erkennbar, dass die Umlagerung des Zellkerns durch die Partikel wesentlich stärker und vollständiger ist im Vergleich zur Intensitätsverteilung nach zehnminütiger Inkubationszeit. Auffallend ist die Anreicherung in den Zellbereichen, wo vermehrt Zellorganellen wie Mitochondrien ausgebildet werden (siehe Pfeile in Abb. 124c). Möglicherweise liefern diese die entsprechende Energie für die Endozytose-vermittelte Internalisierung und den anschließenden Transport in Richtung Zellkern.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Mitochondrien mit Hilfe des Farbstoffes MitoTracker (Lebendfärbung) eingefärbt, bevor die Partikel für 30 Minuten inkubiert wurden. Hintergrund war, dass das Anfärben der Mitochondrien erfolgen sollte, bevor die Nanopartikel einen Einfluss auf diese nehmen können. Nach der Aufarbeitung und Fixierung

der Zellen erfolgte die Einfärbung der Zellkerne mit Höchstfarbstoff. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung standen somit der grüne Farbkanal für die Nanopartikel, der blaue Kanal für die Zellkerne und der rote Kanal für die Mitochondrien zu Verfügung. Da der rote Kanal nur separat gut ausgewertet werden konnte, wurden in Abb. 125a) nur der Zellkern (blau) und die Nanopartikel (grün) gemeinsam dargestellt. In der Farbfehldarstellung sind die Intensitätsverteilung der Nanopartikel und die Intensitätsverteilung der Mitochondrien gegenübergestellt.

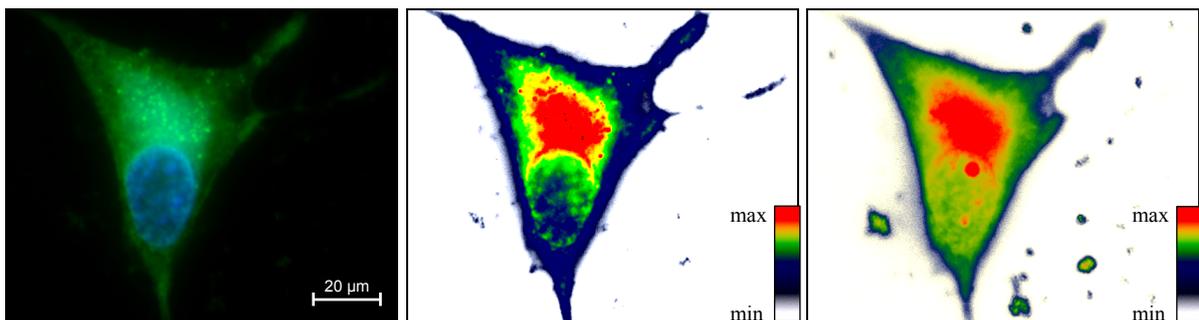


Abb. 125 a) Fluoreszenz der NP (grün) und des Zellkerns (blau); Falschfarbendarstellungen: b) Intensitätsverteilung der Nanopartikel; c) Intensitätsverteilung der Mitochondrien

Die stärkste Partikelanreicherung fand in dem Bereich statt, wo die meisten Mitochondrien lokalisiert waren. Eindeutiger Hinweis ist die sehr ähnliche Intensitätsverteilung der beiden Falschfarbendarstellungen (Abb. 125b und Abb. 125c). Um typische Verteilungen der Mitochondrien in der Zelle deutlich zu machen, sind in Abb. 126 HeLa-Zellen dargestellt, bei denen ausschließlich diese Zellorganellen angefärbt wurden. Die Abb. 127 wurde von der Arbeitsgruppe Analytical Development / Enabling Technologies (Schering AG) aufgenommen und ist zusätzlich aufgeführt, um die räumliche Verteilung des Zellkerns, der Mitochondrien und des Aktin-Filamentes in den HeLa-Zellen zusammenhängend zu veranschaulichen. Inwiefern die Partikel mit den Mitochondrien interagieren bzw. ein anderer Zusammenhang als der Energieverbrauch für Aufnahme- und Transportzwecke eine Rolle spielen, kann nur mit weitergehenden Untersuchungen geklärt werden. Das ein Zusammenhang zwischen Partikelanreicherung und Mitochondrien wahrscheinlich ist, ist anhand der Intensitätsverteilungen deutlich geworden.

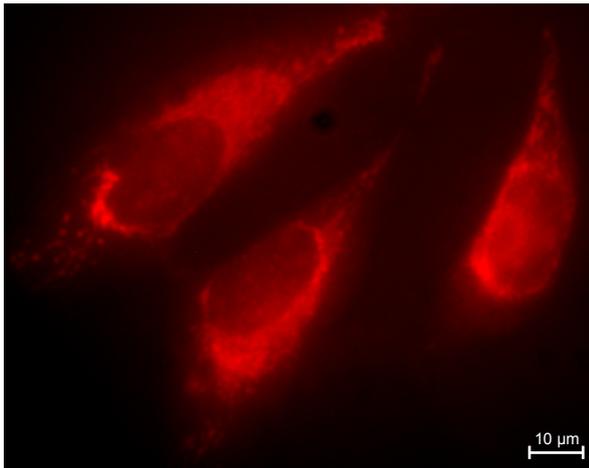


Abb. 126 Einfärbung der Mitochondrien von HeLa-Zellen mit MitoTracker

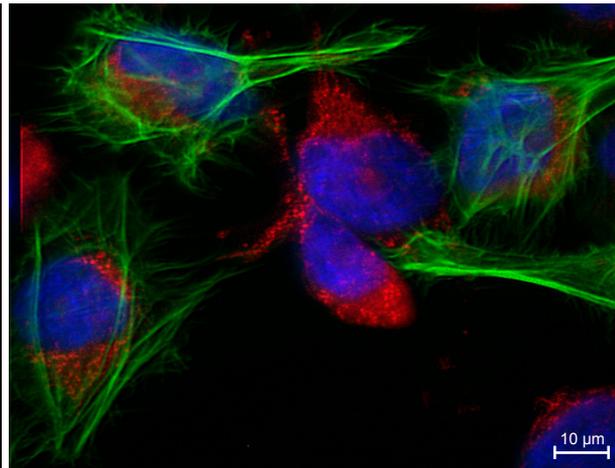


Abb. 127 Mitochondrien (rot), Zellkern (blau) und Aktin-Filament (grün) in HeLa-Zellen

#### 4.4.6 Zusammenfassung Zellkulturversuche

Die kationisch geladenen Oberflächen von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln führten zu einer starken Haftung auf HeLa-Zellen, vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit anionischen Membranbestandteilen. Entsprechend den höheren Partikelkonzentrationen auf der Zelloberfläche wurde eine Internalisierung in die Zelle begünstigt, wie durch Vergleich der Zellaufnahme unmodifizierter Partikel, Folsäure und Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter Partikel deutlich gemacht werden konnte. Die Internalisierung in die Zelle ist anhand von Glu(10)-b-PEG(110) modifizierten Partikeln näher untersucht worden. Der vorwiegende Aufnahmeprozess in die Zelle erfolgte offensichtlich über eine nicht-rezeptorvermittelte Endozytose. Indiz sind Endosomen bzw. Endolysosomen, welche als stark fluoreszierende Punkte in allen Bereichen der Zelle erkennbar waren. Eine Anreicherung der Partikel in der Zelle erfolgte verstärkt kernnah und im Bereich von Zellorganellen wie Mitochondrien, wobei Ursachen wie aktive, Energie verbrauchende Transportvorgänge über Mikrotubuli in Richtung Zellkern nur vermutet werden können. Auslöser der Freisetzung aus den Endolysosomen könnte der kationische Kernpartikel sein, welcher im saureren Endolysosom durch Verlust der Glu-PEG-Hülle eine Membranschädigung und somit eine Ruptur verursachen konnte. Eine flächige und weniger starke Fluoreszenz im Vergleich zu den Endosomen sind Merkmal für eine Freisetzung der Partikel in das Zellplasma. Die kernnahe Partikelanreicherung basiert möglicherweise auch auf einer erhöhten Affinität der kationischen Partikel zu Membranen. Fluoreszenzverstärkungen im Bereich des Zellkerns

gaben Hinweis darauf, dass die Partikel teilweise die Kernmembran überwinden konnten. Infolge einer längeren Inkubationszeit oder höherer Konzentrationen kam es zu einer veränderten Verteilung innerhalb der Zelle, vor allem erkennbar an einer fast vollständigen Umlagerung des Zellkerns durch angereicherte Partikel. Mit Hilfe von Falschfarbendarstellungen konnten Unterschiede in der Intensitätsverteilung der angereicherten Partikel gut veranschaulicht werden.

Fazit: Im Rahmen der Zellkulturversuche wurden folgende, zusätzlich vorteilhafte Eigenschaften der bereits in Kap. 4.3.4 beschriebenen modifizierten PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln identifiziert:

- sehr gute und schnelle Aufnahme in humanen Tumorzellen,
- optimale Freisetzung aus den Endolysosomen, so dass ein verkapselter intrazellulärer Wirkstoff den therapeutischen Effekt auslösen kann,
- über die gute Zellaufnahme ist der Verbleib der an den Zielort gelangten Partikel in vivo gewährleistet, wodurch z.B. ein detektierbarer Kontrast erzeugt wird,
- mögliche Anreicherung im Zellkern macht das System interessant für gentherapeutische Anwendungen, da die Überwindung der Kernmembran in diesem Fall eine schwer zu erfüllende Voraussetzung darstellt.

## 4.5 In vivo Untersuchung

### *Einleitung*

Ein relativ neuer Ansatz in der Diagnostik beruht auf der Nutzung von Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenz. Farbstoffe wie Indocyaningrün (ICG), mit einem Absorptions- bzw. Emissionsspektrum im NIR-Bereich zwischen 650-900 nm, werden für diese diagnostische Methode verwendet (siehe Kap. 2.5.2).

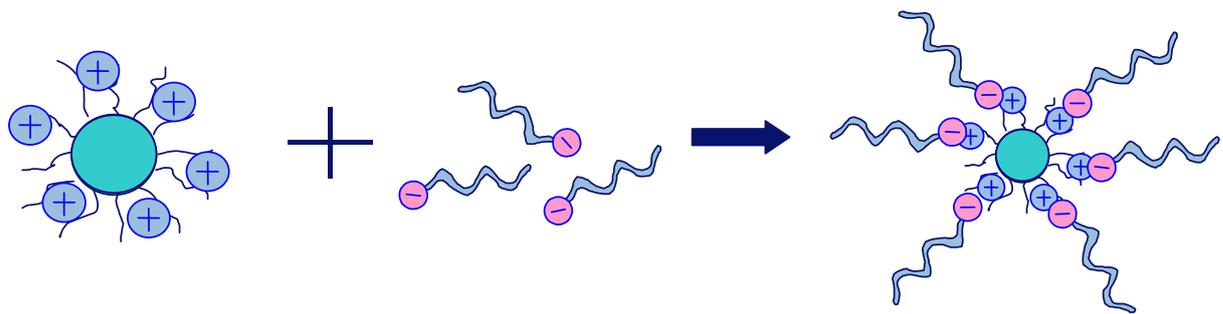
ICG besitzt bereits eine Marktzulassung zur intravenösen Infusion unter dem Namen ICG Pulsion® [172]. Das Natriumsalz des Tricarbocyanin-Farbstoffes (Strukturformel siehe Kap. 4.1.3.2) ist sehr gut wasserlöslich, weist aber nur eine begrenzte physikalische Stabilität in wässriger Lösung auf [173]. Von Saxena et al. wurde gezeigt, dass eine Verkapselung von ICG in Polymernanopartikeln zu einer deutlich verbesserten Stabilität des Farbstoffes führt [174]. Durch den Einschluss des NIR-Farbstoffes ICG in ein kolloidales System besteht in vivo die Möglichkeit, die Verteilung bzw. Anreicherung fluoreszenzmarkierter Nanopartikel mittels Optical Imaging zu detektieren.

Die in vivo Untersuchung von NIR-aktiven, Glu(10)-b-PEG(110)-modifizierten PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln sollte zeigen, ob durch Ausnutzung von passiven Targeting-Effekten eine Anreicherung im Tumorgewebe stattfindet (siehe Kap. 2.2.2.1). Der als Ionenkomplex mit dem kationischen Acrylat verkapselte NIR-Farbstoff ICG diene der Detektion und somit der Lokalisation der Partikel mit Hilfe von Optical Imaging. Weiterhin war von Interesse, ob die elektrostatisch aufgebraute PEG-Oberfläche stabil genug ist, um die Partikel vor Opsonierung und anschließendem Abbau durch Makrophagen abzuschirmen.

### **4.5.1 Charakterisierung der PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel**

Die Herstellung und Aufarbeitung der Partikel erfolgte gemäß der Beschreibung in Kap. 7.1.1.4. Durch Ladungstitration mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) wurde die Oberfläche der kationischen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel modifiziert. Zur Kontrolle der Oberflächenmodifikation durch elektrostatische Wechselwirkungen wurde die Messung des Zetapotentials herangezogen.

### Schematische Darstellung der Oberflächenmodifikation



- |                                    |                             |                                      |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| • PBCA-P(DMAEMA)-NP                | • Blockcopolymer            | • Oberflächenmodifizierter NP        |
| • Fluoreszenzaktiver ICG Kern      | Glu(10)-b-PEG(110)          | • Je nach Grad der Titration         |
| • Kationische Oberfläche           | • Anionischer Ladungsträger | Zetapotential einstellbar            |
| • Nach Waschen: $+30,5 \pm 2,1$ mV | durch 10 Glutaminsäure-     | • Nach Titration: $-29,7 \pm 2,5$ mV |
| (Partikelcharge I)                 | untereinheiten              | (Partikelcharge I)                   |

Abb. 128 Schematische Darstellung der Oberflächenmodifikation von PBCA-[P(DMAEMA)-ICG] Nanopartikeln mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110)

Die Oberflächenmodifikation war eine entscheidende Voraussetzung für eine Applikation der Partikel *in vivo*. Ohne Abschirmung der kationischen Ladungen des Polyacrylates würden die Partikel bei einem Oberflächenpotential von ca. +30 mV nach *i.v.* Injektion sehr wahrscheinlich mit Erythrozyten aggregieren und eine Blockade der Blutgefäße verursachen. Zu erwarten wäre auch eine starke Akkumulation in der Lunge, welche die Partikel als erstes Kapillarbett nach *i.v.* Applikation passieren [203]. Hier bestünde die große Gefahr einer Lungenembolie, begünstigt durch Agglomerate aus Partikeln und Erythrozyten oder anderen Blutkomponenten [65][66]. Daraus resultierende, unter Umständen schwerwiegende toxikologische Effekte sind bei *in vivo* Untersuchungen von Polyplexen und Lipiden mit stark kationischen geladenen Oberflächen beschrieben worden [65][67]. Wie bereits erwähnt, sollte die pegylierte Oberfläche auch eine ausreichend lange Zirkulationszeit ermöglichen. Anhand der Zellkulturversuche wurde bereits mit Hilfe Cumarin 6 beladener PBCA-P(DMAEMA) Nanopartikel gezeigt, dass diese Partikel nach Oberflächenmodifikation mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) in HeLa-Zellen internalisiert und aus den Endolysosomen freigesetzt werden.

#### 4.5.1.1 Partikelgröße und Zetapotential

Die Aufarbeitung und Oberflächenmodifikation der Partikel erfolgte direkt am Tag des Tierversuches. Diese modifizierten Partikel wiesen eine hervorragende Stabilität innerhalb des anschließend untersuchten Zeitraumes auf (Abb. 129). Beweis sind die konstante Partikelgröße sowie der gleich bleibend niedrige Polydispersitätsindex ( $PI < 0,1$ ) als Merkmal für eine sehr enge Partikelgrößenverteilung.

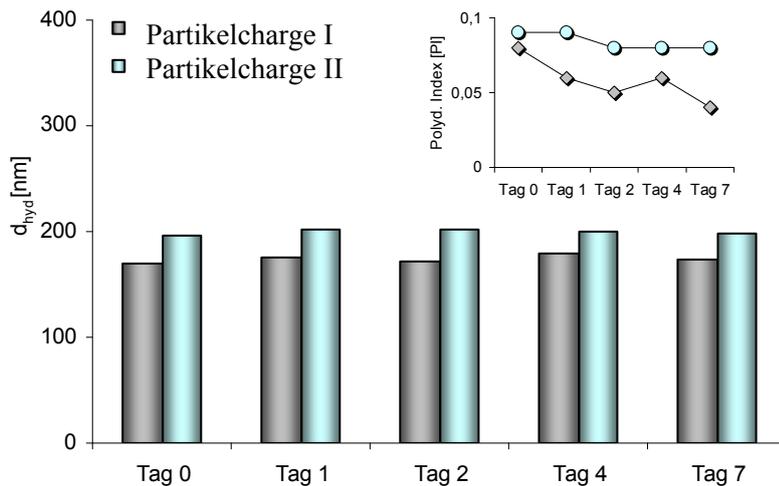


Abb. 129 Partikeldurchmesser  $d_{hyd}$  der PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel, oberflächenmodifiziert mit Glu(10)-b-PEG(110)

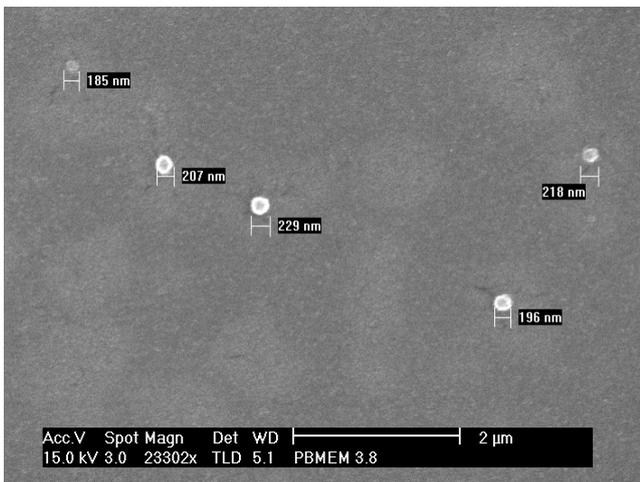


Abb. 130 REM-Aufnahme von PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikeln

Anhand der REM-Aufnahme (Abb. 130) ist erkennbar, dass es sich um sphärische Nanopartikel mit einer Größe um 200 nm handelte. Eine vergleichbare Charge wurde auch für den Tierversuch verwendet. Die hier abgebildeten Partikel waren nicht oberflächenmodifiziert.

Mittels Ladungstitration wurde die kationische Oberfläche der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) modifiziert. Die als Zetapotential gemessene Oberflächenladung wurde entsprechend von ca. +30mV über den Neutralpunkt hinaus bis zum Erreichen des Dissoziations-Gleichgewichtes bei etwa -30mV titriert. Ziel war eine Absättigung der Partikeloberfläche mit dem Blockcopolymer (siehe Abb. 131).

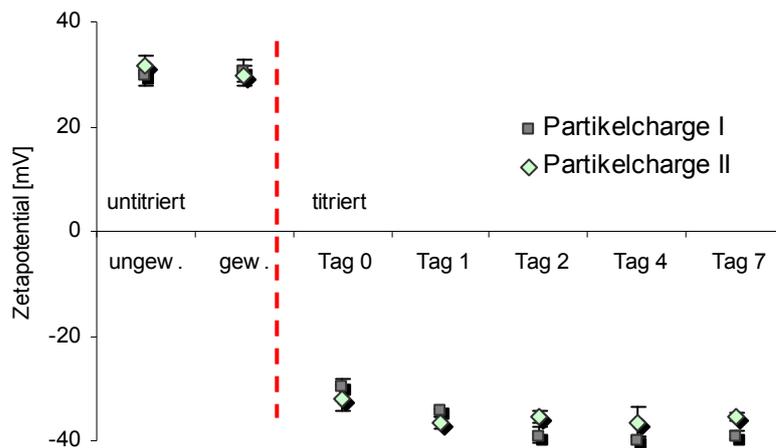


Abb. 131 Zetapotential der untitrierten (gewaschenen / ungewaschen) und der titrierten PBCA-[P(DMAEMA)-ICG] Nanopartikel

Die oberflächenmodifizierten PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Partikel zeigten über den untersuchten Zeitraum von 7 Tagen nach Titration keine Veränderung des Zetapotentials. Im Zusammenhang mit der unveränderten Partikelgröße sowie dem konstant niedrigen PI konnte somit eine gute Partikelstabilität belegt werden.

#### 4.5.1.2 Spektroskopische Untersuchung

Indocyaningrün ist ein Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptions- und Emissionsspektrum im Wellenlängenbereich zwischen 650-900 nm liegt. Die Komplexierung und Einkapselung von ICG mit Hilfe des kationischen Polyacrylates P(DMAEMA) führte zu einer bathochromen Verschiebung der beiden Wellenlängenmaxima um einen Betrag von 13 nm bzw. von 28 nm. Diese bathochrome Verschiebung ist auf eine Veränderung der Polarität des Dispersionsmediums von Wasser zum Polymergemisch aus PBCA-P(DMAEMA) zurückzuführen. Alle Spektren wurden mit Wasser als Vermessungsmedium aufgenommen.

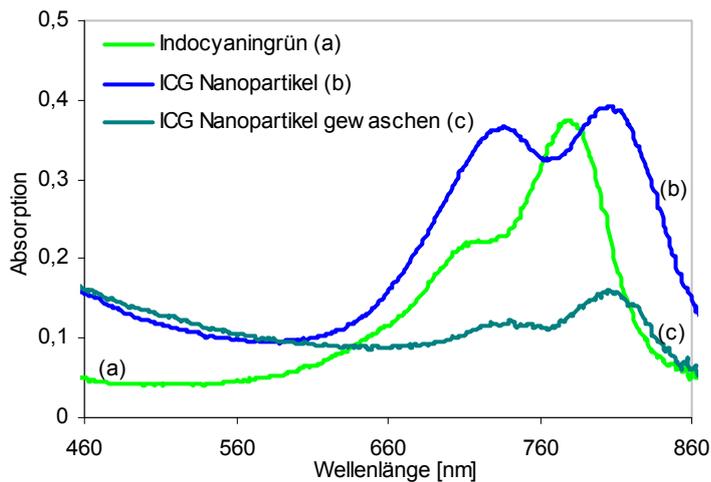


Abb. 132 UV-Vis-Absorptionsspektren: a) wässrige ICG-Lösung, b) PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-NP ungewaschen; c) PBCA-[P(DMAEMA)-ICG] Nanopartikel gewaschen

### Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften

Eine wässrige Lösung von ICG wurde bei einer Emissionswellenlänge von 802 nm über einen Wellenlängenbereich von 600 nm bis 800 nm angeregt (siehe Abb. 133). Der Kurvenverlauf des Anregungsspektrums der gewaschenen ICG-Nanopartikel deckte sich mit dem Anregungsspektrum von ICG, zeigte aber starke Schwankungen, vermutlich verursacht durch Streulichteffekte der Partikel.

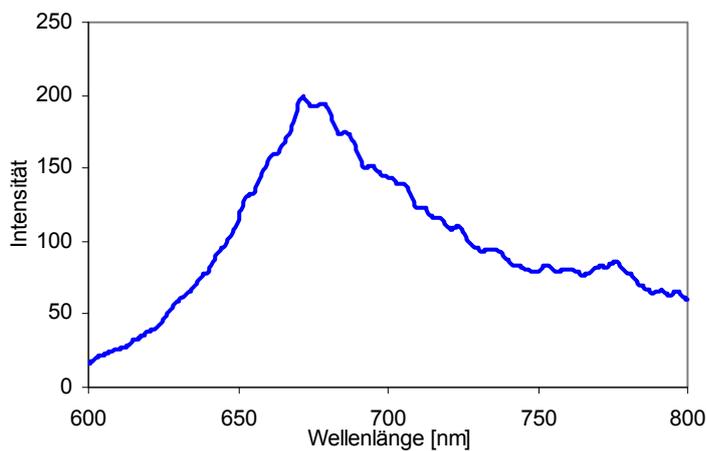


Abb. 133 Anregungsspektrum einer wässrigen ICG-Lösung

Die Fluoreszenzspektren des reinen Farbstoffes und der gewaschenen Partikel wurden bei einer Anregungswellenlänge von 680 nm aufgezeichnet (siehe Abb. 134). Das starke Maximum bei der Anregungswellenlänge von 680 nm wird durch die Streulichteffekte der

Nanopartikel verursacht. Das Wellenlängenmaximum der Partikel ist geringfügig bathochrom verschoben im Vergleich zu reinem ICG.

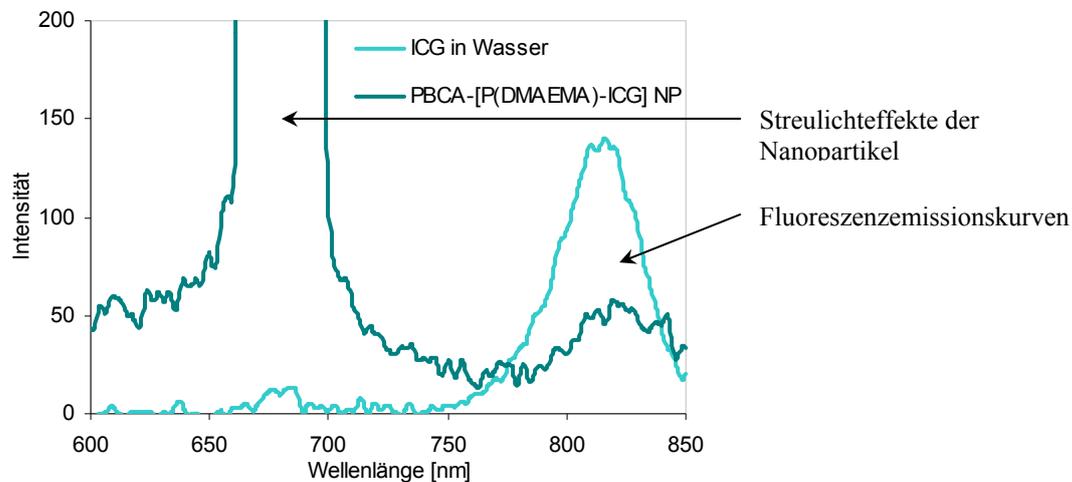


Abb. 134 Emissionsspektrum der PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel und einer wässrigen ICG-Lösung

Aus dem Anregungs- und Emissionsspektrum kann geschlossen werden, dass bei einer Anregung um 680 nm und einer Messung der Emission im Bereich von 810 nm bis 830 nm die Fluoreszenz optimal detektiert werden kann.

Die apparativen Vorgaben im Tierversuch bedingten eine Anregung des Farbstoffes bei 740 nm, also ca. 60 nm oberhalb der optimalen Anregungswellenlänge. Weiterhin erfolgte die Detektion der Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 802 nm, ca. 25 nm unterhalb der optimalen Emissionswellenlänge. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine Verbesserung des Kontrastunterschiedes um ca. Faktor 4 durch Veränderung des apparativen Aufbaus in zukünftigen Versuchen möglich ist.

## 4.5.2 Tierversuch

### 4.5.2.1 Versuchsablauf, Behandlungsschema und apparativer Aufbau

Dieser in vivo Versuch wurde unter einem Tierversuchsvorhaben der Abteilung Optical Imaging (and New Modality Research) der Schering AG durchgeführt.

Fünf weiblichen Nacktmäusen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen eines F9-Teratoms in die rechte hintere Flanke inokuliert. Dabei handelt es sich um von der Maus stammende, embryonale Zellen eines testinalen Teratokarzinoms, welches als Tumormodell für Krebsforschungszwecke in

Mäusen verwendet wird [213][214]. Nach 18 Tagen waren bei vier der fünf Mäuse Tumore mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 0,5-1 cm Durchmesser gewachsen. Tier 2 wurde aufgrund des zu geringen Tumolvolumens aus dem Versuch ausgeschlossen, aber für Vergleichszwecke herangezogen.

Die Tiere wurden für die erste Stunde des Versuches dauerhaft mit einer Rompun-Ketavet-Injektion anästhesiert. Anschließend wurden 200 µl der Nanopartikeldispersion in die Schwanzvene intravenös injiziert. Die nachfolgenden Narkosen erfolgten pulmonal mit Rompun-Ketavet als Inhalationsnarkotikum, um den Kreislauf der Tiere nur minimal zu belasten (siehe Kap. 7.1.3). In einem Zeitraster von 1, 2, 10, 30 min sowie 1, 3, 6, 24 und 48 h nach Substanzinjektion wurden die Tiere fluoreszenzoptisch untersucht. Das Behandlungsschema sowie die Zunahme der Tumorumfänge im Versuchszeitraum sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8 Behandlungsschema, Applikationsvolumen, Tumorumfang nach Versuchszeitpunkten und Volumenzunahme

Versuchstier Nr.	Partikelcharge	Dosis (1x) Zeitpunkt 0h	Tumorumfang [mm <sup>3</sup> ]		Faktor Volumenzunahme
			Zeitpunkt 0 h	Zeitpunkt 48 h	
1	Partikelcharge II	200 µl	392	930	2,4
2	unbehandelt	0 µl	30	99	3,3
3	Partikelcharge I	200 µl	949	1278	1,4
4	Partikelcharge II	200 µl	187	461	2,5
5	Partikelcharge I	200 µl	251	310	1,2

## Apparativer Aufbau



Abb. 135 a) geöffnete Laser-Imaging Box; b) Imagingbox / rechnergestützte Datenaufarbeitung; c) schematische Darstellung der Einzelkomponenten

Ein abstimmbares und gepulstes Festkörperlaser-System wurde als Anregungsquelle ( $\lambda_{\text{ex}}=740 \text{ nm}$ ) verwendet. Die Detektion der Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{em}}=802 \text{ nm}$ ) erfolgte mit einer verstärkten CCD-Kamera. Zur Reduktion des reflektierten Anregungslichtes wurden spezielle Filter eingesetzt. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Einzelkomponenten ist im Anhang aufgeführt.

### 4.5.2.2 Versuchsdaten und Ergebnisse des in vivo Versuches

Versuchstier 3 wurden  $200 \mu\text{l}$  der Partikelcharge I bei Versuchsbeginn (Zeitpunkt 0) intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Nanopartikel hatten einen hydrodynamischen Durchmesser von  $170,3 \text{ nm}$  mit einem PI von  $0,09$ . Das als Zetapotential gemessene Oberflächenpotential betrug  $-29,7 \pm 2,5 \text{ mV}$ .

Der Polymergehalt der modifizierten PBCA-P(PDMAEMA)-Partikeldispersion betrug zuzüglich der Polymeroberfläche aus Glu[10]-b-PEG[110]  $4,4 \text{ mg/ml}$ . Die Nanopartikeldispersion war stabilisiert durch eine 1%ige Synperonic T707 Lösung.

Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von  $740 \text{ nm}$  durchgeführt und die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von  $802 \text{ nm}$  (siehe Abb. 135c)

*a) Einzelabbildungen der fluoreszenzoptischen Untersuchung von Tier 3 in vivo*

Abb. 136 Detektion der NIR-Fluoreszenz von Tier 3 in vivo

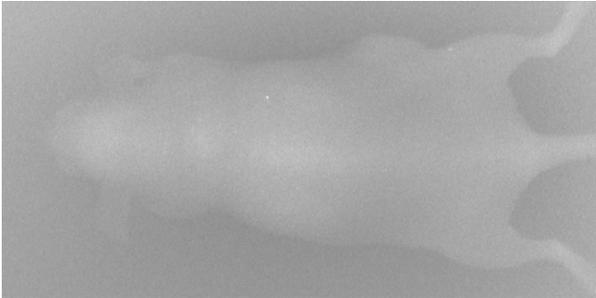


Abb. 136.1  
Leerwert ventral

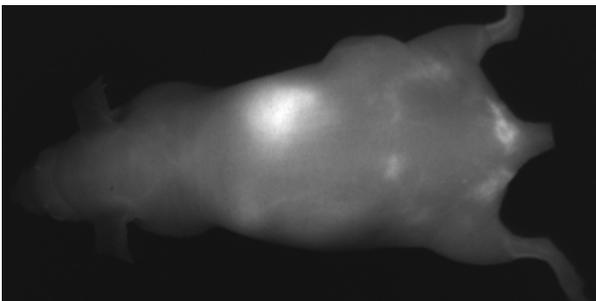


Abb. 136.2  
1 min ventral

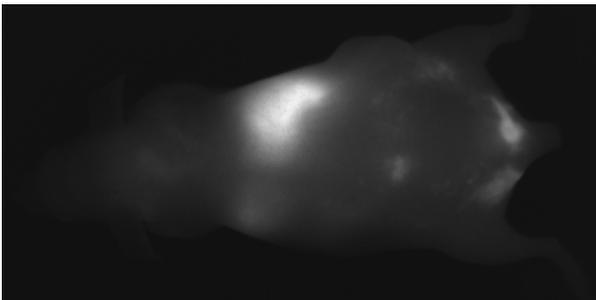


Abb. 136.3  
10 min ventral

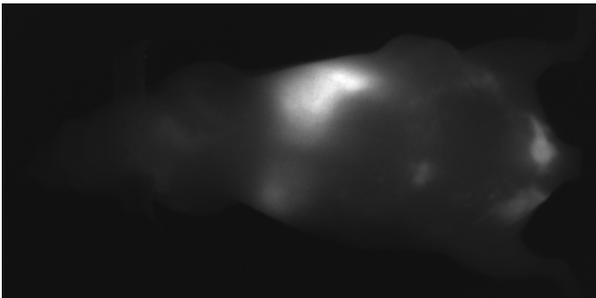


Abb. 136.4  
30 min ventral

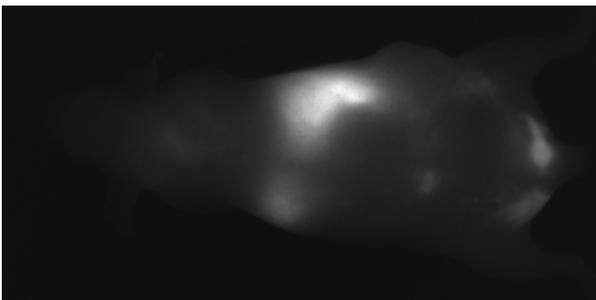


Abb. 136.5  
1 h ventral

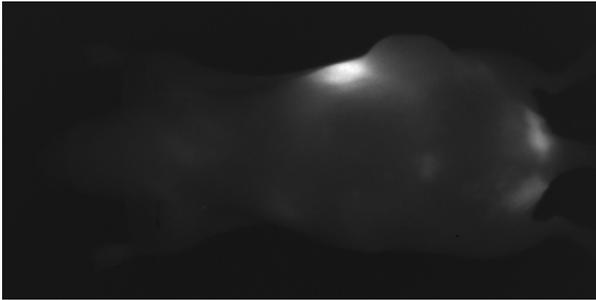


Abb. 136.6  
3 h ventral

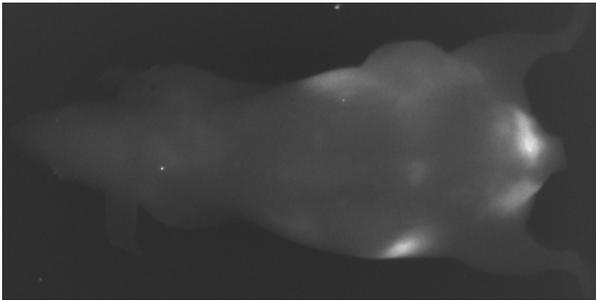


Abb. 136.7  
6 h ventral

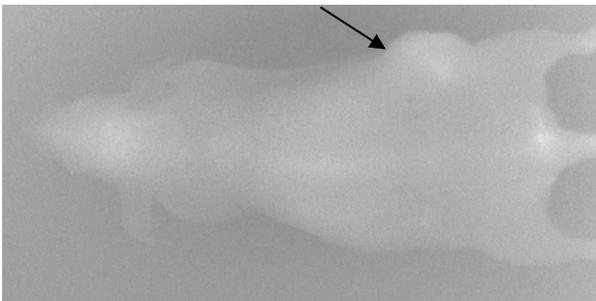


Abb. 136.8  
24 h ventral

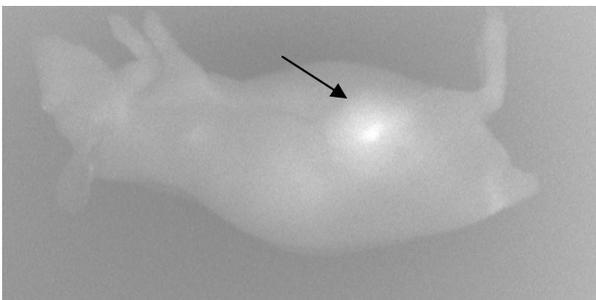


Abb. 136.9  
24 h lateral

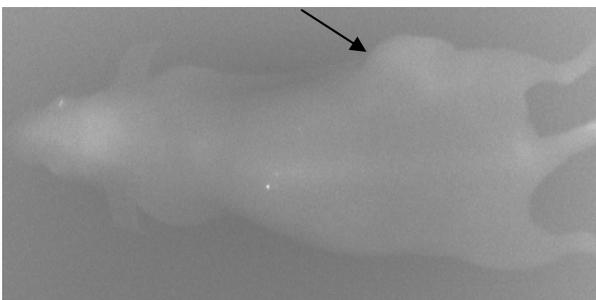


Abb. 136.10  
48 h ventral

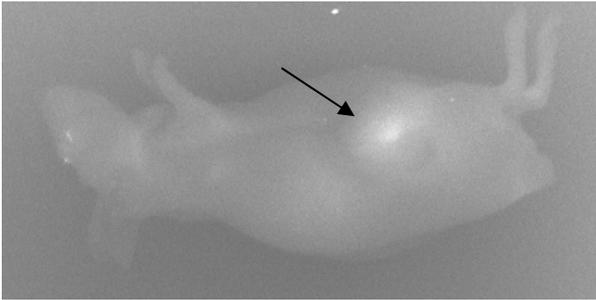


Abb. 136.11  
48 h lateral

### *b) Einzelabbildungen der fluoreszenzoptischen Untersuchung ex vivo*

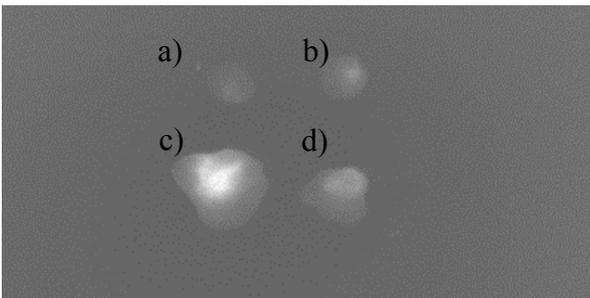


Abb. 137 Tumore (behandelt) ex vivo nach 48 h

- a) Tumor Tier 5
- b) Tumor Tier 4
- c) Tumor Tier 3
- d) Tumor Tier 1

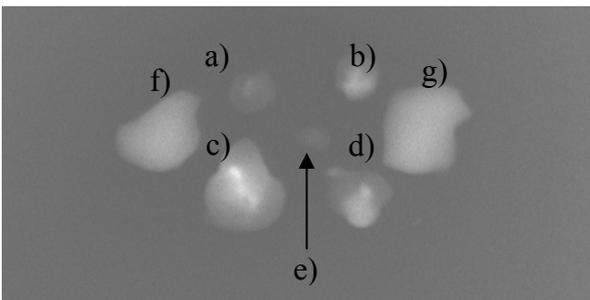


Abb. 138 Tumore und Lebern ex vivo nach 48 h

- a) Tumor Tier 5
- b) Tumor Tier 4
- c) Tumor Tier 3
- d) Tumor Tier 1
- e) Tumor (unbehandelt) Tier 2: Vergleich 1
- f) Leber (unbehandelt) Tier 2: Vergleich 2
- g) Leber (behandelt) Tier 3: nach 48 h

### **4.5.3 Bewertung der Ergebnisse**

Mit Hilfe dieser orientierenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die im NIR-Bereich fluoreszenzaktive Nanopartikelformulierung nach i.v. Applikation zu einer Signalverstärkung im Tumorgewebe führte. Die Behandlung wurde von allen Tieren gut vertragen, was sich in einer 100%igen Überlebensrate über den gesamten Versuchszeitraum widerspiegelte. Nicht angereicherte bzw. aus der Zirkulation eliminierte Partikel wurden offensichtlich sehr schnell in die Leber aufgenommen und über die Gallenwege ausgeschieden.

Die hier aufgeführten Daten erfordern die Erhebung weiterer Kontrolldaten, um bisherige Aussagen prüfen und unterstützen zu können. Weitere in vivo Versuche mit größeren

Tierversuchsgruppen könnten auch nähere Informationen über den Einfluss von Tumorgröße und Tumorart auf die Stärke der Anreicherung geben. Tierversuche dieser Art waren jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### *Verteilung der Nanopartikel*

Tab. 9 Zeitabhängige relative Fluoreszenzsignalstärke einzelner Organe im Vergleich zum Tumor nach Partikelanreicherung (Tier 3); Skalierung: (x) relative Stärke der Fluoreszenz, (-) keine Fluoreszenz

Organ	Zeitpunkt			
	3 h	6 h	24 h	48 h
Leber	xxx	xx	-	-
Darm	xx	xxx	x	-
Tumor	-	x	xx	xx
Niere	-	-	-	-

Die Aufnahmen der Zeitpunkte direkt nach Substanzinjektion bis zu 6 h (Abb. 136.2 bis Abb. 136.7) zeigen ein sowohl für ICG als auch für die Nanopartikel eindeutiges Verteilungsmuster. Die Nanopartikel setzten sehr wahrscheinlich kurz nach der Injektion einen Teil des ICG aus der äußeren Hülle der Partikel frei. Nach Cherrick et al. wird frei zirkulierendes, nicht partikulär verkapselte ICG binnen Sekunden zu 98% an Plasmaproteine gebunden [215]. Die Aufnahme von freigesetztem ICG in peripheres Gewebe, Niere oder Lunge wurde demzufolge unterbunden und dieser Farbstoffanteil ohne chemische Veränderung aus dem Blut über die Leber und anschließend die Gallenflüssigkeit ausgeschieden. Auch Nanopartikel sind diesem Eliminierungsweg über eine Aufnahme in Makrophagen unterworfen. Die Tatsache, dass sowohl die Nanopartikel als auch mögliches freigesetztes ICG ausschließlich über die Leber eliminiert wurden, hatte zur Folge, dass in den ersten 6 Stunden nach Injektion der Leberkontrast einen möglichen schwachen Tumorkontrast überstrahlte.

Einem der Tiere (Nr. 4) wurden wenige Mikroliter der Nanopartikeldispersion nicht erfolgreich in die Schwanzvene injiziert, sondern paravenös in den Schwanz appliziert. Diese dort angereicherten Nanopartikel erzeugten einen starken Kontrast über den gesamten Zeitraum von 48 h. Grund ist, dass die Nanopartikel in diesem Gewebe nicht der schnellen Eliminierung über den Blutkreislauf in die Leber unterliegen. Der positive Kontrast im Schwanzbereich belegt damit, dass die Fluoreszenzaktivität der Partikel im subkutanen Schwanzgewebe konstant über den Versuchszeitraum von 48 h vorhanden war. Eine

Eliminierung in diesem Gewebe erfolgt über Bioabbau der Polymere PBCA und P(DMAEMA).

### *Signalverstärkung im Tumorgewebe*

Die detektierte Signalverstärkung der Fluoreszenz im Bereich des Tumors ist ein Zeichen dafür, dass es zu einer Anreicherung des Farbstoffes im Tumorgewebe kam. Eine derartige Anreicherung ist durch den Farbstoff allein nicht möglich, da dieser wie beschrieben binnen Sekunden an Plasmaproteine bindet. Aufgrund der schnellen Eliminierung aus der systemischen Zirkulation beträgt die Gewebe-Halbwertszeit sowohl in gesundem als auch tumorösem Gewebe weniger als 10 min [216]. Nach intravenöser Gabe einer wässrigen ICG-Lösung wird der maximale Kontrastunterschied zwischen Tumorgewebe und normalem Gewebe nach 2,5 min erreicht [217]. Auf der Grundlage dieser Fakten sind die Aufnahmen der Zeitpunkte 24 h und 48 h von Tier 3 ein deutlicher Hinweis, dass sich die NIR-aktiven Nanopartikel über passives Targeting im Tumorgewebe angereichert hatten, wodurch ein Kontrastunterschied in vivo am lebenden Tier gegenüber dem Leerwert und anderen Organen erzeugt wurde. Bei einer Aufnahme in der lateralen Ansicht war der Tumorkontrast deutlich verstärkt im Vergleich zur Aufnahme in der ventralen Position. Eine mögliche Erklärung ist die geringere Entfernung zwischen Tumor und Kamera in der lateralen Position. Des Weiteren könnte eine bessere Fokussierung des Lasers in der lateralen Aufnahme zu einem größeren Kontrastunterschied geführt haben.

Aufgrund der Abb. 137c kann vermutet werden, dass eine stärkere Anreicherung der Nanopartikel im Tumorinneren stattgefunden hatte, da im Tumorkernbereich das stärkste Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Um sicherzustellen, dass dies nicht ein Effekt auf der Oberfläche des Tumors ist, wurde der Tumor um 90 Grad gedreht und nochmals untersucht (Abb. 138c). Auch hier wurde das stärkste Fluoreszenzsignal in der Tumormitte detektiert, was die Vermutung gemäß Abb. 137c unterstützt. Basierend auf dem Wissen, dass es mit zunehmender Tumormasse zum Absterben der versorgenden Blutgefäße und anschließender Nekrotisierung im Inneren des Tumors kommt, ist die Anreicherung der Nanopartikel vor allem im Tumorinneren sehr erstaunlich. Möglicherweise werden zwar kleinere Tumoren im Inneren besser durch Blutgefäße versorgt, doch vielleicht verhindert genau das eine dauerhafte Anreicherung der Nanopartikel und fördert eher einen schnellen Abtransport.

### *Einfluss der Tumorbeschaffenheit auf die Partikelanreicherung*

Durch die ex vivo Untersuchung der Tumoren nach 48 h konnte auch eine Anreicherung in den kleineren Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 137b und d). Die visuelle Auswertung führte zu der Annahme, dass es eine mögliche Korrelation zwischen Tumorgröße und Kontraststärke, also der Partikelanreicherung, gibt. Der größte Tumor (Abb. 137c) von Tier 3 zeigte den stärksten Kontrastunterschied in vivo und ex vivo. Die beiden mittelgroßen Tumoren (Abb. 137b und Abb. 137d) zeigten ex vivo einen Kontrastunterschied, welcher jedoch für eine Detektion in vivo zu schwach war. Der kleinste Tumor (Abb. 137a) zeigte keinen eindeutigen Kontrastunterschied im Vergleich zu dem Leertumor (Abb. 138e).

#### *a) Ergebnisvergleich Partikelcharge I*

Die Verwendung der Partikelcharge 11.14 bei Tier 5 und Tier 3 führte offensichtlich in Abhängigkeit von der Tumorbeschaffenheit zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Abb. 137a und Abb. 138a). Tier 5 mit dem geringsten Tumorendvolumen unter den behandelten Tieren zeigte keinen signifikanten Kontrastunterschied und somit keine messbare Nanopartikelanreicherung im Vergleich zum Leertumor. Tier 3 hingegen, mit dem von Beginn an größten Tumolvolumen, zeigte nach 24 h und 48 h einen eindeutigen Kontrastunterschied im Vergleich zum umgebenden Gewebe, vor allem in der lateralen Ansicht (Abb. 136.9 und Abb. 136.11). Diese Anreicherung wurde noch deutlicher sichtbar in der fluoreszenzoptischen Untersuchung ex vivo nach 48 h (Abb. 137c und Abb. 138c). Eine mögliche Erklärung kann der Vergleich der Tumorzunahme als Maß für die Tumoraktivität im Versuchszeitraum liefern (siehe Tab. 8).

Tier 3 wies bereits bei Versuchsbeginn ein beträchtliches Tumolvolumen auf, weshalb vermutlich durch fortschreitende Nekrotisierung im Tumorrinneren das Wachstum im Versuchszeitraum relativ langsam war. Dies würde die nur geringe Volumenzunahme um Faktor 1,4 erklären. Aufgrund der Größe ist auch anzunehmen, dass dieser Tumor sehr stark vaskularisiert und somit die Fenestrierung der Gefäße weit fortgeschritten war. Die daraus resultierende erhöhte Perfusion vor allem in äußeren Tumorbereichen ist vermutlich der Grund für die gute Anreicherung der Nanopartikel bei Tier 3.

Bei Tier 5 war innerhalb des Versuchszeitraumes nur eine Volumenzunahme um Faktor 1,2 zu verzeichnen. Das liegt deutlich unter der Volumenzunahme der vergleichbaren kleineren Tumoren, ist aber auch geringer als bei dem großen Tumor von Tier 3. Die geringere

Volumenzunahme könnte auf eine insgesamt schlechtere Blutversorgung des Tumors zurückzuführen sein. Eine geringere Perfusion sowie Fenestrierung des Tumors sind möglicherweise die Ursache dafür, dass es nicht zu einer messbaren Anreicherung der Nanopartikel kam.

### *b) Ergebnisvergleich Partikelcharge II*

Die bei Tier 1 und 4 verwendete Partikelcharge führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Ein Kontrast konnte allerdings erst ex vivo festgestellt werden. Die Tumoren zeigten im Versuchszeitraum eine Volumenzunahme um Faktor 2,4 bzw. 2,5. Das Wachstumsverhalten könnte ein Hinweis dafür sein, dass diese beiden Tumoren eine vergleichbare Blutversorgung hatten, was zu einer ähnlichen Partikelanreicherung mit entsprechendem Fluoreszenzsignal führte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei den Tieren eher die Tumorbeschaffenheit und nicht die unterschiedliche Partikelgröße der Partikel ausschlaggebend für das Ausmaß der Anreicherung waren.

### *Behandlungsbedingte Nebenwirkungen*

Zwei der vier Tiere (Tier 4 und Tier 5) zeigten kurz nach der Injektion einen hämolytischen Effekt, erkennbar an der leichten Rotfärbung des Urins. Vermutlich kam es durch eine Interaktion zwischen dem Tensid oder der Partikeloberfläche und den Zellmembranen der Erythrozyten zu deren Zerstörung. Infolge dessen wurde Hämoglobin durch die defekten Erythrozytenmembranen freigesetzt und anschließend renal eliminiert, sichtbar in der Rotfärbung des Urins. Dieser Effekt war ca. 2 h Stunden nach Versuchsbeginn nicht mehr festzustellen.

### *Elimination der Nanopartikel*

Bei Betrachtung der 3 h und 6 h Aufnahme (Abb. 136.6 und Abb. 136.7) ist die beginnende Elimination aus der Leber in die Gallenwege erkennbar. Die Untersuchung des Kotes der Tiere nach 6 h ergab einen positiven Nachweis auf ICG. Ebenso wurde der Urin der Tiere untersucht. Hierbei konnte kein ICG detektiert werden. Die behandelte Leber von Versuchstier 3 sowie die Leber des unbehandelten Tieres 2 wurden ex vivo zusammen kontrastiert (siehe Abb. 138 f und g). Es konnte optisch kein Kontrastunterschied zwischen diesen beiden Organen festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass die von der Leber

aufgenommenen ICG-beladenen Nanopartikel nach 48 h vollständig hepatisch über die Gallenwege eliminiert worden waren. Dieser Fakt deutet sich in der Abb. 136.8 nach 24 h bereits an, da kein Kontrast mehr in der Leber zu erkennen ist. Mögliche Erklärung für diesen Eliminierungsprozess könnte sein, dass die kationischen Kernpartikel nach Desorption der PEG-Oberfläche einen Komplex mit den anionisch geladenen Gallenkomponenten eingehen konnten und anschließend über die Fäzies ausgeschieden wurden. Es muss ebenso in Betracht gezogen werden, dass sich der Farbstoff aus dem Partikel herausgelöst hatte und allein über die Gallenwege eliminiert wurde. Mit einem weiteren in vivo Versuch könnte geprüft werden, ob die Partikel in der Lage waren, die endotheliale Fenestrierung zu passieren um anschließend mit den Gallenkomponenten über die Gallenblase ausgeschieden zu werden. Ein Nachweis wäre möglich durch die Untersuchung der Gallenblase auf Nanopartikel, ca. 6 h nach Versuchsbeginn. Allgemein ist eine schnelle Eliminierung für ein Kontrastmittelsystem von großer Bedeutung, da eine langfristige Beeinflussung des Organismus nach erfolgreicher Kontrastierung nicht erwünscht ist.

#### **4.5.4 Zusammenfassung des Tierversuches und Ausblick**

Der Tierversuch zeigte, dass Glu(10)-b-PEG(110)-modifizierte PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel nach intravenöser Applikation unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage sind, sich über passive Anreicherungsmechanismen wie den EPR-Effekt in Tumorgewebe anzureichern. Die Untersuchung der Tumoren ex vivo belegte bei insgesamt drei von vier Tieren eine deutliche Verstärkung des Fluoreszenzkontrastes im behandelten Tumorgewebe. An einem Versuchstier konnte der Tumor in vivo mittels Optical Imaging eindeutig nachgewiesen werden, wobei eine mehrfache, zeitversetzte Detektion der Fluoreszenz möglich war. Demzufolge konnte ein Teil der Partikel in vivo ausreichend lange zirkulieren und sich entsprechend im Tumor anreichern. Aufgrund dessen wird auch davon ausgegangen, dass die elektrostatisch pegylierte Oberfläche stabil genug mit der Partikeloberfläche verbunden war. Eine schnelle biliäre Eliminierung nicht-tumorassoziierter Partikel wird anhand der Versuchsdaten vermutet und wäre optimale Voraussetzung für ein nebenwirkungsarmes Kontrastmittelsystem.

Folgende Ergebnisse sollen aufgrund ihrer Bedeutung noch einmal besonders hervorgehoben werden:

- Erstmalig wurden durch Ausnutzung von passivem Targeting optisch NIR-aktive Polymernanopartikel in Tumorgewebe angereichert und am lebenden Tier der so entstandene Fluoreszenzkontrast digital mehrfach und zeitversetzt nachgewiesen.
- Bestätigt werden konnte, dass eine elektrostatische Oberflächenmodifikation der Partikel eine ausreichende Stabilität im Rahmen des Tierversuches gewährleistete. Diese Aussage kann durch folgende Sachverhalte gestützt werden:
  - Die abschirmende Partikelhülle war ausreichend stark elektrostatisch an die Partikel gebunden, so dass keine akute toxische Interaktion der kationischen Ladungen mit physiologischen Plasmabestandteilen stattfand.
  - Es wurde keine Akkumulation im Kapillarbett der Lunge festgestellt, was als weiterer Hinweis für eine erfolgreiche Abschirmung der kationischen Ladungen betrachtet werden kann.
  - Die elektrostatisch pegylierte Partikeloberfläche gewährleistete offensichtlich eine ausreichend lange Zirkulation in vivo, wodurch eine Anreicherung über den EPR-Effekt überhaupt erst ermöglicht wurde.
- Der kationische Kernpartikel scheint zusätzlich die Besonderheit aufzuweisen, nach Elimination über die Leber als Komplex mit den Gallensalzen ausgeschieden zu werden. Damit unterliegen diese Art der Partikel einer sehr schnellen Eliminierung mit einem Zeitraum von 6-12 h, eine wichtige Voraussetzung für ein gut verträgliches Kontrastmittel.

Mit derartigen diagnostischen Nanopartikeln könnte in Zukunft die Grundlage für eine erfolgreiche und möglichst nebenwirkungsarme Krebstherapie gelegt werden. Der optisch aktive Nanopartikel liefert den diagnostischen Beweis, dass die applizierten Nanopartikel sich hauptsächlich in tumorösem Gewebe angereichert haben. Ist diese Aussage gesichert, kann der diagnostische Nanopartikel mit einem therapeutischen Wirkstoff kombiniert werden, wodurch eine gezielte Anreicherung hoch wirksamer Substanzen in pathologischem Gewebe möglich wird. Gesundes Gewebe bleibt durch diese Art der Therapie weitestgehend unbelastet, was zu einer drastischen Minderung der Nebenwirkungen führen kann. Eine Senkung der nicht selten dosislimitierenden Toxizität von Zytostatika kann die Chance für einen Therapieerfolg deutlich steigern.