

# ***In vitro* Testung Zelltyp-spezifischer Arzneistoff-Trägersysteme für die Krebstherapie**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von  
Karin Löw

Saarbrücken  
2011

Tag des Kolloquiums:	08.11.2011
Dekan:	Prof. Dr. Wilhelm F. Maier
Berichterstatter:	Prof. Dr. Günter R. Fuhr
	Prof. Dr. Claus-Michael Lehr
Vorsitz:	Prof. Dr. Eckart Meese
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Bärbel Heidtmann

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) St. Ingbert in der Abteilung Zellbiologie & Angewandte Virologie durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme	1
1.2 Photodynamische Therapie	10
1.3 Zielsetzung	19
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>21</b>
2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	21
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.3 Medien, Lösungen und Antikörper	23
<b>2.2 Methoden</b>	<b>25</b>
2.2.1 Zellkultur	25
2.2.1.1 Kultivierung von humanen Kolonkarzinom-Zellen	25
2.2.1.2 Passagieren von adhärennten Zellen	25
2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	25
2.2.1.4 Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)	26
2.2.1.5 3D-Tumormodell (Sphäroid): Sphäroidherstellung	27
2.2.2 Herstellung und Charakterisierung von Nanopartikeln	30
2.2.2.1 Nanopartikel basierend auf Gold	30
2.2.2.2 Nanopartikel basierend auf humanen Serumalbumin (HSA)	31
2.2.2.3 Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)	32

2.2.3	Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften von Nanopartikeln	33
2.2.3.1	Bestimmung der Zellviabilität (WST-1-Assay)	33
2.2.3.2	Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Assay)	34
2.2.3.3	Bestimmung der Membranintegrität (LDH-Assay)	35
2.2.4	Zelluläre Akkumulation von Nanopartikeln	36
2.2.4.1	Hellfeldmikroskopie	36
2.2.4.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	36
2.2.4.3	Multiphotonen-basierte Raster-Lasermikroskopie ( <i>multiphoton-based laser scanning microscopy</i> ; MP-LSM)	36
2.2.4.4	Durchflusszytometrie	37
2.2.4.5	Konfokale Raster-Lasermikroskopie ( <i>confocal laser scanning microscopy</i> , CLSM)	37
2.2.5	Zelluläre Akkumulation des Photosensibilisators mTHPC	39
2.2.6	mTHPC-beladene Nanopartikel	40
2.2.6.1	Bestimmung der Absorptionsspektren	40
2.2.6.2	Zelluläre Anreicherung	40
2.2.6.3	Zelluläre Bindung	41
2.2.6.4	Intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung	41
2.2.7	Bestimmung der Photozytotoxizität	41
2.2.7.1	Entwicklung einer Bestrahlungseinheit	41
2.2.7.2	Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität	42
2.2.7.3	Nachweis von apoptotischen Ereignissen	43
2.2.7.4	Zelluläre Akkumulation in Tumorsphäroiden	45
2.2.8	Zelltyp-spezifische nanopartikuläre Anreicherung	46
2.2.8.1	EGFR-Oberflächenexpression	46
2.2.8.2	Zytotoxizität von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln	47
2.2.8.3	Zelluläre Akkumulation von Cetuximab-modifizierten Nanopartikeln	48
2.2.9	Antikörper-modifizierte & mTHPC-beladene Nanopartikel	50
2.2.9.1	Zelluläre Bindung	50
2.2.9.2	Bestimmung der Photozytotoxizität	50
2.2.9.3	Bestimmung von Membranfluktuationen	51
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Morphologische Charakterisierung von Kolonkarzinomzelllinien</b>	<b>52</b>
<b>3.2</b>	<b>Nanopartikelcharakterisierung</b>	<b>53</b>
3.2.1	Gold-Nanopartikel	53
3.2.2	Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA)	54
3.2.3	Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)	55

<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der Eigenschaften von Nanopartikeln</b>	<b>56</b>
3.3.1	Zytotoxizität	56
3.3.1.1	Gold-Nanopartikel	56
3.3.1.2	Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA)	60
3.3.1.3	Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)	62
3.3.2	Zelluläre Bindung und subzelluläre Verteilung	64
3.3.2.1	Gold-Nanopartikel	64
3.3.2.2	Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA)	67
3.3.2.3	Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)	68
<b>3.4</b>	<b>Zelluläre Bindung von freiem mTHPC</b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	<b>mTHPC-beladene Nanopartikel</b>	<b>71</b>
3.5.1	Absorptionsspektren	71
3.5.2	Zelluläre Anreicherung	72
3.5.3	Zelluläre Bindung und subzelluläre Verteilung	73
3.5.3.1	mTHPC-beladene Gold-Nanopartikel	73
3.5.3.2	mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel	75
3.5.3.3	mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel	77
<b>3.6</b>	<b>Bestimmung der Photozytotoxizität</b>	<b>81</b>
3.6.1	Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität	81
3.6.2	Nachweis von apoptotischen Ereignissen	89
3.6.3	3D-Tumormodell	95
3.6.3.1	Wachstumsverhalten von Sphäroiden	95
3.6.3.2	Zelluläre Akkumulation von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC in HT29-Sphäroiden	97
3.6.3.3	Nachweis von apoptotischen Ereignissen	99
<b>3.7</b>	<b>Zelltyp-spezifische nanopartikuläre Anreicherung</b>	<b>101</b>
3.7.1	EGFR-Oberflächenexpression	101
3.7.2	Spezifische HSA-Nanopartikel	102
3.7.2.1	Zytotoxizität	102
3.7.2.2	Zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln	103
3.7.3	Spezifische PLGA-Nanopartikel	110
3.7.3.1	Zytotoxizität	110
3.7.3.2	Zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln	111
<b>3.8</b>	<b>Cetuximab-modifizierte und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel</b>	<b>118</b>
3.8.1	Zelluläre Bindung	118
3.8.2	Bestimmung der Photozytotoxizität	119

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>125</b>
4.1	Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel	125
4.2	Nanopartikel zum Transport des Photosensibilisators mTHPC	129
4.3	Zelltyp-spezifische Nanopartikel	138
4.4	Zelltyp-spezifische und Photosensibilisator-beladene Nanopartikel	142
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>147</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>149</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>160</b>
	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>162</b>
	<b>DANK</b>	<b>164</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>166</b>

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche nanopartikuläre Formulierungen *in vitro* in Bezug auf einen Wirkstofftransport und einer damit assoziierter Wirksamkeit sowie einer spezifischen Akkumulation in Zielzellen vergleichend untersucht. Der Fokus lag dabei auf dem spezifischen Transport des Photosensibilisators mTHPC in verschiedene Kolonkarzinomzelllinien. Zu Beginn wurde die zelluläre Verträglichkeit der untersuchten Nanopartikel basierend auf unterschiedlichen Materialien wie Gold, humanem Serumalbumin (HSA) und Polymilch-co-glykolsäure (PLGA) demonstriert. Im Anschluss erfolgte die Anbindung des Arzneistoffs mTHPC an die verschiedenen Systeme, in der Folge wurde dessen Freisetzung und Wirksamkeit belegt. Hierbei konnte für alle Systeme eine Photozytotoxizität bei verminderter Dunkeltoxizität ermittelt werden. Zudem wurden die mTHPC-behandelten Zellen auf die Induktion von Apoptose untersucht. Da die Nanopartikel weiterhin über eine Zelltyp-spezifische Anreicherung verfügen sollten, wurden diese mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab versehen, der seinerseits spezifisch den humanen EGFR bindet. Folglich wurde die spezifische Anreicherung von oberflächenmodifizierten HSA- und PLGA-Nanopartikeln in zwei Zelllinien untersucht. Hierbei konnte eine spezifische Anreicherung für Albuminpartikel über Cetuximab bewiesen werden. Schließlich wurde eine Vollpräparation, die neben mTHPC über Cetuximab verfügt, hinsichtlich ihres spezifischen Transports und ihrer spezifischen Wirksamkeit untersucht.

## Summary

In the present study different nanoparticulate formulations were comparatively tested *in vitro* concerning a drug delivery and associated effectivity as well a specific accumulation in targeted tissue. The focus mainly concentrates on the specific delivery of the photosensitizer mTHPC into different colon carcinoma cells. First the cellular compatibility was shown for the tested nanoparticles based on different materials like gold, human serum albumin or poly(lactic-co-glycolic acid). Following the drug mTHPC was bound onto the different systems and the drug release as well as the effectivity was investigated. For all tested formulations a photocytotoxicity with reduced dark toxicity could be demonstrated. Furthermore, the mTHPC treated cells were analysed regarding the induction of apoptosis. Since the nanoparticles should accumulate specifically in targeted cells, they were modified with the monoclonal antibody Cetuximab that specifically binds the human EGFR on its part. Afterwards the specific accumulation of surface modified HSA and PLGA nanoparticles into two cell lines was determined. Here, a specific accumulation of the albumin particles over Cetuximab was demonstrated. Finally, a full preparation that possesses mTHPC and Cetuximab on its surface was investigated concerning a specific drug delivery and a specific effectivity.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität ( <i>Antibody-Dependent Cell mediated Cytotoxicity</i> )
AK	Antikörper
AMD	altersbedingte Maculadegeneration
AuNP	Gold-Nanopartikel
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cet	Cetuximab <sup>®</sup>
CLSM	konfokale Raster-Lasermikroskopie ( <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> )
CPD	kritische Punkttrocknung ( <i>Critical Point Drying</i> )
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamin-2'-phenylindoldihydrochlorid
dest.	destilliert
DLI	<i>Drug Light Interval</i>
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
EMA	europäische Arzneimittelagentur ( <i>European Medicines Agency</i> )
EPR	erhöhte Permeabilität und Retention ( <i>Enhanced Permeability and Retention</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> )
FDA	Fluoresceindiacetat
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 ( <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> )
HMDS	Hexamethyldisilazan
HpD	Hämatoporphyrin-Derivat
HSA	humanes Serumalbumin
HSA-Cetuximab	Cetuximab-modifizierte HSA-Nanopartikel
HSA-IgG	IgG-modifizierte HSA-Nanopartikel
HSA <sub>m</sub> THPC	mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel
HSA <sub>m</sub> THPC-Cet	Cetuximab-modifizierte und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel
HSA <sub>m</sub> THPC-IgG	IgG-modifizierte und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel
IgG	Immunglobulin G
ISC	Intersystem Crossing
Lbl	Layer-by-Layer Technologie
LDH	Lactatdehydrogenase
lum	Lumogen Yellow <sup>®</sup>
LY	Lumogen Yellow <sup>®</sup>
MDH	mitochondriale Dehydrogenase
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute

MP-LSM	Multiphotonen-basierte Raster-Lasermikroskopie ( <i>Multiphoton-based Laser Scanning Microscopy</i> )
mTHPC	5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)Chlorin
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAD <sup>+</sup> H <sup>+</sup>	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NHS-PEG-Mal	Poly(ethylenglykol)- $\alpha$ -Maleinimid- $\omega$ -N-Hydroxysuccinimidylester
NIR	Nahes Infrarot
NP	Nanopartikel
NP-Cet	Cetuximab-modifizierter Nanopartikel
NP-IgG	IgG-modifizierter Nanopartikel
NPmTHPC	mTHPC-beladener Nanopartikel
PAH	Polyallylamin-Hydrochlorid
PARP	Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphat Buffered Saline</i> )
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie ( <i>Photon Correlation Spectroscopy</i> )
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PhS	Photosensibilisator
PI	Propidiumiodid
PLGA	Poly(lactid-co-Glycolid), Polymilch-co-glykolsäure
PLGA-Cetuximab	Cetuximab-modifizierte PLGA-Nanopartikel
PLGA-IgG	IgG-modifizierte PLGA-Nanopartikel
PLGAmTHPC	mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel
Poly-HEMA	Poly(2-hydroxyethylmethacrylat)
PSS	Polystyrolsulfonat
PVA	Polyvinylalkohol
RE	Rückstreuelektronen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RES	retikuloendotheliales System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SE	Sekundärelektronen
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TX	Triton-X 100
U	Unit
UAM	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UCN	<i>Upconverting Nanoparticles</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ g	Mikrogramm
WST-1	Wasserlösliches tetrazolium ( <i>Water Soluble Tetrazolium</i> ) (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat)
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Möglichkeiten zu der Beladung von nanopartikulären Trägersystemen mit Wirkstoffen.	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der Akkumulation von nanopartikulären Trägersystemen über aktives und passives Tumortargeting.	4
Abb. 3: Schematische Darstellung der ErbB-Familie.	6
Abb. 4: Schematische Darstellung einer Photodynamischen Therapie Behandlung.	11
Abb. 5: Energieschema zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.	12
Abb. 6: Struktur und Absorptionsspektrum von mTHPC.	16
Abb. 7: Modell zur Herstellung von 3D-Tumor-sphäroiden mittels „Hanging Drop“-Technik.	28
Abb. 8: Oberflächenmodifizierung von HSA-Nanopartikeln.	32
Abb. 9: Messaufbau eines konfokalen Laser-Rastermikroskops.	38
Abb. 10: Aufbau der Bestrahlungseinheit zur Bestrahlung von Proben.	42
Abb. 11: Detektion von Membranänderungen induziert durch Apoptose (APOPercentage Apoptosis Assay).	44
Abb. 12: Morphologie von HT29- und DiFi-Zellen im Monolayer.	53
Abb. 13: Bestimmung der Zytotoxizität in Folge einer Langzeitinkubation mit Gold-Nanopartikel.	57
Abb. 14: Bestimmung von Folge-erscheinung in Anschluss an Kurzzeitinkubation mit Gold-Nanopartikeln.	59
Abb. 15: Bestimmung der Zytotoxizität in Folge einer Langzeit-inkubation mit HSA-Nanopartikeln.	61
Abb. 16: Bestimmung der Zytotoxizität in Folge einer Langzeit-inkubation mit PLGA-Nanopartikeln.	63
Abb. 17: Zelluläre Bindung von Gold-Nanopartikeln an HT29-Zellen.	64
Abb. 18: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Gold-Nanopartikeln an HT29-Zellen.	65
Abb. 19: Subzelluläre Verteilung von Gold-Nanopartikeln in HT29-Zellen.	66
Abb. 20: Zelluläre Bindung und Akkumulation von HSA-Nanopartikeln.	67
Abb. 21: Zelluläre Bindung und Akkumulation von PLGA-Nanopartikeln.	68
Abb. 22: Bestimmung der zellulären Bindung und intrazellulären Akkumulation von freiem mTHPC in HT29-Zellen mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Raster-Lasermikroskopie.	70
Abb. 23: Absorptions-spektrum von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC.	72
Abb. 24: Zelluläre An-reicherung von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC.	73
Abb. 25: Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC (Gold-Nanopartikel).	74
Abb. 26: Intrazelluläre Akkumulation von mTHPC und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in HT29-Zellen bei 4 & 37 °C.	75
Abb. 27: Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln.	76
Abb. 28: Intrazelluläre Akkumulation von mTHPC und mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln in HT29-Zellen bei 4 & 37 °C.	78
Abb. 29: Zelluläre Akkumulation von PLGAmTHPC in HT29.	79
Abb. 30: Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln.	80
Abb. 31: Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität von freiem mTHPC.	82
Abb. 32: Bestimmung der induzierten Phototoxizität von mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikeln.	84
Abb. 33: Bestimmung der induzierten Phototoxizität von mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln.	86

Abb. 34: Bestimmung der induzierten Phototoxizität von mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln.	88
Abb. 35: Quantifizierung der Apoptoseinduktion mittels APOPercentage Apoptosis Assay und Pixelwertbestimmung.	90
Abb. 36: Nachweis von PARP <sub>cleaved</sub> nach Behandlung mit freiem mTHPC.	92
Abb. 37: Nachweis von PARP <sub>cleaved</sub> nach Behandlung mit mTHPC-beladener HSA-Nanopartikel.	93
Abb. 38: Nachweis von PARP <sub>cleaved</sub> nach Behandlung mit mTHPC-beladener PLGA-Nanopartikel.	94
Abb. 39: Wachstum und Vitalitätsnachweis von HT29-Sphäroiden.	96
Abb. 40: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von HT29-Sphäroiden.	97
Abb. 41: Nachweis von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen Nanopartikeln (PLGA & HSA) in HT29-Sphäroiden.	98
Abb. 42: Nachweis von PARP <sub>cleaved</sub> in Sphäroiden nach einer PDT-Behandlung.	100
Abb. 43: Bestimmung der EGFR-Expression von DiFi- und HT29-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie.	102
Abb. 44: Toxizität von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln.	103
Abb. 45: Spezifische zelluläre Bindung Cetuximab-modifizierter HSA-Nanopartikel.	104
Abb. 46: Spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln.	106
Abb. 47: Spezifische zelluläre Bindung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln in der An- und Abwesenheit von freiem Cetuximab.	107
Abb. 48: Untersuchung der zellulären Akkumulation von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.	108
Abb. 49: Automatische Bildgebung der zeitabhängigen Anreicherung von spezifischen HSA-Nanopartikeln (BioStation M).	110
Abb. 50: Toxizität von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln.	111
Abb. 51: Spezifische zelluläre Bindung Cetuximab-modifizierter PLGA-Nanopartikel.	112
Abb. 52: Zeitabhängige spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln.	113
Abb. 53: Spezifische zelluläre Bindung von Cetuximab-modifizierten PLGA-Nanopartikeln in der An- und Abwesenheit von freiem Cetuximab.	115
Abb. 54: Untersuchung der zellulären Akkumulation von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.	116
Abb. 55: Automatische Bildgebung der zeitabhängigen Anreicherung von spezifischen PLGA-Nanopartikeln (BioStation M).	117
Abb. 56: Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Bindung von oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln.	118
Abb. 57: Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität von oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in HT29-Zellen.	120
Abb. 58: Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität von oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in DiFi-Zellen.	122
Abb. 59: Quantifizierung der Apoptoseinduktion durch oberflächenmodifizierte und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel mittels APOPercentage Apoptosis Assay und Pixelwertbestimmung.	124

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.	24
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Laser sowie Emissionsfilter zur Detektion von Fluorochromen und Nanopartikeln.	24
Tab. 3: Spezifizierung der verwendeten Laser	38
Tab. 4: Physikochemische Charakterisierung von Gold-Nanopartikeln.	54
Tab. 5: Physikochemische Charakterisierung von HSA-Nanopartikel.	55
Tab. 6: Physikochemische Charakterisierung von PLGA-Nanopartikel.	56
Tab. 7: Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln mittels Durchflusszytometer (n=3).	76
Tab. 8: Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Durchflusszytometer (n=3).	80
Tab. 9: Wachstumszunahme von HT29-Sphäroiden, die mittels „ <i>Hanging-Drop</i> “-Technik hergestellt wurden.	95
Tab. 10: Bestimmung der spezifischen zellulären Bindung von Cetuximab- und IgG-modifizierten HSA-Nanopartikel (n=4).	105
Tab. 11: Quantifizierung der spezifischen zellulären Bindung von Cetuximab- und IgG-modifizierten PLGA-Nanopartikel (n=2).	112
Tab. 12: Zeitabhängige spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln (n=3).	114
Tab. 13: Bestimmung der spezifischen zellulären Anreicherung von mTHPC über oberflächenmodifizierte mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (n=3).	119

## 1 Einleitung

Die Entwicklung neuer Arzneistoffe und die Optimierung bereits bestehender Formulierungen schreitet immer weiter voran. Einige der heute verschriebenen Arzneistoffe sind jedoch durch schlechte physikochemische Eigenschaften, eine verminderte Bioverfügbarkeit und eine daraus resultierende schlechte Körperverteilung charakterisiert <sup>(1)</sup>. Aufgrund der genannten Eigenschaften kommt es oft zu einer nicht ausreichenden Wirkstoffkonzentration in den betroffenen Zielgeweben und darüber hinaus zu einer unspezifischen Akkumulation in gesundem Gewebe. Diese Faktoren bedingen oft die Ausbildung von unerwünschten Nebenwirkungen (unerwünschte Arzneimittelwirkung, UAW) und stellen die Pharmaindustrie vor ein ernst zu nehmendes Problem. In den USA werden 100.000 Todesfälle pro Jahr auf unerwünschte Nebenwirkungen zurückgeführt, was somit der zehnthäufigsten Todesursache entspricht <sup>(2)</sup>. Daneben belaufen sich die Folgekosten für Behandlungen bedingt durch Nebenwirkungen in Deutschland jährlich auf ca. 400 Mio. € <sup>(3)</sup>. Die Verringerung von Nebenwirkungen und eine damit verbundene verbesserte Therapie von Patienten sowie eine Reduktion von anfallenden Kosten ist ein wichtiges Ziel der heutigen Pharmaindustrie. Einen Ansatzpunkt zur Lösung der genannten Punkte bietet die Nanotechnologie. Mit Hilfe der Nanotechnologie können die Eigenschaften von Wirkstoffen gezielt verändert werden. Außerdem gewinnen Aspekte, wie eine verbesserte Wasserlöslichkeit und eine gezielten Applikation des Wirkstoffs in das betreffende Gewebe oder Organ, mehr an Bedeutung. Im medizinischen Bereich nimmt die Nanotechnologie vor allem in der Diagnostik und der Therapie eine besondere Stellung ein. Nanopartikuläre Systeme ermöglichen den Transport von Arzneistoffen in erkranktes Gewebe oder fungieren selber als Diagnosesubstanzen (z. B. Kontrastmittel).

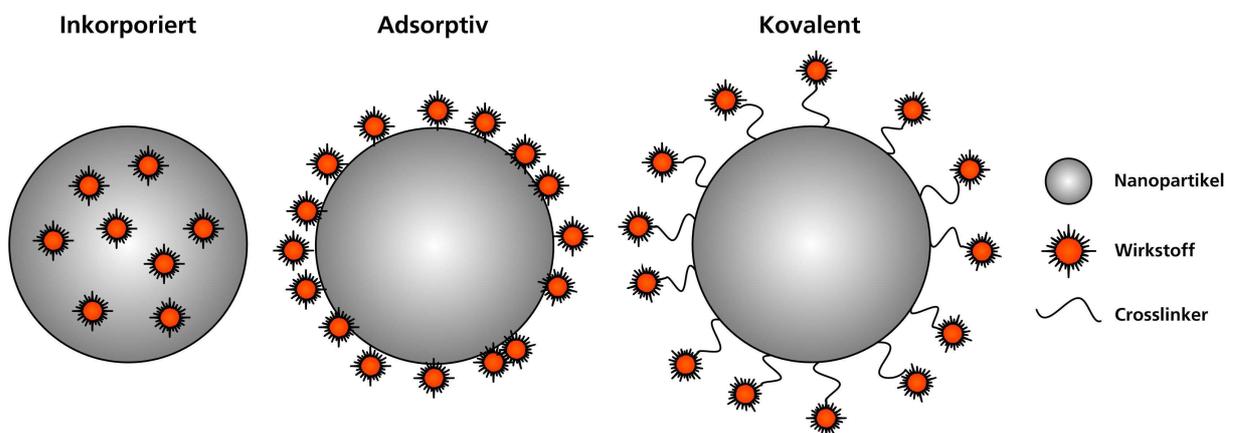
### 1.1 Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme

Bei nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen handelt es sich um nanostrukturierte Trägersysteme, die eine verstärkte Anreicherung eines Arzneistoffs in das gewünschte Gewebe oder Organ (Drug Targeting) ermöglichen. Ihre Größe beträgt im pharmazeutischen Bereich zwischen 10 und 1000 nm und liegt somit zum Teil über der derzeitigen Definition von Nanopartikeln (1-100 nm). Die Nanopartikel fungieren hierbei als Transportsysteme, die einen Transport über biologische Barrieren (Magen-Darm-Wand, Blut-Hirn-Schranke <sup>(4, 5)</sup>) ermöglichen und die Substanz bzw. das umliegende Gewebe schützen, bis das Zielgebiet erreicht wurde.

Nanoskalige Systeme können je nach Anwendung aus den unterschiedlichsten Materialien aufgebaut werden. Vielfache Anwendung finden vor allem natürliche Substanzen, die vom Körper abgebaut werden können und sich durch eine gut

untersuchte Biokompatibilität auszeichnen. Hierzu zählen neben Gelatine und Chitosan vor allem auch Serumalbumine (z.B. humanes Serumalbumin, HSA) <sup>(6-8)</sup>. Andere Systeme basieren auf synthetischen Polymeren wie Polymilchsäure-co-glykolsäure (PLGA) oder Polymilchsäure (PLA) <sup>(9)</sup>. Metalloxide (wie Eisenoxid oder Magnetit) bzw. metallbasierte Nanopartikel (Gold) kommen vor allem bei Hyperthermieverfahren zum Einsatz <sup>(10)</sup>.

Der Einsatz von innovativen nanopartikulären Formulierungen zum Transport von verschiedenen Wirksubstanzen ermöglicht unter anderem die Reduktion von Nebenwirkungen, eine höhere Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe und eine verbesserte Wasserlöslichkeit, die eine effektivere Behandlung zur Folge hat. Die Anbindung des Arzneistoffs an die Nanopartikel ist ein essentieller Schritt in der Entwicklung von neuen Formulierungen und kann entweder durch Einbettung in die Partikelmatrix oder durch Anbindung an die Oberfläche erfolgen <sup>(11, 12)</sup> (Abb. 1).



**Abb. 1: Möglichkeiten zu der Beladung von nanopartikulären Trägersystemen mit Wirkstoffen.**

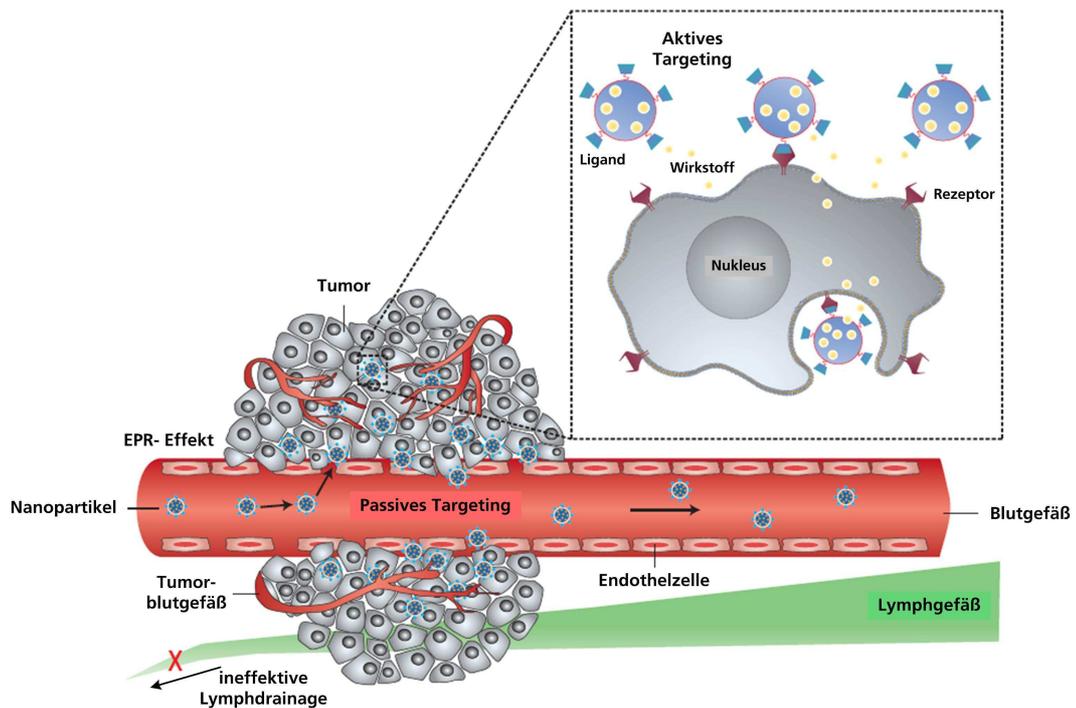
Die Beladung eines Nanopartikels mit einem Wirkstoff kann durch Inkorporierung des Wirkstoffs in die Partikelmatrix oder durch Anbindung an die Nanopartikeloberfläche geschehen. Hierbei wird zwischen einer adsorptiven Anbindung und einer kovalenten Anbindung über Crosslinker unterschieden.

Entsprechend der vorliegenden Bindung kann der Arzneistoff in dem gewünschten Gewebe über einen bestimmten Zeitraum freigesetzt werden und dort seine pharmakologische Wirksamkeit entfalten (*Controlled Release*). Während der Inkorporation wird der Wirkstoff in die Partikelmatrix eingelagert und befindet sich innerhalb dieser. Die Freisetzung aus diesem System kann entweder durch freie Diffusion aus der Matrix oder durch Abbau des Partikels erfolgen. Demzufolge ist die Freisetzung meist zeitverzögert und kann über einen längeren Zeitraum stattfinden. Ferner kann der Arzneistoff an die Partikeloberfläche adsorptiv oder kovalent gebunden werden. Die adsorptive Bindung beruht vor allem auf der Interaktion des Arzneistoffs mit der Partikeloberfläche über van-der-Waals-Kräfte oder über elektrostatische Wechselwirkungen und ermöglicht eine schnelle Freisetzung nach Erreichen des Zielorts. Eine kovalente Anbindung, z. B. über Crosslinker, stellt eine weitere Alternative zur

Anbindung dar. Aufgrund der stabilen Anbindung kann die Freisetzung nur nach Spaltung der Bindung erfolgen und ist unabhängig von den Arzneistoffeigenschaften. Die erste Generation von Nanopartikeln verfügte über keinerlei Modifizierungen der Partikeloberfläche und wurde häufig durch Bestandteile des retikuloendothelialen Systems (RES) aus dem Blut entfernt <sup>(13, 14)</sup>. Die Aufgabe des RES besteht darin, körpereigene Abbauprodukte und Fremdstoffe zu entfernen <sup>(15)</sup>. Durch Anlagerung von speziellen Proteinen (Oberbegriff: Opsonine; hierzu zählen u.a. Immunglobuline, Fibronectin), der sogenannten Opsonisierung, können diese durch das RES erkannt, phagozytiert und abgebaut werden. Zum Schutz der Partikel vor all zu schneller Markierung durch Opsonine wurden die Nanopartikel mit hydrophilen Oberflächenstrukturen (Polyethylenglykol, PEG <sup>(16-19)</sup>) bzw. Tensiden (Polysorbat, Poloxamer <sup>(20-22)</sup>) versehen, die einer Markierung entgegenwirkten. Die Modifikation trug zu einer längeren Verweildauer und Zirkulation der Partikel im Blut bei und hatte somit einen erheblichen Einfluss auf die Verteilung der Partikel im Körper (*Stealth Particles* <sup>(23, 24)</sup>). Die lange Verweildauer der modifizierten Nanopartikel ermöglicht es diesen, in das Zielgewebe einzudringen und dort den Wirkstoff freizusetzen. Durch die Einführung von zusätzlichen Gruppen bzw. Liganden auf der Nanopartikeloberfläche (siehe aktives Targeting) konnten verschieden gerichtete, langzirkulierende Nanopartikel hergestellt und *in vitro* getestet werden. Der Pharmaindustrie stehen somit verschiedene Systeme zur Verfügung, die je nach Anwendung und Applikation verschieden modifiziert werden können.

Eine Anreicherung von nanoskaligen Systemen und die damit assoziierte Wirkstofffreisetzung können über zwei unterschiedliche Strategien erfolgen. Neben einer passiven Diffusion ist ein aktives Targeting möglich (Abb. 2).

Malignes Gewebe unterscheidet sich in vielen Punkten von gesundem Gewebe. Die veränderte Beschaffenheit von Tumoren gegenüber Normalgewebe ermöglicht ein passives Tumortargeting über den sogenannten „*enhanced permeability and retention*“-Effekt (EPR, „erhöhte Permeabilität und Retention“) <sup>(25-27)</sup>. Während des Tumorstwachstums kommt es zur Nährstoffunterversorgung von im Inneren befindlichen Regionen <sup>(28)</sup>. Um eine weitere Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten, schüttet der Tumor Botenstoffe aus, die eine Neovaskularisierung induziert <sup>(29)</sup>. Aufgrund des massiven und rasanten Tumorstwachstums und der damit verbunden schnellen Hypervaskularisierung weisen die neu entstandenen Gefäße Lücken in der im Normalgefäß ansonsten geschlossenen abschließenden Endothelschicht auf.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Akkumulation von nanopartikulären Trägersystemen über aktives und passives Tumortargeting.**

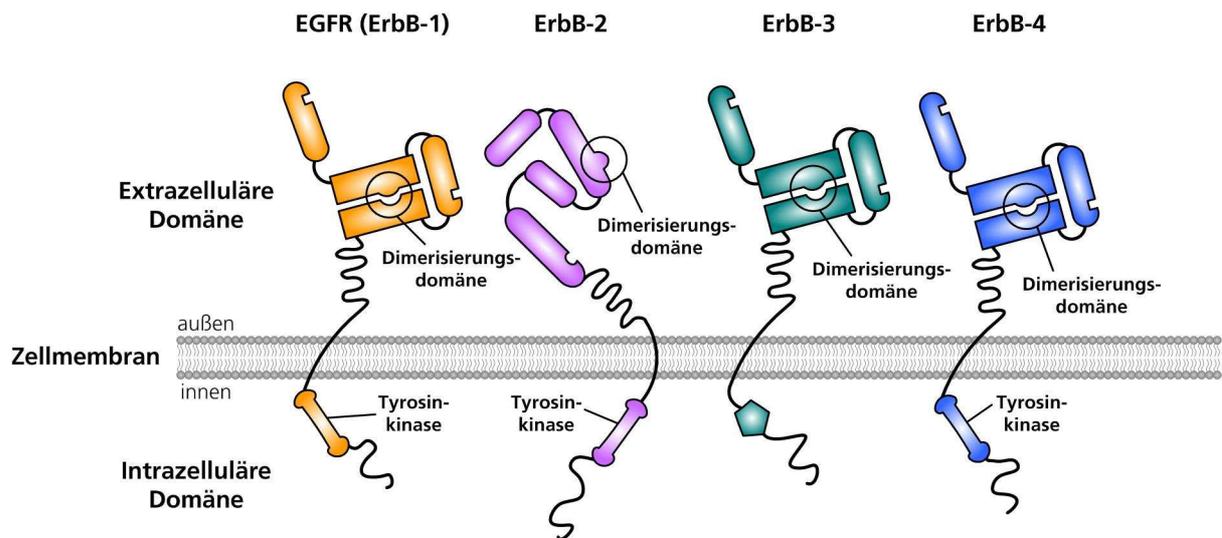
Passive Anreicherung von langzirkulierenden Nanopartikeln über verstärkte Permeabilität von Blutgefäßen und ineffektiver Lymphdrainage eines Tumors (EPR-Effekt). Vergrößerung: Aktive Aufnahme von Nanopartikeln über Oberflächenmodifizierung (Liganden) (modifiziert nach Peer et al. 2007<sup>(30)</sup>).

Die resultierenden Poren (Fenestrierungen) weisen eine Größe zwischen 200 und 600 nm auf und ermöglichen die Infiltration von Makromolekülen, darunter Proteine und Nanopartikel<sup>(31)</sup>. Neben einer veränderten Vaskularisierung, die eine erhöhte Permeabilität zur Folge hat, fehlen begleitend auch effektive Lymphgefäße. Durch den fehlenden Flüssigkeitsabtransport aus dem malignen Gewebe erhöht sich der interstitielle Druck und infiltrierte Bestandteile werden an einem Verlassen des Tumors gehindert und zurückgehalten. Insbesondere die beschriebenen Faktoren bedingen eine Akkumulation von Nanopartikeln in malignem Gewebe, bedingt durch eine gesteigerte Anreicherung und ein erhöhtes Rückhaltevermögen. Nanopartikel, die lange im Blutkreislauf zirkulieren („Stealth“-Partikel), können über den EPR-Effekt im Tumor akkumulieren und dort den Wirkstoff freisetzen<sup>(16)</sup>.

Neben einer passiven Anreicherung werden nanoskalige Systeme für ein aktives Targeting entwickelt. Durch eine gezielte Erkennung von spezifischen zellulären Merkmalen können Zielzellen detektiert und infiltrierte werden. Der transportierte Wirkstoff wird dementsprechend in das Zielgewebe entlassen und kann dort seine pharmakologische Wirksamkeit entfalten (*Targeted Delivery*). Durch den Einsatz von gezielten Transportsystemen ist eine Wirkstofffreisetzung und dessen Wirkung am vorgesehenen Zielort und nicht im Normalgewebe gewährleistet. Somit könnten unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Als spezifische Liganden stehen eine

Vielzahl von unterschiedlichen Molekülen zur Verfügung. Neben kurzen DNA- oder RNA-Oligonukleotiden (Aptameren <sup>(32)</sup>), Peptiden <sup>(33, 34)</sup> und einer Gruppe von verschiedenen kleinen Molekülen (z. B. Folate <sup>(35)</sup>, Hormone <sup>(36)</sup>) kommen vor allem monoklonale Antikörper zum Einsatz <sup>(37-39)</sup>. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern als targetierende Substanzen hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen <sup>(40)</sup>. Besonders bereits zur Therapie zugelassene Antikörper, wie Rituximab <sup>(41)</sup> (Ziel: CD20; Anwendung: Lymphom; FDA-Zulassung: 1997), Trastuzumab <sup>(41, 42)</sup> (Ziel: HER2/neu-Rezeptor; Anwendung: Brustkrebs; FDA-Zulassung: 1998) oder Cetuximab <sup>(43, 44)</sup> (Ziel: EGFR; Anwendung: Kolorektalkarzinom; FDA-Zulassung: 2004) werden oft als Liganden eingesetzt. Die Wahl des verwendeten Antikörpers richtet sich hierbei nach der Expression von spezifischen Zielstrukturen am vorgesehenen Einsatzort. Meist werden hierbei Zielstrukturen ausgesucht, die sich in der Expression von Normalgewebe unterscheiden und darüber zu einer Selektivität beitragen. Eine vielfach verwendete Struktur stellt der sogenannte epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*; EGF)-Rezeptor (EGFR) dar. Der humane EGFR ist Mitglied der ErbB-Familie, die vier verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen (ErbB-1: EGFR1/HER1; ErbB-2: HER2/neu; ErbB-3: HER3 und ErbB-4: HER4) umfasst <sup>(45, 46)</sup> (Abb. 3).

Es handelt sich bei EGFR/ErbB-1 um ein 1186 Aminosäuren bzw. 170 kDa großes Transmembranprotein bestehend aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Protein-Tyrosinkinase-Domäne. Bis heute konnte eine Vielzahl an Liganden, darunter EGF und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), für EGFR bestimmt werden <sup>(45)</sup>. Eine Bindung von Liganden an die entsprechenden Ligandenbindungsdomänen initiiert die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren innerhalb der ErbB-Familie. Im Anschluss an die Rezeptordimerisierung werden die intrazellulär gelegenen Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Dieser Schritt triggert die Rekrutierung und Aktivierung von nachgeschalteten Proteinen und startet Signalkaskaden, die an vielen regulatorischen Prozessen, wie Zellproliferation, Organentwicklung und Reparatur, beteiligt sind. All den genannten Prozessen kann eine große Bedeutung in der Entwicklung von Tumoren zugeschrieben werden und dies legt eine Verbindung zwischen Tumorentwicklung und Rezeptorvorkommen nahe.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der ErbB-Familie.**

Es existieren vier Mitglieder in der ErbB-Familie. Jeder Rezeptor ist aus drei Komponenten, bestehend aus einer extrazellulären, Transmembran- und intrazellulären Domäne, aufgebaut (modifiziert nach Baslga & Swain<sup>(47)</sup>).

Bereits 1991 beschrieb William J. Gullick<sup>(48)</sup>, dass der EGF-Rezeptor in einer Vielzahl von verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert vorliegt. Eine Überexpression konnte in Kolorektalkrebs, Kopf- und Nackenkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Eierstockkrebs, Brust- und Prostatakrebs, aber auch in Gliomen nachgewiesen werden<sup>(49-51)</sup>. Heute ist bekannt, dass eine aberrante EGFR-Expression und eine damit assoziierte Signalweiterleitung in vielen Tumoren von großer Bedeutung ist. Eine anormale Expression geht hierbei meist mit einer schlechten Prognose für den Therapieverlauf einher. So konnten in Studien Hinweise gefunden werden, die eine Korrelation zwischen EGFR-Expression und erhöhtem Metastasierungsrisiko, verminderter Überlebensrate und Tumorstadium belegen<sup>(52-54)</sup>. Die oben beschriebenen Aspekte ließen den EGFR zu einem interessanten Target für die Tumorthherapie werden. Heute existiert eine Vielzahl von zugelassenen und noch in der Probe befindlichen Substanzen, die selektiv an EGFR binden<sup>(55)</sup>. Hierzu zählt auch der intensiv untersuchte Antikörper Cetuximab (Handelsname Erbitux®). Dieser ist in verschiedenen Ländern (darunter auch Deutschland) zur Behandlung von metastasierendem Kolon/Kolorektalkrebs und Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich zugelassen<sup>(56, 57)</sup>. Cetuximab wird in anbeacht der vorliegenden Erkrankung und/oder des Therapiestatuses entweder als Monotherapie oder in Kombination mit bestimmten Zytostatika (Kolonkarzinom: meist Irinotecan; Plattenepithelkarzinom: Cisplatin oder Carboplatin) verabreicht. Cetuximab ist ein chimärer monoklonaler G1 (IgG1) Antikörper, der den EGF-Rezeptor mit hoher Affinität bindet<sup>(58, 59)</sup>. Der Antikörper unterbindet die Bindung von Liganden und initiiert eine Rezeptorinternalisierung und Degradation. Folglich erfahren die behandelten Zellen eine Herunterregulierung der Oberflächen-EGFR-Expression.

Daneben werden nachgeschaltete Signalkaskaden gehemmt, wodurch Zellzyklus, Angiogenese und zelluläre Invasion (Metastasierung) vermindert werden <sup>(60)</sup>. In unterschiedlichen Studien konnten verschiedene Aspekte der vorliegenden Mechanismen zur Inhibierung des Tumorwachstums bestimmt werden. *In vitro* und *in vivo* hemmt Cetuximab die Zellproliferation und induziert Apoptose. Darüber hinaus ist bekannt, dass Cetuximab eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) vermitteln kann. Die am häufigsten auftretende Nebenwirkung einer Cetuximab-Therapie schlug sich in einem akneartigen Ausschlag nieder, der mit einem Ansprechen auf die Therapie korrelierte <sup>(61)</sup>.

Aus den zuvor erörterten Fakten kann der Nutzen einer Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln mit Cetuximab abgeleitet werden. Da die Bindung von Cetuximab eine Internalisierung des Komplexes bedingt, würden die gebundenen Nanopartikel mit in die Zelle aufgenommen werden und könnten dort einen transportierten Wirkstoff direkt entlassen.

Der Nanotechnologie wird ein großer Nutzen in Bezug auf eine verbesserte Therapie und Lebensqualität zugeschrieben <sup>(62)</sup>. Ferner können neue kostengünstigere Verfahren entwickelt werden, die zu einer positiven wirtschaftlichen Entwicklung beisteuern können. Zurzeit umfasst ein großes Teilgebiet der Nanotechnologie die Erforschung und Entwicklung von nanopartikulären Formulierungen zum Einsatz in der Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen. Im Jahr 2005 starben weltweit 7,6 Mio Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Somit stellt Krebs vor allem in den Industrienationen (Position 2) eine der häufigsten Todesursachen dar. Bis zum Jahr 2011 prognostiziert die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) einen Anstieg der krebsbedingten Sterbefälle auf 11,6 Mio <sup>(63)</sup>. Durch eine Optimierung der Therapie könnten künftig Millionen Menschen gesteigerte Heilungschancen bei größerer Effizienz erfahren und die bei der Therapie anfallenden Kosten drastisch reduziert werden. Für die Therapie von Krebserkrankungen stehen, in Abhängigkeit der individuellen Merkmale (Alter, Vorerkrankungen, Tumorentität, u.v.m.), eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung. Im Allgemeinen umfassen die Behandlungen Operation, Strahlen- oder Chemotherapie, aber auch Hormon- und Photodynamische Therapie. Die Behandlungen können je nach vorliegendem Fall einzeln, aber auch in Kombination zur Behandlung zum Einsatz kommen. Wie bereits erwähnt, können durch den Einsatz von nanopartikulären Formulierungen vor allem Nebenwirkung einer Chemotherapie reduziert werden. Hierbei ist vor allem das Arzneimittel Abraxane<sup>®</sup> zu nennen, das im Jahre 2005 von der FDA (*US Food and Drug Administration*) und 2008 von der EMA (Europäische Arzneimittelagentur) zur Behandlung als Zweittherapie von metastasierendem Mammakarzinom zugelassen wurde. Die durchschnittlich 150 nm großen

Albuminpartikel beinhalten den vielfach applizierten Wirkstoff Paclitaxel (Taxol®). Der ursprünglichen stark lipophilen und dadurch schlecht wasserlöslichen klinischen Formulierung musste zwecks Stabilisierung und Lösungsvermittlung Cremophor® EL und Ethanol zugesetzt werden. Die Zugabe dieser Stoffe führte zu einer weiteren Zunahme der Nebenwirkungen von einer Paclitaxelbehandlung und erforderte eine Begleitmedikation der Patienten. Abraxane zeichnete sich nun gegenüber der ursprünglichen Form durch stark reduzierte Nebenwirkungen, einer erhöhten intratumoralen Wirkstoffkonzentration (um 33 %) sowie reduzierten Applikationszeit und -volumen aus <sup>(64)</sup>. Durch diese Entwicklung konnten Therapie und Applikation von Paclitaxel optimiert werden.

In dieser Arbeit kommen Nanopartikel basierend auf unterschiedlichen Materialien zum Einsatz. Neben Gold wurden auch Partikel auf Basis von humanen Serumalbumin (HSA) und Polymilch-co-glykolsäure (PLGA) entwickelt.

Gold-Nanopartikel (AuNP) kommen in der Chemie schon seit mehreren Jahrzehnten als Katalysatoren zum Einsatz <sup>(65)</sup> und das stetig wachsende Einsatzgebiet umfasst auch die Biologie und Medizin <sup>(10)</sup>. Bereits vor über 150 Jahren beschrieb Michael Faraday den Unterschied zwischen gelösten Goldkolloiden und Gold als Festkörper <sup>(66)</sup>. Heute werden Goldpartikel aufgrund ihrer einstellbaren optischen und elektronischen Eigenschaften als auch wegen der Modifizierbarkeit ihrer Oberfläche für den medizinischen Bereich entwickelt und untersucht. Ihr Einsatz geht dabei über die gängige Verwendung als Kontrastierungsreagenz für die Elektronenmikroskopie hinaus. In vielen Arbeiten konnte die zelluläre Akkumulation von funktionalisierten Partikeln demonstriert werden <sup>(67, 68)</sup>. Diese Entwicklung ermöglicht es, modifizierte Nanopartikel in Biologie und Medizin zu verwenden. Zudem macht diese Entwicklung eine spätere Applikation denkbar. Ein besonderes Interesse liegt hierbei in der Verwendung von AuNP zur hyperthermalen Therapie von Tumoren <sup>(69, 70)</sup>. So wurden Nanopartikel mit einem Antikörper (anti-HER2) versehen, der eine spezifische Aufnahme in HER2-über-exprimierende Zellen ermöglicht <sup>(71)</sup>. Die behandelten Zellen wurden mit einer Lichtfrequenz im nahen Infrarot-Bereich (NIR; 700-1400 nm) bestrahlt, die die zugrunde liegende Oberflächenplasmonresonanz anregte. Die Schwingung führte zum Anstieg der Temperatur und zum Absterben der Zellen. Die Anwendung hat sich heute auf verschiedene zellbiologische Aspekte ausgedehnt und wird weiterhin intensiv erforscht. Vor allem die Toxizität wird von etlichen Forschungsgruppen untersucht <sup>(72, 73)</sup>. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Toxizität von mehreren Faktoren, wie Größe <sup>(73)</sup> und Oberflächenmodifizierung <sup>(74)</sup>, abhängt. Gold-Nanopartikel stellen somit ein interessantes Forschungsgebiet dar, das einer weiteren Untersuchung bedarf.

Humanes Serumalbumin (HSA) ist eines der meist vorkommenden Plasmaproteine im menschlichen Blut. Aufgrund seiner mehrfach demonstrierten Biodegradierbarkeit und Biokompatibilität wurden in der Vergangenheit mehrfach Trägersysteme basierend auf HSA entwickelt und deren Wirksamkeit demonstriert <sup>(39, 75)</sup>. Neben einer bewiesenen Biokompatibilität verfügt HSA über eine hohe Wirkstoffbindungskapazität, über eine Zulassung als Infusionslösung und darüber hinaus über verschiedene Möglichkeiten zur Modifikation. Die synthetisierten und zum Teil oberflächenmodifizierten Albuminpartikel können, nachdem sie in von den Zellen aufgenommen wurden, von diesen abgebaut werden und führen zu keiner weiteren Wechselwirkung mit anderen Geweben. Langer et al. <sup>(7)</sup> untersuchten den Einfluss von verschiedenen Enzymen auf die Degradierung von HSA-Nanopartikeln und schlussfolgerten, dass die zugrunde liegende Kinetik abhängig von den involvierten Enzymen und vom Grad der Partikelquervernetzung ist. Unter neutralen Bedingungen wurden die untersuchten Nanopartikel innerhalb von 24 h durch die Enzyme abgebaut. Nanoskalige HSA-basierte Trägersysteme stellen somit ein etabliertes und bereits gut untersuchtes System dar, das sich durch eine gute zelluläre Akkumulation und Verträglichkeit auszeichnet.

Neben den beschriebenen Albuminpartikeln wurden zuletzt Partikel basierend auf einem bioabbaubaren Polymer entwickelt und untersucht. Zurzeit werden im medizinischen und pharmazeutischen Bereich unter anderem Polyglycolide, Polyorthoester, Polymilchsäure und Polymilch-co-glykolsäure (*poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA) verwendet, die durch Hydrolyse im Organismus zu nicht-toxischen Produkten abgebaut werden <sup>(76)</sup>. Sie kommen hierbei unter anderem als Nahtmaterial oder Gefäßverschluss, als Hilfsmittel für die Blutstillung oder als Depotssystem zum Einsatz. PLGA ist eines der am intensivsten untersuchten Polymere für eine therapeutische Applikation <sup>(77, 78)</sup>. Neben der genannten Biokompatibilität zeichnen sich PLGA-Partikel durch ihre Fähigkeit aus, Wirkstoffe über einen gewissen Zeitraum freizusetzen (*Sustained Release*). Die Polymermatrix übernimmt in diesem System eine Art Schutzfunktion und verhindert eine Degradation des Wirkstoffes. Durch Änderung der Copolymere können die Eigenschaften hinsichtlich der Anforderungen verändert und adaptiert werden. Nach Aufnahme wird PLGA in der Zelle zu Polymilch- und Polyglykolsäure abgebaut <sup>(79)</sup>. Der weitere Abbau von Polymilchsäure verläuft über Milchsäure und diese wird endgültig im Citratzyklus zu Wasser und Kohlendioxid verstoffwechselt. Polyglykolsäure wird zuerst zu Glykolsäure abgebaut, um im weiteren Verlauf zu Glycin metabolisiert zu werden.

## 1.2 Photodynamische Therapie

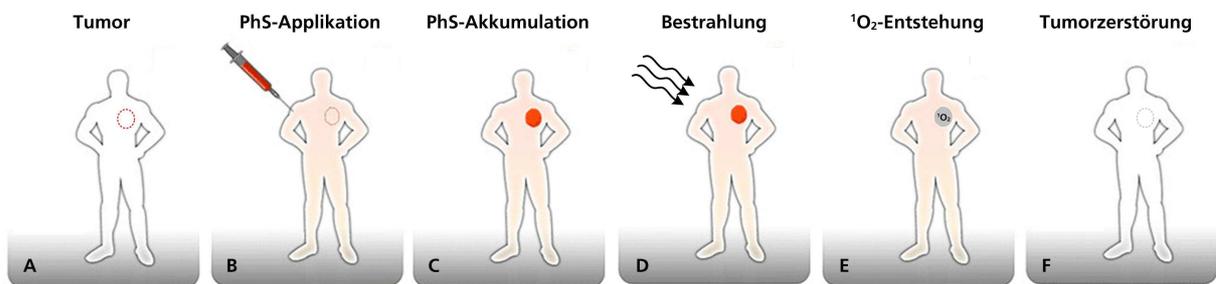
Die Photodynamische Therapie (PDT) beschreibt eine Behandlungsform von meist malignen Erkrankungen. Die Behandlung umfasst die Applikation und Akkumulation eines photoinduzierbaren Arzneistoffs (Photosensibilisator) in dem betroffenen Gewebe. Nach einer ausreichenden Anreicherung erfolgt die Bestrahlung der Zielstruktur und somit die Aktivierung des Photosensibilisators, die zum Tod der Zelle führt.

Die Photodynamische Therapie wird seit mehr als 30 Jahren zur Behandlung von humanen malignen Neoplasien, die eine Resistenz gegenüber anderen Behandlungen aufweisen, eingesetzt <sup>(80)</sup>. Heute kommt die PDT darüber hinaus in einer Vielzahl unterschiedlicher klinischer Applikation zum Einsatz. Hierzu zählen die Behandlungen von unterschiedlichen tumorösen Erkrankungen <sup>(81-84)</sup>, bakteriellen Infektionen <sup>(85-87)</sup>, altersbedingter Maculadegeneration <sup>(88)</sup> („feuchte“ AMD), Hauterkrankungen <sup>(89, 90)</sup> und weiterer klinischer Indikationen wie der rheumatoiden Arthritis <sup>(91)</sup>.

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde der Begriff „Photodynamische Therapie“ von Oscar Raab eingeführt (zitiert aus P. Wolf <sup>(92)</sup> und Kick et al. <sup>(93)</sup>). Dieser beobachtete, dass Pantoffeltierchen in der Anwesenheit von Acridin-Orange und der zusätzlichen Einwirkung von Licht abstarben, die Komponenten allein aber keinen Einfluss auf die Tierchen hatten. Etwa zehn Jahre später erprobte Dr. Friedrich Meyer-Betz (1913) in einem ersten Experiment (Selbstversuch) die Wirkung des Farbstoffs Hämatoporphyrin. Er erlitt in Folge einer bewussten Sonnenaussetzung schwere, aber reversible Schädigungen im Hand- und Gesichtsbereich (zitiert aus Kick et al. <sup>(93)</sup>). Seit diesen anfänglichen Untersuchungen bestand immer reges Interesse in der Untersuchung und Entwicklung von neuen Photosensibilisatoren. 1961 wurde erstmals von Lipson ein Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) synthetisiert und eine selektive Anreicherung in dem Tumorgewebe demonstriert (zitiert aus Hl. Pass <sup>(94)</sup>). Dieses wurde insbesondere von T. J. Dougherty in den folgenden Jahren untersucht und in unterschiedlichen klinischen PDT-Studien an verschiedenen Tumoren eingesetzt <sup>(95)</sup>. Letztendlich wurde mit Photofrin 1993 der erste Photosensibilisator zur Behandlung von Blasenkrebs mit Photodynamischer Therapie in Kanada und kurze Zeit später in Teilen Europas und den USA zugelassen.

Heute existieren neben Photofrin® viele weitere Substanzen, wie z. B. Verteporfin, Temoporfin, die für die PDT verwendet werden können <sup>(96, 97)</sup>. Diese unterscheiden sich von den ursprünglichen Photosensibilisatoren in einer verbesserten Wirksamkeit und stellen meist eine Weiterentwicklung und Optimierung von bereits existierenden Substanzen dar.

Nachdem eine maligne Gewebsveränderung detektiert wurde und die Wahl der Behandlung auf eine Photodynamische Therapie fiel, erfolgt in einem ersten Schritt die Applikation der photosensibilisierenden Substanz (Abb. 4). Diese kann entweder intravenös, lokal oder oral, je nach vorliegender Erkrankung, appliziert werden. Im Anschluss an die Applikation gewährt man dem Photosensibilisator ausreichend Zeit, um sich im Organismus zu verteilen. Während dieser Zeit erfolgt die vorwiegend selektive Akkumulation und Retention des applizierten Photosensibilisators im Tumorgewebe. Nachdem eine ausreichend hohe Konzentration den Tumor infiltrierte, wird die erkrankte Gewebsregion mit Licht einer entsprechenden Wellenlänge bestrahlt. Durch diese Bestrahlung erfolgt die Anregung des Photosensibilisators und daraus resultierend die Entstehung von toxischen Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), der zum Tod der Zelle beiträgt.

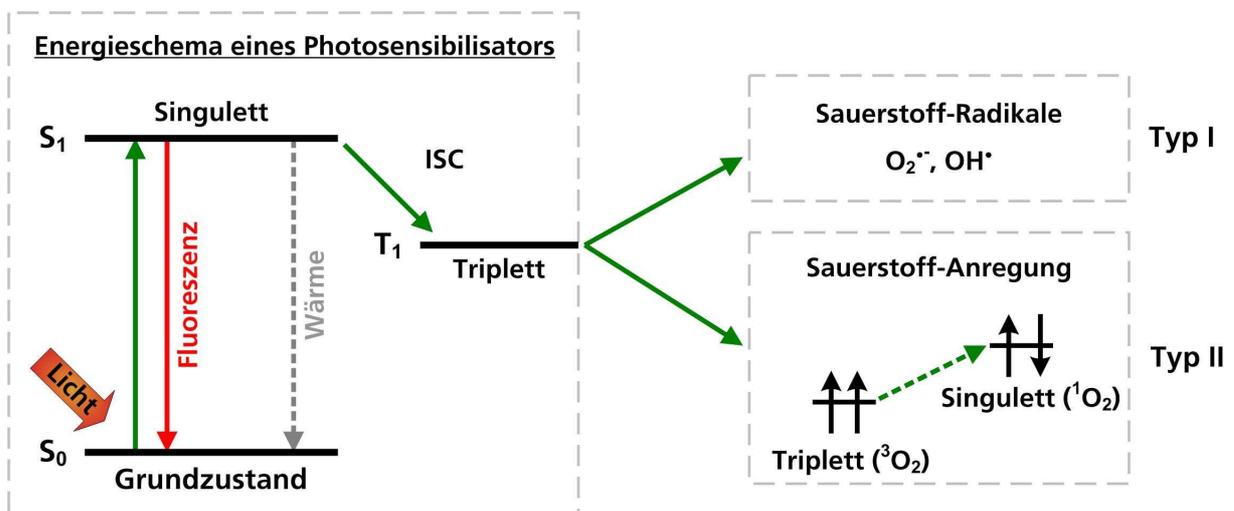


**Abb. 4: Schematische Darstellung einer Photodynamischen Therapie Behandlung.**

Während der PDT wird, nachdem ein Tumor lokalisiert wurde (A), der Photosensibilisator (PhS) appliziert (B) und gewartet, bis sich dieser in ausreichend hoher Konzentration im Zielgewebe angereichert hat (C). Folglich wird der Bereich der malignen Veränderung belichtet (D), es erfolgt die Generierung von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ; E) und der Tumor wird zerstört (F). (in Anlehnung an <sup>(98)</sup>)

Für die Photodynamische Therapie ist neben Licht und dem Photosensibilisator molekularer Sauerstoff im Gewebe essentiell, da die induzierten Effekte auf photooxygenierenden Prozessen (Typ I oder II Reaktion) beruhen (Abb. 5). In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff im Gewebe können beide Prozesse nebeneinander ablaufen und zum Tod der Zelle beitragen. Bevor es jedoch zu diesen Reaktionen kommen kann, muss der Photosensibilisator bzw. die absorbierenden Valenzelektronen mit Licht einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt und angeregt werden. Meist wird auf Licht des roten und nahinfraroten Wellenlängenbereichs ( $> 600 \text{ nm}$ ) zur Bestrahlung zurückgegriffen. Die PDT und deren Tiefenwirksamkeit sind durch eine optische Eindringtiefe des Lichts begrenzt. In der Haut existiert jedoch ein Wellenlängenbereich (650-900 nm), der als optisches Fenster bezeichnet wird, indem die Eigenabsorption durch physiologische Komponenten am geringsten ist und der zur Therapie herangezogen werden kann <sup>(99)</sup>. Wellenlängen, die geringer als 650 nm ausfallen, werden größtenteils durch Hämoglobin absorbiert. Liegt die Wellenlänge über 900 nm erfolgt eine Absorption durch Wasser. Liegt die verwendete Wellenlänge

zwischen diesem Bereich und somit im Bereich des optischen Fensters der Haut, kann es bis in die subkutane Hautschicht eindringen (max. 10 mm) <sup>(100)</sup>. Die Valenzelektronen des Photosensibilisators werden durch die Absorption von Licht von ihrem Grundzustand ( $S_0$ ) auf einen angeregten Zustand ( $S_1$ ) angehoben, der sich auf einem energetisch höheren Niveau befindet. Die angeregten Elektronen können die gewonnene Energie im Anschluss in Form von Fluoreszenz oder Wärme wieder abgeben und ihren Grundzustand einnehmen. Zusätzlich ist ein Übergang in einen Triplettzustand ( $T_1$ ) über das sogenannte *Intersystem crossing* (ISC) möglich. Der Triplettzustand stellt einen essentiellen Faktor für die PDT dar und verfügt im Allgemeinen über eine relative Langlebigkeit.



**Abb. 5: Energieschema zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.**

Durch Lichtabsorption werden die Valenzelektronen der Photosensibilisatoren von einem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Zustand ( $S_1$ ) angehoben. Durch *Intersystem crossing* (ISC) kann der Triplettzustand ( $T_1$ ) erreicht werden, der wiederum mit einem Substratmolekül, unter der finalen Generierung von Superoxidanionen-Radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ) oder Hydroxylradikale ( $OH^{\bullet}$ ), reagieren kann (Typ I). Daneben kann  $T_1$  über eine Typ II Reaktion mit molekularem Sauerstoff ( $^3O_2$ ) reagieren, sodass Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) entsteht (modifiziert nach T. Maisch <sup>(101)</sup>).

Während einer Typ I-Reaktion reagiert der angeregte Photosensibilisator ( $T_1$ ) direkt mit Molekülen (Substrat) in seiner direkten Umgebung. Es erfolgt entweder eine Reaktion mit der direkten Umgebung oder ein Ladungstransfer mit Sauerstoff, wobei Elektronen oder Wasserstoffatome übertragen werden und Radikale, vornehmlich Superoxidanionen-Radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ) oder Hydroxylradikale ( $OH^{\bullet}$ ), entstehen. Diese Radikale können im Folgenden mit Zellkomponenten (z. B. Phospholipide, Cholesterin, ungesättigte Fettsäuren) reagieren, diese oxidieren und zur Zerstörung der Zellstruktur beitragen <sup>(102)</sup>.

Die Typ II-Reaktion führt über einen erlaubten Triplett-Triplett-Energietransfer zur Generierung von hochreaktiven Singulett-Sauerstoff, während der Photosensibilisator wieder seinen Grundzustand einnimmt. Singulett-Sauerstoff ist hierbei durch seine

Kurzlebigkeit, aber auch seine starke Reaktivität (Oxidation) mit umliegenden Zellbestandteilen charakterisiert <sup>(103, 104)</sup>. Für den Erfolg einer PDT-Behandlung ist das Sauerstoffangebot in dem vorliegenden Gewebe maßgebend. Dieses und die Art des Photosensibilisators bestimmen daneben auch, welche Reaktion vorwiegend abläuft.

Die Lebensdauer der entstandenen Sauerstoffspezies (Singulett-Sauerstoff oder Sauerstoffradikale) ist in biologischen Systemen sehr kurz ( $< 0,04$  Mikrosekunden). Es können daher nur sehr kurze Distanzen von  $< 0,02$  mm überwunden werden <sup>(104)</sup>. Die Schädigung in Folge einer PDT-Behandlung tritt demzufolge dort auf, wo sich der Photosensibilisator in ausreichenden Konzentrationen angereichert hat und zudem ausreichend Sauerstoff in den Zellen vorliegt.

Wie zuvor beschrieben, führen die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Zerstörung von bestimmten Zellkomponenten. Hierbei sind die Effekte abhängig davon, welches Substrat oxidiert wurde. Die Oxidation von Enzymen führt zu dem Verlust von deren katalytischen Aktivität. Daneben verlieren Aminosäuren, Nucleinsäuren als auch ungesättigte Fettsäuren in Folge einer Oxidation ihre Struktur und somit auch ihre Funktion. Zellmembranen erleiden durch die Zerstörung ihrer Komponenten (Lipidoxidation) einen Verlust ihrer Integrität. Zudem können sie ihre Permeabilität ändern oder verlieren <sup>(105-107)</sup>. Darüber hinaus wurde von Sies und Menck der Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf die DNA und die Induktion von Strangbrüchen beschrieben <sup>(108)</sup>. Welche Prozesse eingeleitet werden, ist hierbei von dem eingesetzten Photosensibilisator und dessen präferierten Zielstrukturen abhängig. So lagern sich lipophile Photosensibilisatoren wie Hypericin vornehmlich in Membranen an und führen dort zur Lipidoxidation, die eine Schädigung der Zellmembran bis hin zur Ruptur induzieren kann. Intrazellulär können Schädigungen an Membranen der Mitochondrien, der Lysosomen, des Golgi-Apparats, des endoplasmatischen Retikulums sowie des Nucleus beobachtet werden <sup>(109-112)</sup>. Im Bereich der Plasmamembran kommt es wenige Stunden nach Durchführung einer PDT zur Ausbildung von Ausstülpungen (*blebs*). Die Zerstörung der aufgezählten Organellen und zellulären Strukturen konnte mit der Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht werden <sup>(113, 114)</sup>. Geze et al. erörterten den Zusammenhang zwischen einer lysosomalen Anreicherung und erfolgreicher PDT <sup>(115)</sup>. Sie verwiesen auf eine Freisetzung von Hydrolasen und Säuren aus den zerstörten Lysosomen und den Einfluss dieser auf die Degradation (Zytolyse) auf zelluläre Komponenten. Weiterhin wurde die Zerstörung von Mitochondrien durch die Photodynamische Therapie vielfach untersucht. Durch die Aktivierung des Photosensibilisators erfolgt die Initiierung einer Signalkette, die mit dem Zusammenbruch der Elektronentransportkette einhergeht. Ferner kommt es zur Hemmung von mitochondrialen Enzymen, der Destabilisierung der Membran und final zum Anschwellen der Mitochondrien <sup>(116)</sup>. Die Zerstörung der Mitochondrienmembran

bedingt die Freisetzung von apoptose-assoziierten Faktoren (z. B. Cytochrom C) sowie Procaspasen und kann zur Induktion von Apoptose beitragen <sup>(113, 114, 117)</sup>.

Die beschriebenen Effekte finden vornehmlich auf zellulärer Ebene statt. Die Photodynamische Therapie hat jedoch *in vivo* einen großen Einfluss auf das vaskuläre System eines Tumors bzw. des Zielgebiets. Bereits 1984 belegten Daten von Henderson et al., dass eine PDT mit HpD *in vitro* zu einem Absterben von Tumorzellen führt, jedoch eine verstärkte vaskuläre Zerstörung *in vivo* beobachtet werden konnte (zitiert aus T.J. Dougherty <sup>(118)</sup>). *In vivo* wird durch eine PDT nicht nur die Tumorzelle zerstört (direkte Zytotoxizität), sondern auch deren Versorgungssystem, das ein Aushungern des Tumors zur Folge hat (indirekte Zytotoxizität). Dieser synergistische Effekt trägt zum Therapieerfolg einer Behandlung bei. Besonders zu beachten ist ein *Shut-down* der Mikrozirkulation. Eine Behandlung verursacht bereits wenige Minuten nach Durchführung erste lokale Reaktionen im bestrahlten Tumor. Die entstandenen Sauerstoffradikale schwächen hierbei die Barrierefunktion der Endothelzellen. Außerdem werden vasoaktive Mediatoren freigesetzt. Dies induziert eine physiologische Kettenreaktion mit Vasokonstriktion, Thrombosierung und Blutstase <sup>(119, 120)</sup>.

Trotz der Effektivität und der verstärkten Akkumulation von Photosensibilisatoren in verändertem Gewebe treten vielfach Nebenwirkungen nach einer Behandlung auf. Im klinischen Bereich sind hierbei akute (nach Minuten bis Stunden), von subakuten (nach Tagen) und längerfristigen (Wochen bis Monate manifestierend) Reaktionen zu unterscheiden. Zu den akuten Nebenwirkungen zählen Schmerzen im Tumorbereich während der Belichtung <sup>(121)</sup>. Dieser ist abhängig von der Lokalisation des Tumors und der zu bestrahlenden Region. So werden die Behandlungen an der Kopfhaut und im Gesicht sowie an den Handrücken als schmerzhafter empfunden als an anderen Körperstellen. Die Gabe von Analgetika (Paracetamol) oder Opiumderivaten (Tramadol) kann die Schmerzen lindern. Auch Kühlung durch in Lampen eingebaute Ventilatoren wurden als schmerzlindernd bezeichnet. Neben Schmerzen treten ödemartige Rötungen des behandelten Areals auf, die über Tage anhalten können (subakute Nebenwirkung). Im Normalfall heilen diese innerhalb von ein bis drei Wochen ab. Desinfizierende Substanzen können hierbei unterstützend wirken. Eine längerfristige Nebenwirkung tritt gelegentlich in Form von Hyper- oder Hypopigmentierung der behandelten Areale auf. In der Regel gleichen sich diese Areale innerhalb von sechs Monaten wieder dem umliegenden Gewebe an <sup>(122)</sup>. Obwohl Photosensibilisatoren sich vornehmlich in den malignen Veränderungen anreichern (Tumor- Normalgewebe-Verteilung abhängig von eingesetzten Photosensibilisator), tritt ungeachtet des vorliegenden Konzentrationsunterschieds auch eine Schädigung des unmittelbar ans Bestrahlungsfeld angrenzenden Gewebes auf. Eine der häufigsten Nebenwirkungen ist die Photosensibilisierung der Haut. Da im Sonnenlicht auch die Wellenlängen enthalten

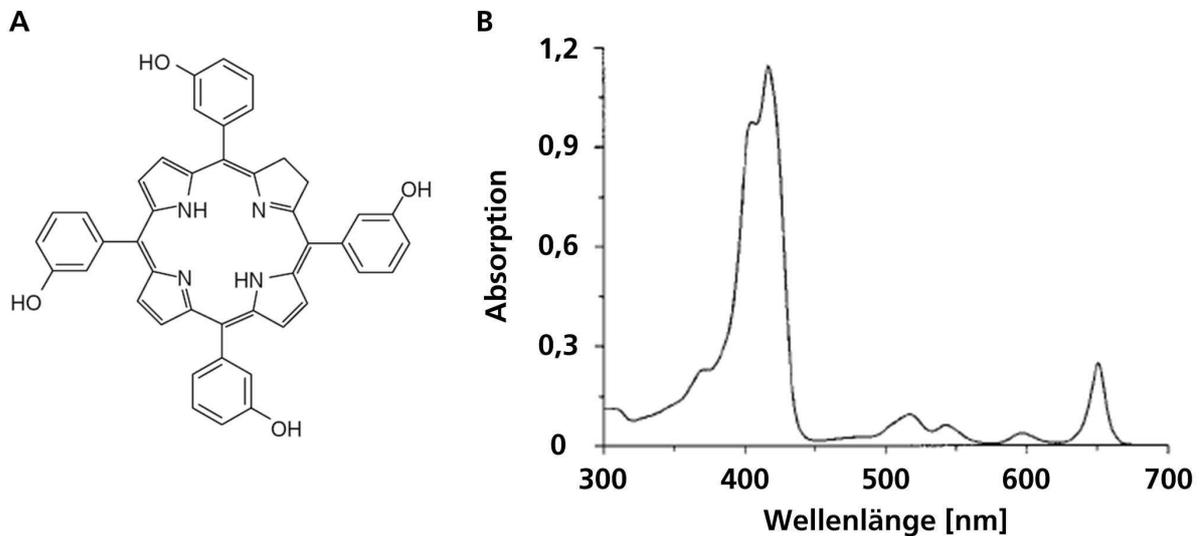
sind, die zu einer Aktivierung des Photosensibilisators führen, werden die Patienten angehalten direktes oder indirektes Licht zu meiden. Eine Belichtung kann zu Ödemen, Hautauschlag (mit Blasenbildung), bis hin zu Hautnekrosen führen. Die Dauer der Überempfindlichkeit der Haut ist zum einen davon abhängig, wie schnell der Photosensibilisator ausgeschieden werden kann und zum anderen, wie hoch die applizierte Konzentration lag. Für Photofrin lagen diese Zeiten bei vier bis 14 Wochen; sie konnte aber durch den Einsatz neu entwickelter Substanzen deutlich reduziert werden (z.B. mTHPC bis 4 Wochen <sup>(123)</sup>).

Die Anforderungen an einen idealen Photosensibilisator haben sich daher im Laufe der Jahre verändert. Die erste Generation (natürliche Hämatoporphyrin-Derivate) zeigte eine gute Aktivität und erfüllte die jeweiligen Aufgabenstellungen. Heute ist die Entwicklung zu neuen und verbesserten Photosensibilisatoren (2. Generation) vorangeschritten. Allison et al. stellten 2004 eine Liste (15 Punkte) aller Anforderungen zusammen, die ein moderner Photosensibilisator für den klinischen Einsatz erfüllen sollte <sup>(124)</sup>. Dieser sollte, um nur einige Aspekte zu nennen, 1) eine konstante Komposition darstellen und keine Mischung aus verschiedenen Substanzen, 2) leicht in der Synthese und Verfügbarkeit sein (Kostensenkung), 3) keine Dunkeltoxizität aufweisen, 4) spezifisch im Zielgewebe akkumulieren, 5) schnell aus dem Körper ausgeschieden werden, 6) photostabil sein, 7) eine Absorption im langwelligen Bereich (> 600 nm) zur optimalen Nutzung des optischen Fensters der Haut besitzen und 8) eine lange Triplettlebenszeit aufweisen, um eine erhöhte ROS-Produktion zu gewährleisten.

Der in dieser Arbeit verwendete Photosensibilisator 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)Chlorin (mTHPC) erfüllt viele der oben beschriebenen Aspekte. mTHPC wurde 1986 von Bonnett und Berenbaum entwickelt und wird heute unter dem Handelsnamen Foscan<sup>®</sup> (Biolitec AG, Jena) für die Photodynamische Therapie verwendet <sup>(125)</sup>. Heute ist Foscan<sup>®</sup> zur palliativen Therapie von Patienten mit vorangeschrittenem Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich (Kopf- und Nackenkrebs) zugelassen <sup>(126)</sup>. Vielfach handelt es sich um Patienten, bei denen eine vorangegangene Therapie fehlgeschlagen ist oder die für eine Strahlentherapie, Chemotherapie oder Resektion nicht geeignet sind.

Es handelt sich bei mTHPC um einen stark hydrophoben Farbstoff, welcher der Gruppe der Chlorine zugeordnet ist (Abb. 6A). Aufgrund seiner starken Hydrophobizität muss der Injektionslösung die Lösungsmittel Ethanol und Propylenglykol zugesetzt werden. Das Absorptionsspektrum von mTHPC ist durch fünf Maxima im sichtbaren Wellenlängenbereich gekennzeichnet (Abb. 6B). Die intensivste Absorption findet bei 415 nm statt und wird als Soret-Bande bezeichnet. Daneben existieren vier weitere Maxima bei 516, 543, 591 und 652 nm (Q-Bande) <sup>(127, 128)</sup>. Da die Eindringtiefe von blauem Licht in

Folge der Absorption von Hämoglobin annähernd null ist, kann ausschließlich die letzte Q-Bande für eine PDT-Behandlung herangezogen werden. Hier ist zwar der Absorptionskoeffizient geringer, aber das verwendete rote Licht kann tiefer in die Haut eindringen und dadurch tiefer liegende Regionen erreichen.



**Abb. 6: Struktur und Absorptionsspektrum von mTHPC.**

A) Struktur von 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)Chlorin (mTHPC). B) Absorptionsspektrum von mTHPC (gelöst in Ethanol; aus Fei Jan & Raoul Kopelman <sup>(129)</sup>)

Neben einer ausgeprägten Absorption zeichnet sich mTHPC durch eine charakteristische Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich aus. Angeregt durch entsprechendes Licht emittiert mTHPC Licht mit einer Wellenlänge von 650 und 714 nm. Diese Erscheinung kann zur Diagnose und späteren gezielten Therapie herangezogen werden <sup>(130)</sup>.

Nach der Applikation unterliegt der Wirkstoff starken dosisabhängigen Schwankungen. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften lagert sich mTHPC im Blut vor allem an die Plasmaproteine an (bis zu 87 % laut Herstellerangaben) und wird so durch den gesamten Organismus transportiert. Erst nach mehreren Stunden steigt der Serumspiegel von mTHPC wieder an und dieses kann seine Wirksamkeit entfalten. Die Spanne zwischen Applikation und Belichtung (*Drug Light Interval, DLI*) ist hierbei von besonderer Bedeutung. Erst wenn eine ausreichend hohe Konzentration des Photosensibilisators im vorgesehenen Gewebe kumuliert ist, kann eine Behandlung durchgeführt werden.

Sobald mTHPC die Zielzellen erreicht, findet gemäß Ma et al. eine lineare Aufnahme in die Zelle statt <sup>(128)</sup>. Dort liegt mTHPC diffus im Zytoplasma vor, ohne in den Zellkern einzudringen <sup>(131, 132)</sup>. Innerhalb der Zelle konnte mTHPC an verschiedenen Organellen nachgewiesen werden. So fand man es in Lysosomen, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und in dem Golgi-Apparat <sup>(111, 131-133)</sup>. Wie zuvor beschrieben, kann die Zerstörung dieser Strukturen zum Tod der Zelle führen. Eine

Schädigung der DNA in Folge einer PDT-Behandlung kann ausgeschlossen werden, da mTHPC erwiesenermaßen nicht in den Zellkern eindringt und der Diffusionsweg von extranukleär generierten Singulett-Sauerstoff in den Zellkern zu groß ist. Auf Gewebeebene reichert sich mTHPC verstärkt in Gefäßwänden und malignen Gewebsveränderungen an <sup>(134)</sup>. Die Anreicherung verläuft meist selektiv, ist jedoch abhängig von der Art des Tumors. In einer klinischen Studie konnte eine bis zu 14-fach erhöhte Photosensibilisatorkonzentration in Tumoren, im Vergleich mit Normalgewebe, bestimmt werden <sup>(100)</sup>.

Obwohl mTHPC viele Eigenschaften eines optimalen Photosensibilisators aufweist, treten während einer Behandlung Nebenwirkungen auf, die vor allem der Struktur und den chemischen Eigenschaften des Photosensibilisators zugeschrieben werden können. Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit muss, wie zuvor beschrieben, der Injektionslösung Ethanol/Propylenglykol zugesetzt werden. Dies kann zur Reizung der Injektionsvene führen und wird als Brennen beschrieben, das sich während oder kurz nach der Applikation ereignet. Daneben präzipitiert der Photosensibilisator an der Injektionsstelle und macht eine langsame Gabe der Infusion erforderlich. Eine häufige Nebenwirkung nach erfolgter mTHPC-PDT ist eine Überempfindlichkeit der Haut. Im Normalfall klingt diese nach zwei bis vier Wochen ab. Im Bereich der Injektionsvene können aber darüber hinaus noch Empfindlichkeiten auftreten, die auf den präzipitierten Photosensibilisator zurückgeführt werden können.

Zur Reduktion von Nebenwirkung bei einer Photodynamischen Therapie und zur selektiveren Akkumulation des Photosensibilisators in den Zielzellen wird seit den letzten Jahren an der Entwicklung von nanopartikulären Trägersystemen für die PDT geforscht <sup>(135, 136)</sup>. Die ersten untersuchten Systeme basierten auf liposomalen Formulierungen. Jori et al. <sup>(137)</sup> untersuchten bereits 1986 die *in vivo* pharmakokinetischen Eigenschaften von liposomal-transportierten HpD gegenüber dem freiem Wirkstoff. Obwohl sich das entwickelte System nur langsam in den Tumoren von MS-2 Fibrosarkom-tragenden Mäusen einlagerte, konnte eine gesteigerte intratumorale Konzentration verglichen mit dem freien Wirkstoff detektiert werden. Im Laufe der Jahre kamen immer mehr neue Trägersysteme hinzu. Heute wird zwischen passiven und aktiven Nanopartikeln unterschieden <sup>(135)</sup>. Die passiven Nanopartikeln fungieren als Trägersystem und vermitteln die Aufnahme in die Zielstruktur. Neben biodegradierbaren Partikeln, basierend auf PLGA und PLA, werden nicht biodegradierbare (z. B. Keramik und Gold) Partikelsysteme in Hinblick auf ihre Effektivität und die Wirkstofffreisetzung untersucht <sup>(138)</sup>. Aktive Nanopartikel sind an den Prozessen einer photodynamischen Behandlung beteiligt. Die Nanopartikel fungieren hierbei selber als Photosensibilisator und geben die eingestrahlte Energie direkt an den umgebenden Sauerstoff ab (z. B. Cadmiumselenid

(CdSe)-Nanopartikel <sup>(139)</sup> oder sie vermitteln eine Energieübertragung auf den transportierten Photosensibilisator. Chen und Zhang (zitiert aus D. Chatterjee <sup>(135)</sup>) beschrieben eine Kombination aus Strahlen- und Photodynamischer Therapie (*Self Lighting Photodynamic Therapy*, „Selbst beleuchtende“ PDT, SLPDT), bei welcher ein Nanopartikel eingehende Röntgenstrahlung aufnimmt und in Form von Lumineszenz an den Photosensibilisator weitergibt. Die Kombination aus beiden Therapieformen ermöglicht die Reduktion der eingesetzten Röntgenstrahlung und den Schutz des umliegenden Gewebes. Weiterhin zählen *upconverting nanoparticles* (UCN) zu der letzten genannten Gruppe von Partikeln. UCN verfügen über die besondere Eigenschaft, energetisch höheres Licht aus energetisch niedrigerer Bestrahlung zu generieren. Diese Energie kann im Anschluss auf einen assoziierten Photosensibilisator übertragen werden und diesen aktivieren <sup>(140)</sup>.

Die Nanotechnologie bietet, wie hier beschrieben, die Möglichkeiten die Nebenwirkungen von Photosensibilisatoren zu reduzieren, indem diese in oder an nanopartikuläre Trägesysteme gebunden werden. Kiesslich et al. <sup>(141)</sup> konnten eine reduzierte Dunkeltoxizität bei gleichbleibender Aktivität von mTHPC in einer gebundenen liposomalen Formulierung (Foslip®) demonstrieren. Weiterhin kann durch den Einsatz von Nanopartikeln eine gerichtete Akkumulation über den EPR-Effekt in tumoröses Gewebe erfolgen und eine Verbesserung der Anreicherung zwischen Tumor- und Normalgewebe hin zum Tumorgewebe erfolgen.

### 1.3 Zielsetzung

Die Ansprüche an moderne Arzneistoffe steigen stetig an. Daher stellt die Weiter- und Neuentwicklung von Wirkstoffen heutzutage ein großes Forschungsgebiet der Pharmaindustrie dar. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen. Die Verwendung von nanoskaligen Trägersystemen hat dabei immer mehr an Bedeutung gewonnen. Nanopartikel schützen den transportierten Wirkstoff vor Degradation, dem Transport in besonderes Gewebe und der dortigen Freisetzung. Sie können durch eine optimierte Bioverfügbarkeit Nebenwirkungen reduzieren und so zu einer Verbesserung der Therapie beitragen. Die Nanotechnologie hat aufgrund der genannten Aspekte auch Zugang zu der Photodynamischen Therapie gefunden. Hier ist die Applikation des gut untersuchten und wirkungsvollen Photosensibilisators mTHPC mit einer Vielzahl von Komplikationen und daraus resultierenden Nebenwirkungen gekennzeichnet. Die Verwendung von Nanopartikeln als Trägersystem für Photosensibilisatoren kann einen entscheidenden Beitrag zur Optimierung von Applikation und Behandlung leisten.

Das Ziel dieser Arbeit war die präklinische Testung von unterschiedlichen nanopartikulären Trägersystemen für den Zelltyp-spezifischen Transport des Photosensibilisators mTHPC in verschiedene Kolonkarzinomzellen.

In einem ersten Schritt sollte die zelluläre Verträglichkeit (Zytotoxizität) der entwickelten Trägersysteme untersucht werden. Die Analysen sollten demzufolge an Nanopartikeln basierend auf Gold (AuNP), humanem Serumalbumin (HSA) sowie Polymilch-co-glykolsäure (PLGA) durchgeführt werden. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sollten als Grundlage für weitere zellbiologische Experimente dienen. Im Anschluss an die Zytotoxizitätstests sollte die zelluläre Akkumulation der unterschiedlichen nanoskaligen Systeme genauer evaluiert werden. Erst wenn eine zelluläre Interaktion nachgewiesen werden konnte, sollte der Wirkstofftransport genauer bestimmt werden. Hierbei sollte neben dem Transport des Wirkstoffes mTHPC durch die unterschiedlichen Formulierungen auch dessen Freisetzung in die untersuchten Zellen analysiert werden. Um die Wirksamkeit von gebundenem bzw. komplexiertem mTHPC in Vergleich mit der freien Substanz bestimmen zu können, sollte die Photozytotoxizität und Dunkeltoxizität sowie die Induktion von Apoptose untersucht werden. Darüber hinaus sollten in ersten Experimenten multizelluläre Tumormodelle (Sphäroid) etabliert werden. Hierbei sollten der Wirkstofftransport und die Wirksamkeit von mTHPC-beladenen Nanopartikeln an einem realistischeren Modell, als dem vorliegenden Monolayer-Zellkulturmodell, bestimmt werden.

Im Anschluss an die Arbeiten mit dem Wirkstoff mTHPC sollte die Zelltyp-spezifische Anreicherung von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln über den Antikörper Cetuximab (anti-EGFR) untersucht werden. Der Antikörper sollte dabei eine Zelltyp-spezifische Akkumulation in Zielzellen ermöglichen. Die zielgerichtete und spezifische Akkumulation der entwickelten Nanopartikel sollte *in vitro* an unterschiedlich EGFR-exprimierenden Zellen bestimmt werden.

Zuletzt sollte eine finale Präparation, die neben dem Antikörper Cetuximab® auch den Photosensibilisator mTHPC tragen sollte, untersucht und deren Wirksamkeit bestimmt werden. Durch die *in vitro* Testung der unterschiedlichen nanopartikulären Systeme sollten die untersuchten Nanopartikel hinsichtlich ihrer Stärken charakterisiert werden. Ziel war es eine Formulierung zu bestimmen, die spezifisch den untersuchten Photosensibilisator in die Zellen transportierte und dort ihre Wirksamkeit entfalten konnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die in den nachfolgend beschriebenen Arbeiten benutzten Chemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad. Alle eingesetzten Materialien für das Arbeiten mit Zellkulturen waren vom Hersteller steril verpackt oder durch Autoklavieren sterilisiert worden.

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

##### Materialien

µ-Dishes (Petrischalen)  
 Aluminiumfolie  
 Aspirationspipetten  
 Ausgussform zum Einmalgebrauch  
 Deckgläser  
 Einmal-Pasteurpipetten  
 Einmalpipetten (2/ 5/ 10 & 25 ml)  
 Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5/1,5 & 2 ml)  
 FACS-Röhrchen  
 Glasobjektträger mit Kammern (2/ 4 & 8)  
 Glaswaren  
 Hi-Q<sup>4</sup> Petrischalen  
 Kanülen  
 Kryo-Röhrchen (2 ml)  
 Küvetten, UVette 220-1600 nm  
 Lochplatten (6/ 12/ 24 & 96)  
 Objektträger (silanisiert)  
 Pap-Pen (Fettstift)  
 Parafilm  
  
 Petrischalen (2,5 & 10 cm)  
 Pipetten  
 Plastikpetrischalen  
 Reagenz-Reservoir  
 Reagenzreservoir (50 ml)  
 Spritzen (verschiedene Größen)  
 Sterilfilter (0,2 µm, Polyethersulfon)  
 Zellkulturgefäße (T25, T75 & T175)  
 Zentrifugenröhrchen (15 & 50 ml)

##### Hersteller

Ibidi, München  
 VWR International GmbH, Darmstadt  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 VWR International, Darmstadt  
 Marienfeld, Lauda-Königshofen  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Becton Dickinson, Heidelberg  
 Becton Dickinson, Heidelberg  
 Schott, Mainz  
 Ibidi, München  
 B. Braun, Melsungen  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Marienfeld, Lauda-Königshofen  
 VWR International, Darmstadt  
 American National Can. Co., Chicago (USA.)  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 VWR International, Darmstadt  
 VWR International, Darmstadt  
 B. Braun, Melsungen  
 VWR International, Darmstadt  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen

##### Geräte

Analysenwaage, CP64  
 Begasungsbrutschrank, BBD6220  
 BioStation IM<sub>Q</sub>  
 Critical Point Drying Apparatus CPD 7501  
 Durchflusszytometer, FACS Calibur  
 F-4500 Fluoreszenz Spektrophotometer  
 Feststellknopf mit Skala  
 Fireboy  
 Gefriermikrotom, CM3050  
 Gefrierschrank (-20 °C)

##### Hersteller

Sartorius, Göppingen  
 Thermo Scientific, Langenselbold  
 Nikon, Tokyo (Japan)  
 Quorum Technologies, Guelph (Kanada)  
 Becton Dickinson, Heidelberg  
 Hitachi, Tokyo (Japan)  
 Conrad Electronic, Wernberg-Köblitz  
 Integra Biosciences, Fernwald  
 Leica Microsystems, Nussloch  
 Liebherr, Biberach a. d. Ri ss

Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
High-Power LED (1 W, rot, LXHL-ND94)	Luxeon Star (Quadica Developments Inc.), Ontario (Canada)
Horizontales Elektrophorese-System Midi easy cast	PeqLab, Erlangen
Kryo-Einfriergeräte (Mr. Frosty)	VWR Internationale, Darmstadt
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Lambda 950 UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Laserstrahl- & Spektralmessgerät (LaserCheck™)	CVI+Melles Griot, Bensheim
LED-Konverter (Dimmbar, für High-Power LEDs)	Lumotech, Heerhugowaard (The Netherlands)
LSM510-Meta-NLO	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Mikroskop CKX 31, inverses Durchlicht-Mikroskop mit Phasenkontrastfilter	Olympus, Hamburg
Mikroskop IX70, inverses Durchlicht-Mikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter & SIS CC12	Olympus, Hamburg
CLR Farbkamera	
Mikrowelle, MW 723	Ciatronic, Kempen
MTS 4 Mikrotiterplattenschüttler	IKA®-Werke, Staufen
PCR Thermoblock UNO II	Biometra, Göttingen
Powermeter	Coherent, Santa Clara (USA)
Präzisions-Potentiometer POT1 100K TYP 249	Conrad Electronic, Wernberg-Köblitz
Rasterelektronenmikroskop LEO 435 VP	LEO Elektronenmikroskope GmbH, Oberkochen
Schüttel-/Mischgerät, REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach
SMD-Kühlkörper	Conrad Electronic, Wernberg-Köblitz
Spannungsquelle, PP 3000	Biometra, Göttingen
Spektrometer, SpectraFluor	Tecan, Crailsheim
Sputter-Coater 108 auto	Cressington, Watford (UK)
Thermocycler, UNO II	Biometra, München
Thermomixer, Compact 5350	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80 °C), HFU 486 HERA freeze	Thermo Scientific, Langenselbold
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zellzahlbestimmung, CASY-TT	Innovatis, Reutlingen
Zentrifuge, Biofuge Pico	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge, Biofuge R	Thermo Scientific, Langenselbold

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

### Chemikalien/Reagenzien

Aceton  
 Agarose  
 APOPercentage Apoptose Assay  
 BSA, Fraktion V  
 CASYton  
 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)  
 Cell Proliferation Reagent WST-1  
 Cytotoxicity Detection Kit (LDH)  
 DAPI-Reagenz  
 DMEM/F-12  
 DMSO  
 Einbettmedium für Gefrierschnitte  
 Eindeckmedium mit und ohne DAPI  
 Ethanol (absolut)  
 FACS-Flow, -Clean, -Rinse  
 Fluoresceindiacetat (FDA)  
 Fötale Kälberserum (FKS)

### Hersteller

Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
 Peqlab, Erlangen  
 Biocolor, Carrickfergus (UK)  
 PAA, Marburg  
 Innovatis, Reutlingen  
 Roche Diagnostics, Mannheim  
 Roche Diagnostics, Mannheim  
 Roche Diagnostics, Mannheim  
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
 Jung (Leica instruments GmbH), Nussloch  
 Vectashield Vecta Lab., Burlingame (USA)  
 Merck, Darmstadt  
 Becton Dickinson, Heidelberg  
 Sigma-Aldrich, Steinheim  
 PAA, Marburg

Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Hexamethyldisilazan (HMDS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HyClone Wasser in Molekularbiologie-Qualität	Thermo Scientific, Langenselbold
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Leitsilber	Plano GmbH, Wetzlar
LookOut <sup>®</sup> Mycoplasma PCR Detection Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
McCoys 5 A	PromoCell, Heidelberg
Methanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Natrium-Cacodylat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Osmiumtetroxid	Plano, Wetzlar
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penizillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phospahtpuffer (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-HEMA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure (2 N)	VWR Internationale, Darmstadt
Stiftprobenteller	Plano, Wetzlar
Tanninsäure	Plano, Wetzlar
Taq Polymerase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Uranylacetat	Plano, Wetzlar
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %)	Merck, Darmstadt
Ziegensesrum	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.3 Medien, Lösungen und Antikörper

#### **Zellkulturmedien**

HT29-Medium:	McCoys 5A Medium	
	FKS	10 %
	Streptomycin	50 µg/ml
	Penizillin	50 U/ml
DiFi-Medium:	DMEM/F-12 Medium ohne L-Glutamin	
	FKS	10 %
	Streptomycin	50 µg/ml
	Penizillin	50 U/ml
Einfriermedium:	DMSO	10 %
	FKS	90 %

#### **Lösungen**

Fixator-Lösung:	Glutaraldehyd	1,8 %
	Na-Cacodylatpuffer	0,1 M
	in PBS gelöst; pH 7,4	
Osmiumtetroxid-Lösung:	Osmiumtetroxid	2 %
	Cacodylatpuffer	0,15 M
Tanninsäure-Lösung:	Tanninsäure	1 %
	in destilliertem Wasser, sterilfiltriert	

Uranylacetat-Lösung:	Uranylacetat	1 %
	in destilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert	
FACS-Fix:	Paraformaldehyd	1 %
	Natriumchlorid	0,85 %
	in PBS gelöst; pH 7,4	
Block-Lösung I:	Ziegenerum	10 %
	BSA	1 %
	in PBS gelöst; pH 7,4	
Block-Lösung II:	Ziegenerum	5 %
	Triton X-100	0,3 %
	in PBS gelöst; pH 7,4	
Antikörper-Lösung:	BSA	10 %
	Triton X-100	0,3 %
	in PBS gelöst; pH 7,4	

## Antikörper

Tab. 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Wirt	Konjugation	Hersteller
Cetuximab <sup>®</sup>	Human/Maus	keine	Merck, Darmstadt
Anti-Human Sekundärantikörper	Ziege	Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-PARP <sub>cleaved</sub>	Kaninchen	keine	Cellsignaling, Danvers (USA)
Anti-Kaninchen Sekundärantikörper	Ziege	Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Isotyp-Kontrolle (IgG)	Human	keine	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Laser sowie Emissionsfilter zur Detektion von Fluorochromen und Nanopartikeln.

Probe/Fluorochrom	Anregung	Emissionsfilter
DAPI	Titan:Saphir: 780 nm	390-465 nm BP
Alexa Fluor 350	Titan:Saphir: 780 nm	390-465 nm BP
Alexa Fluor 488	Argon-Ionen: 488 nm	500-550 nm BP
Alexa Fluor Tetramethylrhodamine	Helium-Neon: 543 nm	560 nm LP
Lumogen Yellow <sup>®</sup>	Argon-Ionen: 488 nm	500-550 nm BP
HSA-Nanopartikel	Argon-Ionen: 488 nm	500-550 nm BP
mTHPC	Argon-Ionen: 488 nm	650-710 nm BP
Propidiumiodid (PI)	Argon-Ionen: 514 nm	560 nm LP
Fluoresceindiacetat (FDA)	Argon-Ionen: 488 nm	500-550 nm BP

BP: Bandpassfilter LP: Langpassfilter

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter aseptischen Bedingungen, um Kontaminationen durch Bakterien, Pilze und sonstige Mikroorganismen zu vermeiden. Die eingesetzten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Mykoplasmen-Kontamination hin untersucht.

#### **2.2.1.1 Kultivierung von humanen Kolonkarzinom-Zellen**

Für alle Untersuchungen wurden die humanen Kolonkarzinomzelllinien DiFi (ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel) und HT29 (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kerstin David, Indivumed, Hamburg) verwendet. Die Kultivierung von DiFi-Zellen erfolgte bei 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. HT29-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relative Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Das Medium der Zellen wurde dreimal pro Woche unter sterilen Bedingungen gewechselt. Hierzu wurden die Flaschen unter der Sterilbank geöffnet und das Medium mittels einer sterilen Einmalaspirationspipette am Rand der Flasche entfernt. Anschließend wurde vorsichtig vorgewärmtes (37 °C) frisches Medium am Rand der Flasche den Zellen zugegeben.

#### **2.2.1.2 Passagieren von adhärennten Zellen**

Die Zellen wurden einmal pro Woche zwecks Subkultivierung bzw. nach Erreichen der Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das vorliegende Medium mittels einer sterilen Einmalaspirationspipette am Rand der Flasche entfernt. Anschließend wurde der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen, bevor Trypsin/EDTA (1x) auf den Zellrasen gegeben und für ca. 5 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nach einem kräftigen Schlag („Shake-Off“) gegen den Flaschenrand wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und der Ablösevorgang verfolgt. Zum Abstoppen des enzymatischen Verdaus wurde frisches Kulturmedium zugegeben und die Zellen vom Flaschenboden gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 rpm und RT sedimentiert. Nach Verwerfung des Überstandes und Resuspendierung in einem entsprechenden Volumen Kulturmedium erfolgte die Verteilung von Zellsuspensionsaliquoten auf bereits vorbereitete Zellkulturgefäße.

#### **2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden unter leichtem Schwenken in einem 37 °C vorgewärmten Wasserbad rasch aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 1.000 rpm und RT pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in

eine Kulturflasche mit ausreichend Zellkulturmedium überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um eventuell vorliegende DMSO-Reste sowie Zelldebris zu entfernen. Zwecks einer möglichen Dauerkultivierung und Langzeitlagerung von Zellen erfolgte die Ablösung mittels Trypsin/EDTA vom Zellboden. Nach erfolgter Trypsinierung wurde die Zellzahl mittels eines Zellzählgerätes (CASY TT) bestimmt und die gewünschte Zellzahl in einem Zentrifugenröhrchen pelletiert. Der Überstand konnte verworfen und die sedimentierten Zellen in einem angemessenem Volumen eiskaltem Einfriermedium aufgenommen werden. Die jeweiligen Volumina wurden in bereits vorbereitete Kryoröhrchen verteilt, in eine mit Isopropanol gefüllte Box (Kryo-Einfriergerät, Mr. Frosty) gestellt und für mindestens 4 h bei -80 °C gelagert. Die endgültige Lagerung erfolgte im Anschluss in flüssigem Stickstoff.

#### **2.2.1.4 Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird ein Elektronenstrahl über eine Probe geleitet (gerastert). Dies ermöglicht die Generierung von Bildern mit sehr hoher Auflösung, bedingt durch die hohe Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe. Aufgrund der geringen Beschleunigungsspannung dringen die Elektronen nicht tief (im Vergleich zu TEM) in die zu untersuchende Probe ein. Die rückgestreuten Elektronen können zur Bildgebung genutzt werden. Die am häufigsten auftretenden Sekundärelektronen (SE) weisen nur eine geringe Energie auf und können die Probenoberfläche nur im geringen Maße verlassen (10-100 nm). Sie eignen sich daher zur Erstellung von topografischen Abbildungen. Die Rückstreuelektronen (RE) werden mit einem nur geringen Energieverlust von der Probe zurückgestreut und können daher noch in relativ großen Tiefen generiert werden. Die resultierenden Bilder weisen eine geringe Auflösung auf, eignen sich jedoch zur Darstellung von Materialeigenschaften. Die Streuung ist hierbei von der Ordnungszahl der Probe abhängig, wobei schwere Elemente stärker streuen und als helle Bereiche in den Analysen auftreten. Biologische Proben weisen überwiegend Atome niedriger Ordnungszahl (C, H, N, O) auf und stellen aufgrund ihrer Beschaffenheit schlechte elektrische Leiter dar. Die Proben müssen daher einer speziellen Schwermetallkontrastierung unterzogen werden, um einen stärkeren Kontrast zu erhalten.

Für REM-Aufnahmen wurden jeweils 250.000 Zellen in 2,5 cm Petrischalen ( $\mu$ -Dishes) für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Die Bodenstärke der  $\mu$ -Dishes entsprach der Dicke eines Deckglases und ermöglichte die spätere Herauslösung der kontrastierten Zellen aus der Schale. Nach Erlangung einer adäquaten Konfluenz wurden die Zellen 2x mit 1 ml PBS gewaschen, mittels Fixator-Lösung bei 4 °C fixiert und bis zur weiteren Präparation in Fixator-Lösung bei 4 °C gelagert. Zu Beginn der Präparation wurden die

Proben 3x mit 0,15 M Cacodylatpuffer gewaschen. Alle anschließenden Kontrastierungsfärbungen mussten unter Lichtausschluss und, aufgrund der Toxizität der verwendeten Reagenzien, unter einem Abzug durchgeführt werden. Die Proben wurden anfänglich 1 h mit einer 2 % Osmiumtetroxid-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen, bis sich eine klare Lösung ergab. Nach einer 1-stündigen Inkubation mit 1 % Tanninsäure-Lösung, gefolgt von mehreren Waschschritten mit dest. Wasser, folgte eine 20-minütige Behandlung mit 1 % Uranylacetat-Lösung. Die Proben wurden zuletzt mehrfach mit dest. Wasser gewaschen und bis zur weiteren Präparation in Wasser bei 4 °C gelagert. Zur weiteren Probenvorbereitung und zur Erhaltung der zellulären Oberflächenstrukturen wurden die Proben einer kritischen-Punkt-Trocknung (*critical point drying*, CPD) unterzogen. Hierzu wurden die Proben schrittweise mittels einer Ethanolreihe (30, 50, 70, 80, 90 und 100 %) entwässert. Die Proben wurden jeweils 15 min mit einer ansteigenden Alkoholkonzentrationen bei RT inkubiert und es wurde darauf geachtet ein Austrocknen der Proben zu vermeiden. Im letzten Schritt wurde reines Ethanol durch 100 % Aceton ersetzt. Die finale Trocknung der Proben sowie die Befreiung von Aceton erfolgten im Anschluss mittels CPD. Hierbei wurde Aceton durch flüssiges CO<sub>2</sub> ersetzt. Durch Erhöhung der Kammertemperatur kam es zu einem Anstieg des Kammerinnendrucks. Bei Erreichung des kritischen Punkts geht CO<sub>2</sub> ohne Phasengrenze in die Gasform über und infiltriert die komplette Probe. Zum Schluss wurde das gasförmige CO<sub>2</sub> langsam aus der Proben-Druckkammer abgelassen, um eine Rekondensation der Probe zu vermeiden. Die getrockneten Proben wurden auf REM-Träger aufgeklebt und Leitsilber wurde zur Signalweiterleitung aufgetragen. Anschließend wurden die Proben mit Gold bedampft und mittels eines Rasterelektronenmikroskops (LEO 435 VP) untersucht. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Rainer Lilischkis an der Fachhochschule Kaiserslautern (Standort Zweibrücken, Mikrosystemtechnik & Applied Life Science).

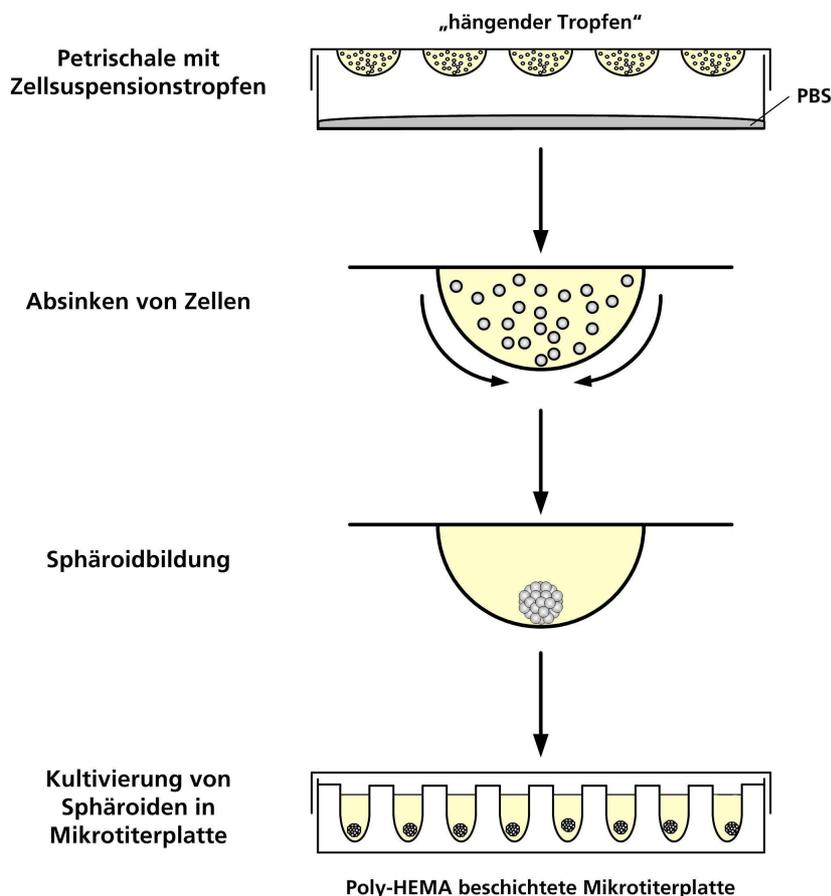
### **2.2.1.5 3D-Tumormodell (Sphäroid): Sphäroidherstellung**

#### ***Poly-HEMA Beschichtung***

Für die Oberflächenbeschichtung von 96-Lochplatten (für Suspensionszellen) wurde eine 2 %ige Poly-HEMA (Poly(2-hydroxyethylmethacrylat)) Lösung in einem Gemisch aus Aceton und Ethanol (50:50) angesetzt. Je 100 µl der Poly-HEMA-Lösung wurden in die einzelnen Kavitäten überführt und dort für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Platten über Nacht bei RT getrocknet. Der entstandene feste Poly-HEMA-Film verhinderte im Folgenden die Anhaftung von Zellen. Die einzelnen Platten wurden 2x mit sterilem PBS gewaschen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **Sphäroidherstellung mittels „Hanging Drop“-Technik**

Zur Herstellung von 3D-Aggregaten bzw. Tumorsphäroiden aus HT29 wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde auf 250.000 Zellen pro ml Zellkulturmedium eingestellt. Anschließend wurden 20 µl Tropfen auf den umgedrehten Deckel einer 100 mm Petrischale in ausreichend großen Abstand aufgetragen und der Deckel kopfüber auf eine mit PBS befüllte Schale gelegt (Abb. 7). Durch Adhäsionskräfte blieben die Tropfen an dem Deckel haften und liefen nicht zusammen. Die Inkubation erfolgte bei Standardbedingungen für zwei Tage. Während dieser Zeit agglomerierten die Zellen und bildeten Sphäroide. Nach zwei Tagen in der „Hanging Drop“-Kultur wurden die Sphäroide einzeln in 96-Lochplatten (Poly-HEMA beschichtet) überführt, mit neuem Medium versehen und bis zum Versuch bei Standardbedingungen kultiviert. Die mittlere Größe der Sphäroide wurde alle sieben Tage für insgesamt 21 Tage bestimmt.



**Abb. 7: Modell zur Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden mittels „Hanging Drop“-Technik.**

Die vereinzelt Zellen werden in kleinen Tropfen in den Deckel einer Petrischale gegeben. Die Zellen sinken ab und bilden ein Zellaggregat (Sphäroid). Zur weiteren Kultivierung werden die Sphäroide in geeignete Poly-HEMA-beschichtete Mikrotiterplatten überführt.

### **REM-Präparation von 3D-Sphäroiden**

Die Sphäroide wurden 2x mit PBS gewaschen und in Zellkultureinsätze (Transwell) überführt. Zur Erhaltung und Visualisierung der zellulären Strukturen wurden die Sphäroide einer Fixierung und Schwermetallkontrastierung, wie bereits für Zellmonolayer beschrieben (Punkt 2.2.1.4), unterzogen. Anstelle einer CPD wurden die Sphäroide unter Verwendung von Hexamethyldisilazan (HMDS) getrocknet. Durch seinen geringen Dampfdruck verdampft das infiltrierte HMDS so langsam, dass keine das Gewebe schädigenden Oberflächenspannungen entstehen und die Oberflächenstrukturen erhalten bleiben. Die Proben wurden entsprechend mittels einer Ethanolreihe (30, 50, 70, 80, 90, 96 und 100 %) entwässert. Alle Entwässerungsschritte wurden unter leichtem Schwenken auf Eis durchgeführt. In einem letzten Schritt wurde Ethanol (100 %) durch 100 % HMDS ersetzt. Die HMDS-bedeckten Proben wurden unter einem Abzug über Nacht zum Abdampfen belassen. Am nächsten Tag wurden die Sphäroide in neue Zellkultureinsätze überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei Raumtemperatur gelagert.

### **Vitalitätstest (Lebend-Tot-Färbung)**

Der FDA/PI-Vitalitätstest, auch Lebend-Tot-Färbung genannt, ermöglicht die Identifizierung und Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Die Sphäroide wurden hierzu mit einer Vitalitätstest-Lösung (Fluoresceindiacetat, FDA: 30 µg/ml; Propidiumiodid, PI: 40 µg/ml) für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die 3D-Aggregate 2x mit PBS gewaschen und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das lipidlösliche FDA, ein nicht-fluoreszierendes Molekül, wird im Zytoplasma lebender Zellen durch Esterasen in den grün fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein gespalten. Dieser ist nicht-lipidlöslich und reichert sich somit ausschließlich im Zytoplasma vitaler Zellen an. Propidiumiodid, ein Nukleinsäureinterkalator, kann hingegen die intakte Zellmembran nicht durchqueren. In Folge von Zelltod kann der Farbstoff die perforierte Zellmembran durchdringen und sich in die DNA einlagern. Lebende Zellen erschienen daher grün und konnten von toten Zellen, die eine rote Fluoreszenz aufwiesen, unterschieden werden.

### **Anfertigung von Gefrierschnitten**

Von den Sphäroiden wurden, zwecks einer verbesserten Dokumentation, Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden von Frau Judith Bungert angefertigt. Hierzu wurden die eingefrorenen Sphäroid-Proben auf einem gekühlten Probenträger angebracht. Im Anschluss wurden mittels eines Gefriermikrotoms 7 µm dicke Schnitte angefertigt, diese auf silanisierten Objektträgern (Marienfeld) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.2.2 Herstellung und Charakterisierung von Nanopartikeln

Die Herstellung und Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel, erfolgte durch Nico Reum (Gold-Nanopartikel; Universität des Saarlandes), Thomas Knobloch (PLGA-Nanopartikel) und Matthias Wacker (HSA-Nanopartikel). Herr Knobloch und Herr Wacker arbeiteten im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Langer; ehemals Institut für Pharmazeutische Technologie-Goethe-Universität Frankfurt am Main, jetzt Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie-Westfälischen Wilhelms- Universität Münster.

Die verwendeten Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer Größe, Gehalt, Polydispersität sowie einer eventuellen Beladung oder Oberflächenmodifizierung untersucht. Alle Nanopartikel wurden unter sterilen Bedingungen generiert und konnten somit für Zellkulturarbeiten verwendet werden.

### 2.2.2.1 Nanopartikel basierend auf Gold

#### ***Nanopartikelherstellung und Charakterisierung***

Die Synthese von unmodifizierten Gold-Nanopartikeln (AuNP) erfolgte durch Reduktion von Tetrachlorgoldsäure mit Natriumcitrat in wässriger Lösung<sup>(142, 143)</sup>. Hierzu wurde eine Lösung bestehend aus Tetrachlorgoldsäure-Trihydrat zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde eine wässrige Trinatriumcitrat-Dihydrat-Lösung im Schuss zum Ansatz gegeben und 20 min unter starkem Rühren in der Siedehitze gehalten. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur (RT) wurde die Partikelgröße mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt.

#### ***Oberflächenmodifizierung mittels „Layer-by-layer“-Technik***

Die Oberfläche der Gold-Nanopartikel wurde mit einer leicht abgewandelten Layer-by-layer Technik (LbL-Technik; in Anlehnung an Decher<sup>(144)</sup> und Krol<sup>(145)</sup>) modifiziert, die die elektrostatische Anziehung von geladenen Polymeren (Polyelektrolyten; positiv geladenes PAH: Polyallylamin-Hydrochlorid; negativ geladenes PSS: Polystyrolsulfonat) an die Oberfläche von AuNP nutzt. Die modifizierten Nanopartikel wiesen eine äußere PSS-Schicht auf und wurden für die folgenden Zytotoxizitätstests verwendet. Die Einführung und Komplexierung des Photosensibilisators mTHPC auf die Oberfläche von AuNPs wurde ebenfalls unter Verwendung der LbL-Technik verwirklicht. Hierzu erfolgte die Anlagerung von PAH- und PSS/mTHPC-Schichten auf die citratstabilisierten Nanopartikel<sup>(146)</sup>. Als abschließende Hüllschicht wurde einfaches PSS verwendet. Die synthetisierten Nanopartikel wurden im Folgenden hinsichtlich ihrer Größe, Beladung und dem Zetapotential, als Indiz für die äußere Schicht, untersucht.

### **2.2.2.2 Nanopartikel basierend auf humanen Serumalbumin (HSA)**

#### ***Nanopartikelherstellung und Charakterisierung***

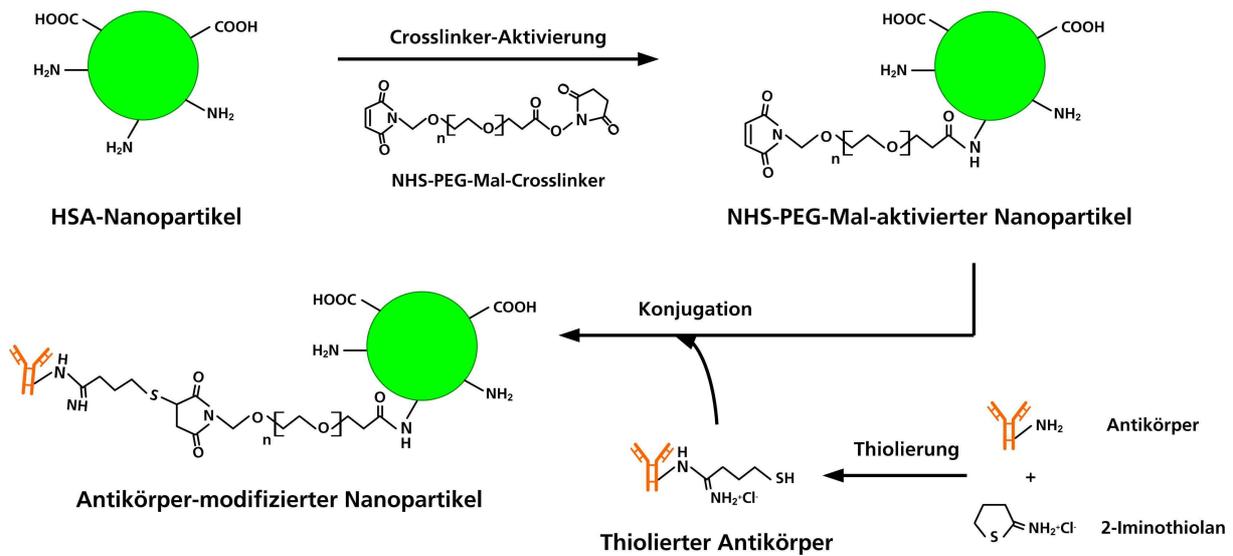
Die Synthese von unmodifizierten HSA-Nanopartikel erfolgte gemäß einer bekannten Desolvationstechnik <sup>(147-149)</sup>. Hierzu wurde humanes Serumalbumin (HSA) in Natriumchlorid gelöst, die Lösung filtriert und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Anschließend wurden der Lösung, unter ständigem Rühren auf einer Magnetrührplatte, tropfenweise Ethanol zugesetzt. Dies führte zur Entstehung von instabilen Kolloiden. Durch Zugabe von Glutaraldehyd wurden die instabilen Kolloide quervernetzt und es bildeten sich stabile Nanopartikel. Die Suspension wurde zwecks Stabilisierung 1 h gerührt und im Anschluss aufgereinigt. Anschließend wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) die hydrodynamische Partikelgröße sowie die Größenverteilung (Polydispersität) der Nanopartikel ermittelt. Die Bestimmung der Partikelkonzentration erfolgte via Mikrogravimetrie.

#### ***Kovalente Bindung von mTHPC an HSA-Nanopartikel***

Die kovalente Anbindung des Photosensitizers mTHPC an die HSA-Nanopartikeloberfläche erfolgte über zwei Reaktionen. In einem ersten Schritt wurden die Partikel, wie bereits beschrieben, über Desolvation hergestellt. Anschließend erfolgte die kovalente Anbindung von mTHPC (gelöst in Hydroethanol) unter Verwendung von 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid (EDC). Die Bestimmung der gebundenen mTHPC-Menge erfolgte photometrisch nach Verdau der synthetisierten Nanopartikel.

#### ***Spezifische Oberflächenmodifizierung von HSA-Nanopartikeln***

Für eine spezifische Oberflächenmodifizierung von HSA-Nanopartikeln mit dem monoklonalen Antikörper (AK) Cetuximab<sup>®</sup> wurde sowohl die Nanopartikeloberfläche als auch der verwendete AK in einem ersten Schritt gemäß eines etablierten Protokolls <sup>(75, 150)</sup> aktiviert (Abb. 8). Hierzu wurde für die Nanopartikel der heterobifunktionale NHS-PEG5000-Mal Crosslinker verwendet. Die Aktivierung der Antikörper erfolgte über eine Thiolierung mittels 2-Iminothiolan (Trauts-Reagenz). Nach erfolgreicher Aktivierung wurde der thiolierte Antikörper über eine Konjugationsreaktion kovalent an die aktivierte Nanopartikeloberfläche gebunden (HSA-Cetuximab-Nanopartikel). Neben der Generierung von spezifischen HSA-Cetuximab-Nanopartikeln wurden unspezifische Kontrollnanopartikel hergestellt. Hierzu wurde zum einen ein unspezifischer IgG-Antikörper (HSA-IgG-Nanopartikel) verwendet. Dieser wurde ebenfalls unter Verwendung von 2-Iminothiolan thioliert und an die aktivierten Nanopartikel kovalent gebunden. Die Bestimmung von gebundenem Antikörper (IgG oder Cetuximab) erfolgte indirekt mittels Gelpermeationschromatographie (GPC). Dazu wurde im Überstand der Anteil von nicht-gebundenem Antikörper ermittelt und der gebundene Antikörper indirekt bestimmt.



**Abb. 8: Oberflächenmodifizierung von HSA-Nanopartikeln.**

Stabilisierte HSA-Nanopartikel wurden mittels verschiedener Crosslinker aktiviert. Thiolierte Antikörper konnten anschließend über eine Konjugationsreaktion an NHS-PEG-Mal-aktivierte Nanopartikel gebunden werden.

### ***Antikörper-modifizierte und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel***

Die Generierung von oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen Nanopartikeln erfolgte über einen zwei Schritte beinhaltenden Syntheseweg. Zuerst wurden die mTHPC-beladenen Nanopartikel, wie zuvor beschrieben, über eine kovalente Anbindung des Photosensibilisators an die HSA-Nanopartikel hergestellt. Im Anschluss wurden diese über einen Crosslinker aktiviert und mit dem thiolierten Antikörper inkubiert. Die spätere Charakterisierung erfolgte über die bereits beschriebenen Methoden.

#### **2.2.2.3 Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)**

##### ***Nanopartikelherstellung und Charakterisierung***

Die Synthese von unmodifizierten PLGA-Nanopartikel erfolgte mittels einer Emulsions-Diffusions-Evaporations-Technik <sup>(78, 151)</sup>. Hierzu wurde das PLGA-Polymer (Resomer® RG 502H; Boehringer) in Ethylacetat, einem organischen und mit Wasser in Teilen mischbaren Lösungsmittel, gelöst. Die organische Phase wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax in eine wässrige Phase (PVA-Lösung) emulgiert. Anschließend wurden der entstandenen Emulsion unter Rühren weitere PVA-Lösung zugesetzt. Die PVA-Zugabe unterstützte die Diffusion des flüchtigen, organischen Lösungsmittels Ethylacetat in die wässrige externe Phase und bedingte, aufgrund der Wasserunlöslichkeit des Polymers, die Generierung von PLGA-Nanopartikeln. Die Nanopartikel-haltige Suspension wurde weitere 12 h bei RT gerührt, um verbleibendes Ethylacetat aus der Probe abzdampfen. Die resultierende Nanopartikelsuspension wurde durch Zentrifugation, Verwerfen des

Überstandes und anschließend Resuspendieren in MilliQ-Wasser unter zur Hilfenahme von Ultraschall aufgereinigt. Anschließend wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) die hydrodynamische Partikelgröße sowie die Größenverteilung (Polydispersität) der Nanopartikel ermittelt. Die Bestimmung der Partikelkonzentration erfolgte via Mikrogravimetrie.

### ***Inkorporation von mTHPC in PLGA-Nanopartikel***

mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel wurden ebenfalls über die Emulsions-Diffusions-Evaporations-Technik synthetisiert. PLGA und mTHPC wurden hierzu in Ethylacetat gelöst und mit der wässrigen Phase mittels Ultra-Turrax emulgiert. Die Nanopartikelherstellung erfolgte analog zu den unbeladenen Partikeln. Die Entfernung von adsorptiv gebundenem mTHPC auf der Partikeloberfläche erfolgte durch zusätzliche Waschschriffe mit PVA-Lösung. Im Anschluss erfolgte analog zu der Beschreibung von unbeladenen Partikeln eine Aufreinigung.

### ***Spezifische Oberflächenmodifizierung von PLGA-Nanopartikeln***

Die Generierung von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln erfolgte über eine Modifizierung von unbeladenen PLGA-Nanopartikeln. Zuerst wurden die Nanopartikel über die zuvor beschriebene Emulsions-Diffusions-Evaporations-Technik synthetisiert. Nach Aufreinigung und Einführung einer Aminogruppen über eine Carbodiimidreaktion wurde die Modifizierung der Oberfläche analog zu den HSA-Nanopartikeln durchgeführt. Die spätere Charakterisierung erfolgte über die bereits beschriebenen Methoden.

## **2.2.3 Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften von Nanopartikeln**

Zur Evaluierung von zytotoxischen Ereignissen, induziert durch die Zugabe von Nanopartikeln basierend auf unterschiedlichen Materialien, wurden Standardzytotoxizitätstests durchgeführt. Die Durchführung der einzelnen Tests erfolgte in unabhängigen Triplikaten unter der Verwendung von drei internen Kontrollen (drei Kavitäten pro Ansatz pro Platte).

Untersuchte Proben:

- Gold-Nanopartikel: 0, 1, 10, 50 und 100 µg/ml; 4, 24, 48 und 72 h
- HSA-Nanopartikel: 0, 1, 10 und 100 µg/ml; Wasserkontrolle; 24, 48 und 72 h
- PLGA-Nanopartikel: 0, 1, 10 und 100 µg/ml; Wasserkontrolle; 24, 48 und 72 h

### **2.2.3.1 Bestimmung der Zellviabilität (WST-1-Assay)**

Die Bestimmung der Zellviabilität nach erfolgter Inkubation mit den zu testenden nanopartikulären Formulierungen erfolgte mittels des WST-1-Assays (*Cell proliferation reagent* WST-1, Roche). Es handelt sich hierbei um die kolorimetrische Bestimmung der

Aktivität des Enzyms mitochondriale Dehydrogenase (MDH). In aktiven Zellen wird das Tetrazoliumsalz WST-1 ((4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzendisulfonat) durch die aktiven intramitochondrialen Dehydrogenasen zu einem farbigen Formazan abgebaut. Hierbei sind das gebildete Formazan und dessen Farbintensität direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Für den Test wurden 10.000 HT29-Zellen gelöst in 100 µl Zellkulturmedium in 96-Lochplatten ausgesät und für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und durch 100 µl Nanopartikel-haltiges Medium (1-100 µg/ml) ersetzt und für weitere 4 bis 72 h (entsprechend Versuchansatz) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1x mit Medium gewaschen und 10 µl des Farbreagens WST-1 verdünnt in 100 µl Zellkulturmedium zu den Zellen pipettiert. Die Absorption wurde alle 30 min für maximal 4 h mittels eines Photometers (450 nm; Referenz: 690 nm) gemessen. Als Kontrollen dienten Zellen inkubiert mit Zellkulturmedium (Positivkontrolle) bzw. 2 % Triton X-100 gelöst in Medium (Negativkontrolle). Die ermittelte MDH-Aktivität der Kontrollzellen wurde auf 100 % und alle Messwerte in Relation hierzu gesetzt:

$$\text{MDH-Aktivität [\%]} = (\text{Messwert Probe} / \text{Messwert Positivkontrolle}) \times 100$$

### 2.2.3.2 Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Assay)

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mittels eines kolorimetrischen Immunoassays (*Cell Proliferation ELISA*, BrdU (colorimetric), Roche), basierend auf dem Nachweis von inkorporierten 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin während der DNA-Neusynthese. Dieses kann nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen durch einen geeigneten Peroxidase-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper gebunden und detektiert werden. In einer anschließenden Enzym-Substrat-Reaktion erfolgte die Umsetzung des Substrates (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zu einem blau gefärbten Reaktionsprodukt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption mittels eines Photometers bei 450 nm (Referenz: 690 nm) gemessen.

Für den Test wurden 10.000 HT29-Zellen gelöst in 100 µl Zellkulturmedium in 96-Lochplatten ausgesät und für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und durch 100 µl Nanopartikel-haltiges Medium (1-100 µg/ml) ersetzt und für weitere 4 bis 72 h (entsprechend Versuchansatz) inkubiert. Nach einem weiteren Mediumwechsel erfolgte die Zugabe von 10 µM BrdU für 2 h. Nach dem BrdU-Einbau durch proliferierende Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und es folgte die Fixierung und Permeabilisierung durch Zugabe einer Fixierungs/Denaturierungslösung (FixDenat-Lösung) für 30 min bei RT. Im Anschluss wurde die anti-BrdU Antikörperlösung zugegeben. Vor Zugabe des Substrats wurden die Zellen 3x mit Waschpuffer

gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. 100 µl Substratlösung wurden zugegeben und die Platte 5 min bei 500 rpm leicht geschüttelt, bis ein blauer Farbumschlag zu verzeichnen war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die ermittelte BrdU-Inkorporation der Kontrollzellen (Positivkontrolle) wurde als 100 % und alle Messwerte in Relation dazu gesetzt. 2 % Triton-X 100 behandelte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet und unbehandelte Zellen dienten als Positivkontrolle:

$$\text{BrdU-Inkorporation [\%]} = (\text{Messwert Probe} / \text{Messwert Positivkontrolle}) \times 100$$

### 2.2.3.3 Bestimmung der Membranintegrität (LDH-Assay)

Neben der Bestimmung der Zellviabilität wurde der Einfluss von Nanopartikel auf die Zellmembran bzw. deren Membranintegrität untersucht. Hierzu wurde der sensitive Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Assay (*Cytotoxicity Detection Kit* (LDH), Roche) durchgeführt. Der LDH-Test basiert auf der Detektion des zytosolischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand, das nur aus beschädigten oder gar zerstörten Zellen freigesetzt werden kann. Durch LDH wird die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, unter gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , vermittelt. In einem zweiten enzymatischen Schritt (Diaphorase) wird das Proton von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  auf das Tetrazoliumsalz INT übertragen, das dadurch zu Formazan reduziert wird und seine Farbe wechselt. Je toxischer eine Substanz wirkt, desto größer ist die LDH-Freisetzung und umso intensiver der Farbumschlag. Dieser Farbumschlag kann im Anschluss mittels eines Photometers (490 nm; Referenz: 620 nm) gemessen werden.

Für den Test wurden 10.000 HT29-Zellen gelöst in 100 µl Zellkulturmedium in 96-Lochplatten ausgesät und für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und durch 100 µl Nanopartikel-haltiges Medium (1-100 µg/ml) ersetzt und für weitere 4 bis 72 h (entsprechend Versuchansatz) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen inkubiert in Zellkulturmedium. Mit 2 % Triton X-100 Lösung lysierte Zellen dienten als Positivkontrolle. Nach erfolgter Inkubation wurden 100 µl Zellkulturüberstand in eine neue 96-Lochplatte überführt und mit weiteren 100 µl der Katalysator-/Färbelösung versetzt. Der Ansatz wurde mittels eines Mikrotiterplattenschüttlers gemischt und abgedunkelt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels eines Mikrotiterplatten-Readers bei 490 nm. Die LDH-Freisetzung ergibt sich als Quotient wie folgt aus.

$$\text{LDH-Freisetzung [\%]} = (\text{Messwert Probe} / \text{Messwert Positivkontrolle}) \times 100$$

## 2.2.4 Zelluläre Akkumulation von Nanopartikeln

Die Untersuchung der zellulären Akkumulation der verschiedenen Nanopartikel erfolgte über verschiedene Analysewege. HSA- und PLGA-Nanopartikel konnten aufgrund einer vorliegenden Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-abhängigen Methoden untersucht werden. Die Untersuchung von Gold-Nanopartikeln erfolgte über Hellfeldmikroskopie, REM sowie Multiphotonen-basierter Raster-Lasermikroskopie (MP-LSM).

### 2.2.4.1 Hellfeldmikroskopie

Die Akkumulation von Gold-Nanopartikeln (AuNP) auf HT29-Zellen wurde beginnend mittels Hellfeldmikroskopie visualisiert, da die agglomerierten Nanopartikel eine Rotfärbung aufwiesen und somit detektiert werden konnten. HT29-Zellen (125.000) wurden hierzu in 24-Lochplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an AuNP (1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) für 24, 48 und 72 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und untersucht.

### 2.2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

AuNP eigneten sich aufgrund der sehr gut leitenden Eigenschaften hervorragend für diese Untersuchungen. Für die REM-Aufnahmen wurden 250.000 HT29-Zellen in 2,5 cm Petrischalen ( $\mu$ -Dishes) für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert und im Anschluss mit Gold-Nanopartikeln (100  $\mu\text{g/ml}$ ) für maximal 72 h inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen 2x mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend bei 4 °C fixiert. Die weitere Präparation erfolgte, wie unter Punkt 2.2.1.4 beschrieben.

### 2.2.4.3 Multiphotonen-basierte Raster-Lasermikroskopie (*multiphoton-based laser scanning microscope; MP-LSM*)

Die intrazelluläre Akkumulation von Gold-Nanopartikeln konnte mittels einer Kombination aus konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM; siehe 2.2.4.5) sowie MP-LSM untersucht werden. Die Untersuchung basiert auf der Möglichkeit, kolloidales Gold mittels Multiphotonenanregung zu visualisieren <sup>(152, 153)</sup>

125.000 HT29-Zellen wurden in FKS-beschichteten (2 h, 37 °C) 2-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und für 24 h mit Gold-Nanopartikeln (100  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Nachdem die Zellen gewaschen und die Zellmembran mit einem Concanavalin A-Derivat (Alexa Fluor 488-gekoppelt; 50  $\mu\text{g/ml}$ ) gefärbt wurde, erfolgte die Fixierung (0,4 % PFA; 7 min) und die Einbettung mit Vectashield HardSet Mounting Medium. Die Analyse wurde mittels eines konfokalen Raster-Lasermikroskops (Axiovert 200 M Mikroskop mit einer 510 NLO Meta Einheit, Zeiss, Jena, Germany) mit einem Argon-Ionen- und Chameleon-Laser (generiert fs-Laserpulse mit einer Wiederholungsrate von 80 MHz bei einer Wellenlänge  $\lambda = 820 \text{ nm}$  zur AuNP Exzitation) und der *LSM Image Examiner* Software durchgeführt.

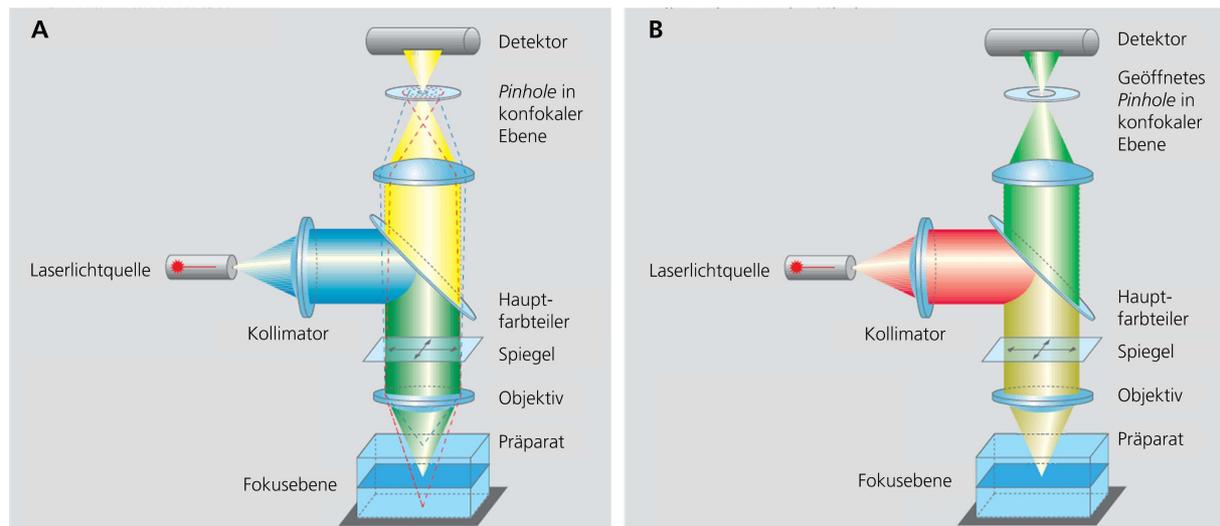
#### **2.2.4.4 Durchflusszytometrie**

Die zelluläre Bindung von Polymer-basierten-Nanopartikeln (HSA- und PLGA-Nanopartikel) wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Diese beruht auf der Emission von optischen Signalen induziert durch eine Laserquelle. In Suspension befindliche Zellen werden hierbei durch eine Kapillare geleitet und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die resultierenden Signale werden in einem Sensormodul detektiert und an einen Computer übermittelt. In dieser Arbeit wurden die durchflusszytometrischen Versuche an einem FACS Calibur durchgeführt, das die Detektion von vier unterschiedlichen Fluoreszenzbereichen unter Verwendung von zwei separaten Laserquellen ermöglicht.

Entsprechend wurden 250.000 HT29-Zellen in 24-Lochplatten kultiviert und mit unbeladenen Nanopartikeln (0,1 mg/ml) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Nach zwei Waschschrritten mit PBS erfolgte die Fixierung mit FACS-Fix. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden im Folgendem 10.000 Zellen pro Probe gezählt und mit Hilfe der Software *CellQuest Pro* ausgewertet. Für die Detektion der Nanopartikel konnte die herstellungsbedingte grüne Autofluoreszenz der HSA-Nanopartikel bzw. die Fluoreszenz des in die PLGA-Matrix inkorporierten Lumogen Yellow® verwendet werden.

#### **2.2.4.5 Konfokale Raster-Lasermikroskopie (*confocal laser scanning microscopy, CLSM*)**

Die intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung von HSA- und PLGA-Nanopartikeln wurde mit Hilfe der konfokalen Raster-Lasermikroskopie (*confocal laser scanning microscopy, CLSM*) ermittelt. Hierbei wird eine Probe von einem Laserstrahl (Dauerstrichlaser) punktwise abgerastert, wobei der Laser mittels beweglicher Spiegel über das Präparat geleitet wird und in der Fokusebene der Probe maximal fokussiert ist (Abb. 9A). Die im Fokus befindlichen Fluoreszenzmoleküle emittieren Photonen, die über dasselbe Objektiv (konfokales Prinzip) eingefangen werden. Im Anschluss treffen die Photonen nach Durchquerung eines Strahlteilers und fokussierender Linsen auf einen Detektor. Um zu verhindern, dass Signale aus Ebenen ober- und unterhalb der Fokusebene detektiert werden, wird eine angepasste Lochblende (Pinhole) dem Detektor vorgesetzt. Die Verwendung von gepulsten Lasern (Puls laser) ermöglicht die Anregung der Probe ausschließlich in der Fokusebene und benötigt daher keine Lochblende (Abb. 9B).



**Abb. 9: Messaufbau eines konfokalen Laser-Rastermikroskops.**

Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Dauerstrich- (A) und PulsLasers (B) in einem konfokalen Mikroskop. Der Laser wird über Spiegel auf das Präparat gelenkt. Die emittierenden Photonen gelangen über dasselbe Objektiv und Spiegel auf einen Detektor, dem im Falle des Dauerstrichlasers eine Lochblende vorgeschaltet ist (modifiziert gemäß Zeiss.de <sup>(154)</sup>).

Für die Untersuchungen wurde ein LSM510-Meta-NLO mit verschiedenen Lasern (Tab. 3) sowie einem 20x Neoplan Fluor Objektiv bzw. einem Plan-Neofluar 40x/1.3 Ölimmersionsobjektiv verwendet.

**Tab. 3: Spezifizierung der verwendeten Laser**

Lasertyp	Wellenlänge	
Titan-Saphir	Puls laser	720-930 nm
Argon-Ionen	Dauerstrich laser	458, 477, 488, 514 nm
Helium-Neon	Dauerstrich laser	543 nm

HT29-Zellen wurden auf FKS-beschichteten (2 h, 37 °C) Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit unbeladenen Nanopartikeln (0,1 mg/ml) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Nanopartikel-haltige Überstand entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und die Zellmembran mit einem fluoreszenzmarkierten Membranfarbstoff (Concanavalin A Alexa Fluor 350; 50 µg/ml) für 2 min gefärbt. Nach weiteren Waschschrinen mit PBS erfolgte die Fixierung mit 0,4 % PFA für 7 min bei RT. Die Proben wurden anschließend in Vectashield-HardSet-Mounting-Medium eingebettet und die Ränder nach dessen Aushärtung mit Nagellack verschlossen. Für die Detektion der Nanopartikel konnte die herstellungsbedingte grüne Autofluoreszenz der HSA-Nanopartikel bzw. die Fluoreszenz des in die PLGA-Matrix inkorporierten Lumogen Yellow® verwendet werden.

Die CLSM-Aufnahmen wurden im Folgenden einer Bearbeitung unterzogen, um eine möglichst genaue Abbildung der Ergebnisse zu erhalten. Hierzu wurden alle Aufnahmen einer Versuchsreihe (inklusive aller Kontrollen) mit der *LSM Image Examiner* Software (Zeiss) geöffnet. An einer Aufnahme, bei der die vorliegenden Intensitäten besonders gering ausfielen, wurden die Helligkeit (H) und der Kontrast (K) exemplarisch eingestellt. Die veränderten Werte wurden notiert und die folgenden Abbildungen mit den neuen entsprechenden Einstellungen versehen. Die bearbeiteten Bilder wurden als Tiff-Dateien gespeichert und mit der Software *MS Visio* gruppiert und beschriftet. Die Bildzusammenstellung wurde als Tiff mit einer Auflösung von 300 x 300 dpi gespeichert und in die Arbeit eingefügt. Die veränderten Parameter innerhalb einer Auswertung werden in der Bildunterschrift bei der entsprechenden Fluoreszenz aufgeführt.

### **2.2.5 Zelluläre Akkumulation des Photosensibilisators mTHPC**

Der in dieser Arbeit verwendete Photosensibilisator mTHPC wurde von der Firma Biolitec (Jena) zur Verfügung gestellt. Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten mit mTHPC sowie der mTHPC-beladenen nanopartikulären Formulierungen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben nach Beginn und Beendigung der Inkubationen keinem direkten Licht oder anderen Lichtquellen ausgesetzt wurden.

#### ***Zeitabhängige zelluläre Bindung***

Die zeitabhängige zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Jeweils 250.000 HT29-Zellen wurden in 2,5 cm Petrischalen kultiviert und mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1 µg/ml) für 5, 10, 15, 30, 60, 120 und 240 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufbereitung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt. Für die Detektion des Photosensibilisators mTHPC konnte die rote Autofluoreszenz genutzt werden.

#### ***Konzentrationsabhängige zelluläre Bindung***

Die konzentrationsabhängige zelluläre Bindung wurde ebenfalls mit Hilfe der Durchflusszytometrie evaluiert. 250.000 HT29-Zellen wurden hierzu in 24-Lochplatten kultiviert und mit ansteigenden Konzentrationen mTHPC (0/0,1/0,125/0,25/0,5/1/3/5 und 10 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufbereitung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt.

#### ***Intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung***

Die intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung von freiem mTHPC wurde mit Hilfe der konfokalen Raster-Lasermikroskopie (CLSM) ermittelt. Hierfür wurden

HT29-Zellen auf FKS-beschichtete Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit ansteigenden Konzentrationen mTHPC (0,1-10 µg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufbereitung und konfokale Raster-Lasermikroskopie wurde, wie unter Punkt 2.2.4.5 beschrieben, durchgeführt. Die rote Eigenfluoreszenz von mTHPC konnte für die Detektion verwendet werden.

## **2.2.6 mTHPC-beladene Nanopartikel**

### **2.2.6.1 Bestimmung der Absorptionsspektren**

Die Bestimmung der Absorptionsspektren von freiem und gebundenem mTHPC erfolgte mit Hilfe eines UV/Vis/NIR-Absorptionsspektrometers (200 – 3.300 nm). Die Formulierungen (mTHPC-Konzentration: 0,5 µg/ml) wurden hierzu in Ethanol (freies mTHPC) sowie Wasser (nanopartikuläre Formulierung) gelöst und die Absorption zwischen 350 und 750 nm aufgenommen.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSAmTHPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGAmTHPC)

### **2.2.6.2 Zelluläre Anreicherung**

Die Aufnahme bzw. zelluläre Anreicherung von freiem mTHPC und den nanopartikulären Formulierungen wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzspektrometers durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 1, 4 und 24 h mit einer eingesetzten Photosensibilisator-Konzentration von 1 µg/ml (freies und gebundenes mTHPC). Die Zellen wurden im Anschluss mehrfach gewaschen, geerntet und pelletiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden zum Zellaufschluss über Nacht bei -20 °C eingefroren. Zum Schluss wurde der Photosensibilisator in 1 ml Ethanol eluiert und im Ultraschallbad resuspendiert (5 min). Zum Entfernen restlicher Zellfragmente erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10.000 rpm, 5 min) und der Überstand wurde vermessen (Excitation: 488 ± 5 nm; Emission: 652 ± 10 nm). Für die Bestimmung der Konzentration wurde mit Hilfe von verschiedenen konzentrierten mTHPC-Lösungen (1, 10 und 100 µg/ml, in EtOH) eine Eichgerade erstellt, mittels derer die jeweilige Probenkonzentration bestimmt werden konnte.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSAmTHPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGAmTHPC)

### **2.2.6.3 Zelluläre Bindung**

Die zelluläre Bindung von mTHPC-beladenen Nanopartikeln wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. 250.000 HT29-Zellen wurden in 24-Lochplatten kultiviert und mit ansteigenden Nanopartikelkonzentrationen (entsprechend ansteigenden mTHPC-Konzentrationen: 0,1-10 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufbereitung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSA<sub>m</sub>THPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGA<sub>m</sub>THPC)

### **2.2.6.4 Intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung**

Die intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung von mTHPC-beladenen Nanopartikeln wurde mit Hilfe der konfokalen Raster-Lasermikroskopie (CLSM) bzw. in Kombination mit MP-LSM (für Gold-Nanopartikel) ermittelt. Hierfür wurden HT29-Zellen auf FKS-beschichtete Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit der nanopartikulären Formulierung (HSA- und PLGA-Nanopartikel; entsprechend einer mTHPC-Konzentrationen von 1 µg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die eingesetzte mTHPC-Konzentration betrug bei AuNP 3 bzw. 9 µg/ml und die Inkubationszeit 24 h. Die anschließende Aufbereitung und CLSM-Analysen wurden, wie unter Punkt 2.2.4.3 sowie 2.2.4.5 beschrieben, durchgeführt.

Untersuchte Proben:

- mTHPC-beladene Gold-Nanopartikel (AuNP<sub>m</sub>THPC)
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSA<sub>m</sub>THPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (mit Lumogen Yellow®; PLGA<sub>m</sub>THPC)

## **2.2.7 Bestimmung der Photozytotoxizität**

Im Folgenden wurde von freiem mTHPC und den neu entwickelten nanopartikulären Systemen die induzierte Phototoxizität bzw. Photozytotoxizität untersucht. Die eingesetzten Volumina bezogen sich auf die eingesetzte Photosensibilisator-Konzentration.

### **2.2.7.1 Entwicklung einer Bestrahlungseinheit**

Zur Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität des Photosensibilisators mTHPC sowie der neu entwickelten nanopartikulären Systeme musste zuvor eine Bestrahlungseinheit konzipiert und erstellt werden (Abb. 10).



**Abb. 10: Aufbau der Bestrahlungseinheit zur Bestrahlung von Proben.**

Während einer PDT-Behandlung wurden die Proben mit einer Bestrahlungseinheit beleuchtet. Diese bestand aus sechs 1 W starken roten LEDs (Luxeon) (A). Durch einen justierbaren Adapter (verschiedene Modelle einsetzbar) wurden die Proben gehalten. Die Beleuchtung (B) konnte folglich unter Ausschluss von Sonnenlicht (C) durchgeführt werden.

Ziel war die Erstellung einer Einheit, die die gleichmäßige Beleuchtung der Proben mit einer konstanten Leistung bei gleich bleibender Wellenlänge gewährleistet. Als Strahlungsquelle wurden 1 W starke rote LEDs (Luxeon) verwendet. Diese wurden in Reihe geschaltet und mit einer Stromquelle verbunden. Weiterhin wurde eine Dimmerfunktion integriert und die Kühlung der LEDs durch die Verwendung eines adäquaten Kühlers gewährleistet. Mit Hilfe eines tragbaren Laserstrahl- und Spektralmessgeräts (LaserCheck™) konnte vor jedem Versuch die vorliegende Lichtleistung (W oder mW) bestimmt und die benötigte Zeit (t, sec) zur Erreichung der entsprechenden Bestrahlungsdosis (J) ermittelt werden.

$$\text{Bestrahlungsdosis [J]} = \text{Leistung [W]} \times \text{Zeit [t]}$$

Neben den illuminierten Proben wurden Photosensibilisator-behandelte, jedoch nicht bestrahlte Proben mituntersucht. Diese gaben Auskunft über eine eventuell vorliegende Dunkeltoxizität des eingesetzten Photosensibilisators bzw. des eingesetzten Systems.

### 2.2.7.2 Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität

Sowohl die Photo- als auch eine eventuell vorliegende Dunkeltoxizität, von freiem als auch nanopartikulär gebundenem mTHPC, wurden mit Hilfe von Standardzytotoxizitätstests evaluiert. Untersucht wurden mTHPC-behandelte und illuminierte sowie mTHPC-behandelte, jedoch nicht bestrahlte Zellen hinsichtlich der vorliegenden Zellviabilität (WST-1-Assay, siehe Punkt 2.2.3.1), Zellproliferation (BrdU-Assay, siehe Punkt 2.2.3.2) und Membranintegrität (LDH-Assay, siehe Punkt 2.2.3.3). Für die Tests wurden jeweils 10.000 HT29-Zellen gelöst in 100 µl in 96-Lochplatten ausgesät und für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und mit ansteigenden Nanopartikel-Konzentrationen (entsprechend einer ansteigenden mTHPC-Konzentration von 0,1-10 µg/ml) für weitere 1, 4 oder 24 h inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte als auch mit Lösungsmittel (Wasser; bezogen auf Nanopartikel-Solvent) behandelte Zellen sowie Zellen, die mittels einer 2 % Triton X-100 Lösung

lysiert wurden. Nach erfolgter Inkubation wurde bei den Platten zur Bestimmung der Zellviabilität und –proliferation ein Mediumwechsel durchgeführt und je eine Platte beleuchtet (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und die zweite als Dunkelkontrolle im Dunkeln bewahrt. Die Platten zur Bestimmung der Membranintegrität wurden ohne vorherigen Mediumwechsel illuminiert bzw. als Dunkelkontrolle gelagert. Die Assays wurden im Folgenden, wie bereits beschrieben, durchgeführt und sowohl die Photo- als auch die Dunkeltoxizität bestimmt.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSA<sub>m</sub>THPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGA<sub>m</sub>THPC)

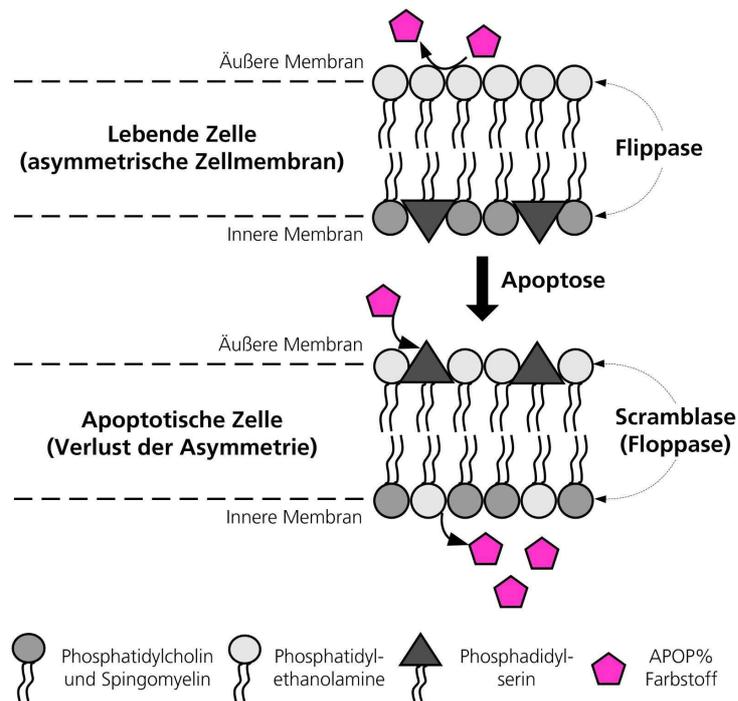
Die Analyse von mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikeln wurde ausschließlich anhand eines Viabilitätstests (WST-1-Assay) durchgeführt. Die Zellen (15.000 HT29-Zellen) wurden hierzu in 96-Lochplatten kultiviert und mit freiem als auch komplexierten mTHPC (eingesetzte mTHPC-Konzentration: 3 µg/ml) für 4 und 24 h bei 37 °C inkubiert und illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) bzw. als Dunkelkontrolle verwahrt. Als Kontrollen dienten Zellen, die mittels einer 2 % Triton X-100 Lösung lysiert wurden. Der Assay wurde im Folgenden, wie bereits beschrieben, durchgeführt und sowohl die Photo- als auch die Dunkeltoxizität bestimmt.

### **2.2.7.3 Nachweis von apoptotischen Ereignissen**

Neben der Bestimmung von photozytotoxischen Effekten mit Hilfe von Standardassays wurde die Induktion bzw. das Vorhandensein von Apoptose evaluiert. Hierzu wurde zum einen ein Zielenzym (PARP<sub>cleaved</sub>), das während der Apoptose gespalten wird, immunhistochemisch nachgewiesen. Zum anderen wurden Änderungen in der Zellmembran, in Folge der apoptotischen Kaskade, nachgewiesen. Beide Untersuchungen wurden an mTHPC-behandelten HT29-Zellen vorgenommen.

#### ***Nachweis von Membranfluktuationen (APOPercentage Apoptose Assay)***

Nach Induktion von Apoptose treten neben charakteristischen morphologischen Veränderungen auch veränderte Membraneigenschaften auf, die eine Detektion von apoptotischen Zellen ermöglichen. Hierbei spielt die Expression von Phosphatidylserin auf der Zellmembranoberfläche eine entscheidende Rolle. In gesunden Zellen ist dieses Molekül ausschließlich auf der Innenseite der Plasmamembran zu finden (Abb. 11). Im Verlauf der Apoptose wird dieses durch einen sogenannten „flip-flop“-Mechanismus auf die Außenseite befördert und dort von Makrophagen identifiziert. Der Transfer von Phosphatidylserin auf die äußere Membranseite ermöglicht nun den Eintritt der APOPercentage Färbelösung in die Zelle. Die Aufnahme erfolgt ausschließlich unidirektional und bedingt eine Anreicherung des Farbstoffs in apoptotischen Zellen.



**Abb. 11: Detektion von Membranänderungen induziert durch Apoptose (APOPercentage Apoptosis Assay).**

In lebenden Zellen liegt eine asymmetrische Zellmembran vor, deren Erhaltung über das Enzym Flippase gewährleistet wird. In apoptotischen Zellen hingegen ist das Enzym Scramblase (Floppase) überwiegend aktiv und bedingt die Aufhebung der Asymmetrie. Der Transfer von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran erlaubt den Transport des APOPercentage Farbstoffs in die Zelle. Die Aufnahme des Farbstoffs ist unidirektional und führt zu einer Akkumulation des Farbstoffs (gemäß (155)).

Zum Nachweis von apoptotischen Zellen nach einer erfolgten PDT-Behandlung wurden 25.000 HT29-Zellen in 96-Lochplatten kultiviert und mit mTHPC (1 µg/ml; frei und nanopartikulär-gebunden) für 1, 4 und 24 h inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen beleuchtet (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) bzw. als Dunkelkontrolle gelagert. Nach einer Ruhephase von 60 min wurde die APOPercentage Färbelösung (1:20) zu den einzelnen Ansätzen pipettiert und für weitere 30 min inkubiert. Als Kontrolle wurden HT29-Zellen mit 2,5 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 h bei 37 °C behandelt und ebenfalls 30 min vor Beendigung der Inkubation mit der Färbelösung versetzt. Alle Proben wurden nach erfolgter Inkubation mit PBS gewaschen, bis sich keine Färbelösung mehr von den Zellen abwaschen ließ. Die Zellen wurden im Anschluss unter einem Lichtmikroskop untersucht und Aufnahmen im Hellfeld von den Ansätzen aufgenommen. Die quantitative Auswertung der Apoptoseinduktion wurde mit Hilfe der *GIMP*-Software vorgenommen. Hierzu wurden die Pixelwerte des akkumulierten Reagenz bestimmt und aufgetragen.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSAmTHPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGAmTHPC)

### ***Immunhistochemischer Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub>***

HT29-Zellen wurden 24 h auf FKS-beschichteten 2-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1 µg/ml; frei und nanopartikelgebunden) für 1, 4 und 24 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nachdem der Überstand durch frisches Kulturmedium ersetzt worden war, erfolgte die Bestrahlung (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und Aktivierung von mTHPC. Nach einer Ruhephase von 1 h bei 37 °C wurden die Zellen mit 0,4 % PFA für 20 min fixiert. Nach Entfernung des PFA durch zweimaliges Waschen mit PBS wurden die Proben mit Block-Lösung II für 60 min bei RT behandelt. Direkt im Anschluss wurde der Primärantikörper (anti-PARP<sub>cleaved</sub>, 1:200), gelöst in der Antikörper-Lösung, über Nacht bei 4 °C zugegeben. Am folgenden Tag wurde die Lösung entfernt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen, bevor mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Ziege Anti-Hase, Alexa Fluor 488, 1:200) für weitere 2 h bei RT inkubiert wurde. Die Zellen wurden zuletzt 3x mit PBS, gefolgt von 1x dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit Vectashield-HardSet-Mounting-Medium + DAPI eingebettet. Nach Aushärtung wurden die Ränder des Deckglases mit Nagellack verschlossen und die Proben analysiert.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSA-mTHPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGA-mTHPC)

#### **2.2.7.4 Zelluläre Akkumulation in Tumorsphäroiden**

Zur Überprüfung der zellulären Anreicherung von freiem mTHPC sowie von mTHPC-beladenen Nanopartikeln (HSA und PLGA) wurden die Sphäroide mit den unterschiedlichen Formulierungen (eingesetzte mTHPC-Konzentration 3 µg/ml) für 24 h bei 37 °C kultiviert. Im Anschluss wurden die Sphäroide in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesammelt und 2x mit PBS gewaschen. Die gewaschenen Sphäroide wurden in beschriftete Einbetttschällchen überführt und das verbleibende PBS entfernt, bevor die Sphäroide mit Einbettmedium für Gefrierschnitte (Jung) bedeckt wurden. Die Sphäroide wurden durch vorsichtiges Rühren gleichmäßig verteilt und unverzüglich bei -80 °C eingefroren.

#### ***Bestimmung der zellulären Akkumulation***

Für die Bestimmung der zellulären Akkumulation und Eindringtiefe der zu untersuchenden Substanzen wurde die konfokale Raster-Lasermikroskopie verwendet. Die inkubierten und geschnittenen Proben wurden hierzu für 2 h bei RT aufgetaut und mit Vectashield-HardSet-Mounting-Medium + DAPI eingebettet. Nach Aushärtung wurden die Ränder des Deckglases mit Nagellack verschlossen. Die Analyse der Proben erfolgte unter Verwendung eines 20x Neoplan Fluor Objektivs. Die Anreicherung des

Photosensibilisators mTHPC konnte über die rote Eigenfluoreszenz verfolgt werden. Der Nanopartikelnachweis wurde durch die herstellungsbedingte Eigenfluoreszenz (HSA-Nanopartikel) bzw. die Inkorporation von Lumogen Yellow® (PLGA-Nanopartikel) ermöglicht.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSAmTHPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGAmTHPC)

### ***Nachweis von apoptotischen Ereignissen***

Zum Nachweis von apoptotischen Ereignissen nach einer PDT-Behandlung wurden die Sphäroide mit den unterschiedlichen Formulierungen (eingesetzte mTHPC-Konzentration 3 µg/ml) für 24 h bei 37 °C kultiviert. Im Anschluss wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Sphäroide illuminiert (652 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>). Nach einer 1-stündigen Ruhephase wurden die Sphäroide in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesammelt und 2x mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Sphäroide, wie unter Punkt 2.2.8.3 beschrieben, eingefroren und geschnitten. Die geschnittenen Proben wurden aufgetaut und einer immunhistochemischen Färbung unterzogen. Hierzu wurde der zu färbende Bereich mittels eines Fettstiftes (Pap-Pen) markiert. Der Stift erzeugt eine wasserabweisende Barriere und hält die verwendeten Lösungen innerhalb der gekennzeichneten Fläche. Die Sphäroide wurden im Anschluss gemäß Punkt 2.2.7.3 einer Färbung zum Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> unterzogen.

Untersuchte Proben:

- Freies mTHPC
- mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (HSAmTHPC)
- mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGAmTHPC)

## **2.2.8 Zelltyp-spezifische nanopartikuläre Anreicherung**

### **2.2.8.1 EGFR-Oberflächenexpression**

Für die Bestimmung der EGFR-Oberflächenexpression der verwendeten humanen Kolonkarzinomzelllinien wurden durchflusszytometrische sowie immunhistochemische Analysen vorgenommen.

#### ***Durchflusszytometrische Analyse der EGFR-Oberflächenexpression***

HT29- und DiFi-Zellen wurden zur Bestimmung ihrer EGFR-Oberflächenexpression abgelöst, ihre Zellzahl bestimmt und je 500.000 Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit ansteigenden Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers Cetuximab (0,001-20 µg/ml) für 30 min

bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Zellen 2x mit PBS gewaschen wurden (5 min, 1200 rpm, 4 °C), erfolgte eine Inkubation mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten Ziege anti-Human-Sekundärantikörper (1:100 Verdünnung) für weitere 30 min bei 4 °C. Die Zellen wurden nach erfolgter Inkubation 2x mit PBS gewaschen und mittels FACS-Fix für die folgende Messung fixiert. Als Kontrolle wurden HT29- und DiFi-Zellen mit ansteigenden IgG-Konzentrationen (IgG human, 0,001-20 µg/ml) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt.

### ***Bestimmung der EGFR-Oberflächenexpression mittels Immunhistochemie***

Die zu untersuchenden Zellen der humanen Kolonkarzinomlinien HT29 und DiFi wurden 24 h auf FKS-beschichteten Glasobjektträgern kultiviert, mit PBS gewaschen und im Anschluss mit eiskaltem Methanol (abs.) für 10 min fixiert und permeabilisiert. Gleichzeitig erfolgte die Kernfärbung mit Propidiumiodid (5 µg/ml, gelöst in Methanol). Die Proben wurden 2x mit PBS gewaschen und 20 min bei RT mit Block-Lösung I inkubiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper (Cetuximab, 5 µg/ml) ohne vorheriges Waschen zu den Proben gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen 2x mit PBS gewaschen worden waren, um restlichen Antikörper zu entfernen, wurden die Proben eine weitere Stunde bei RT mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten Ziege anti-Human-Sekundärantikörper (1:400 Verdünnung) gefärbt. Dieser wurde durch 2x Waschen mit PBS entfernt. Als Kontrolle wurden HT29- und DiFi-Zellen mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten Ziege anti-Human-Sekundärantikörper (1:400 Verdünnung) inkubiert. Die anschließende Aufbereitung und CLSM-Analyse wurde, wie unter Punkt 2.2.4.5 beschrieben, durchgeführt.

### **2.2.8.2 Zytotoxizität von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln**

Die Bestimmung einer eventuellen Zytotoxizität von Cetuximab- bzw. IgG-modifizierten Nanopartikeln (HSA und PLGA) erfolgte mittels des WST-1-Assays. DiFi- und HT29-Zellen wurden folglich in einer mittleren Zelldichte (10.000 Zellen pro Vertiefung) in 96-Lochplatten für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen (IgG- & Cetuximab-modifizierte Nanopartikel; 5-500 µg/ml) für 2 und 24 h zu den Zellen pipettiert. Die anschließende Probenaufbereitung und Messung wurde, wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben, durchgeführt.

Untersuchte Proben:

- Oberflächenmodifizierte HSA-Nanopartikel (HSA-IgG- und HSA-Cetuximab-NP)
- Oberflächenmodifizierte PLGA-Nanopartikel (ohne Lumogen Yellow®; PLGA-IgG- und PLGA-Cetuximab-NP)

### **2.2.8.3 Zelluläre Akkumulation von Cetuximab-modifizierten Nanopartikeln**

#### ***Konzentrationsabhängige spezifische Bindung***

Die spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln (IgG- & Cetuximab-modifizierte Nanopartikel) wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Hierzu wurden je 250.000 Zellen in 24-Lochplatten kultiviert und mit ansteigenden Nanopartikel-Volumina (entsprechend einer ansteigenden Antikörper-konzentration; HSA-NP: 0,1-20 µg/ml; PLGA-NP: 0,1-10 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufbereitung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt. Für die Detektion der Nanopartikel konnte die herstellungsbedingte grüne Autofluoreszenz der HSA-Nanopartikel sowie das in PLGA-Nanopartikeln inkorporierte Lumogen Yellow<sup>®</sup> verwendet werden.

Untersuchte Proben:

- Oberflächenmodifizierte HSA-Nanopartikel (HSA-IgG- und HSA-Cetuximab-NP)
- Oberflächenmodifizierte PLGA-Nanopartikel (mit Lumogen Yellow<sup>®</sup>; PLGA-IgG- und PLGA-Cetuximab-NP)

#### ***Zeitabhängige spezifische Bindung***

Die spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln (IgG- & Cetuximab-modifizierte Nanopartikel) wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Hierzu wurden je 250.000 Zellen in 24-Lochplatten kultiviert und mit unterschiedlich oberflächenmodifizierten Nanopartikeln (konstante Nanopartikel-Konzentration: 0,1 mg/ml) für 0,5-24 h bei 37 °C inkubiert. Untersucht wurde die spezifische zelluläre Bindung von Cetuximab-modifizierten Nanopartikeln gegenüber einer unspezifischen Bindung von IgG-modifizierten Kontrollpartikeln. Die anschließende Aufbereitung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt. Für die Detektion der Nanopartikel konnte die herstellungsbedingte grüne Autofluoreszenz der HSA-Nanopartikel sowie das in PLGA-Nanopartikeln inkorporierte Lumogen Yellow<sup>®</sup> verwendet werden. Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem Students-T-Test. Die Unterschiede waren statistisch signifikant bei P-Werten von  $p < 0,05$ , sehr signifikant bei P-Werten von  $p < 0,01$  und extrem signifikant bei Werten von  $< 0,001$ .

Untersuchte Proben:

- Oberflächenmodifizierte HSA-Nanopartikel (HSA-IgG- und HSA-Cetuximab-NP)
- Oberflächenmodifizierte PLGA-Nanopartikel (mit Lumogen Yellow<sup>®</sup>; PLGA-IgG- und PLGA-Cetuximab-NP)

### ***Hemmung der spezifischen Bindung***

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des freien Antikörpers Cetuximab® auf die zelluläre Bindung der unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen untersucht. DiFi- und HT29-Zellen (je 250.000 Zellen) wurden in 24-Lochplatten kultiviert und mit den unterschiedlich antikörpermodifizierten Nanopartikeln (NP-Cetuximab; konstante Nanopartikel-Konzentration: 0,1 mg/ml) für 0,5-24 h bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde den Ansätzen 5 µg/ml Cetuximab beigefügt. Die anschließende Aufbereitung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt und die Eigenfluoreszenz der HSA Nanopartikel sowie das inkorporierte Lumogen Yellow® (PLGA-Nanopartikel) für die Detektion genutzt. Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem Students-T-Test. Die Unterschiede waren statistisch signifikant bei P-Werten von  $p < 0,05$

Untersuchte Proben:

- Oberflächenmodifizierte HSA-Nanopartikel (HSA-Cetuximab-NP)
- Oberflächenmodifizierte PLGA-Nanopartikel (mit Lumogen Yellow®; PLGA-Cetuximab-NP)

### ***Intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung***

Die intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung von spezifisch modifizierten Nanopartikeln wurde mittels CLSM ermittelt. Hierfür wurden Zellen der beiden Zelllinien (HT29 und DiFi) auf FKS-beschichtete Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit Nanopartikeln (0,1 mg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufbereitung und CLSM-Untersuchung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.5 beschrieben, durchgeführt.

Untersuchte Proben:

- Oberflächenmodifizierte HSA-Nanopartikel (HSA-IgG- und HSA-Cetuximab-NP)
- Oberflächenmodifizierte PLGA-Nanopartikel (mit Lumogen Yellow®; PLGA-IgG- und PLGA-Cetuximab-NP)

### ***Automatische Bildgebung der zeitabhängigen Anreicherung von Oberflächenmodifizierten Nanopartikeln (Time-Laps-Analyse)***

Neben der konfokalen Analyse der zellulären Akkumulation von spezifischen Nanopartikeln gegenüber unspezifischen Kontrollpartikeln wurde die Anreicherung über einen Zeitraum von 24 h visuell beobachtet. DiFi- und HT29-Zellen wurden in einer mittleren Zelldichte (200.000 Zellen pro Quadrant) in spezielle Multi-Experiment Petrischalen (Hi-Q<sup>4</sup>) ausgesät und für 24 h kultiviert. Die Multi-Experiment Petrischalen wiesen vier gleich große Quadranten auf und zeichneten sich durch sehr gute optische Eigenschaften aus. Nachdem die Zellen ausreichend Zeit zum Adhärenz hatten, wurde die Nanopartikelinkubation gestartet. Hierzu wurden die zu untersuchenden nanopartikulären Formulierungen in einer konstanten Konzentration (NP-IgG- &

NP-Cetuximab-Nanopartikel; 0,1 mg/ml) in den jeweiligen Zellkulturmedien angesetzt und in die entsprechenden Quadranten überführt. Die vorbereiteten Petrischalen wurden unverzüglich in die bereits vorgewärmte Inkubationskammer (BioStation IMQ mit integrierten Sensoren für Luftfeuchtigkeit und Temperatur) transferiert und für die darauf folgenden Stunden untersucht. Alle 15 min wurde von zuvor markierten Bereichen sowohl ein Phasenkontrast- als auch Fluoreszenzbild (grün) aufgenommen und gespeichert. Die Auswertung wurde im Folgenden mit der freien *GIMP*-Software vorgenommen und grafisch aufgetragen.

Untersuchte Proben:

- Oberflächenmodifizierte HSA-Nanopartikel (HSA-IgG- und HSA-Cetuximab-NP)
- Oberflächenmodifizierte PLGA-Nanopartikel (mit Lumogen Yellow<sup>®</sup>; PLGA-IgG- und PLGA-Cetuximab-NP)

## **2.2.9 Antikörper-modifizierte & mTHPC-beladene Nanopartikel**

Abschließend wurden die entstandenen Vollpräparationen (Antikörper-modifiziert & mTHPC-beladen) hinsichtlich ihrer zellulären Bindung an HT29- und DiFi-Zellen getestet und ihre phototoxische Wirksamkeit evaluiert. Die modifizierten HSA-Nanopartikel wiesen folglich auf ihrer Oberfläche den kovalent gebundenen Antikörper als auch den kovalent gebundenen Photosensibilisator mTHPC auf.

### **2.2.9.1 Zelluläre Bindung**

Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Je 250.000 HT29- und DiFi-Zellen wurden in 24-Lochplatten kultiviert und mit HSA-mTHPC-IgG- & HSA-mTHPC-Cetuximab-Nanopartikeln (eingesetzte Antikörper-Konzentration: 5 µg/ml) für 2 h bei 37 °C kultiviert. Die nachstehende Aufbereitung wurde, wie unter Punkt 2.2.4.4 beschrieben, durchgeführt.

### **2.2.9.2 Bestimmung der Photozytotoxizität**

In der Folge wurden die neuen antikörpermodifizierten nanopartikulären Systeme (HSA-mTHPC-IgG, HSA-mTHPC-Cetuximab) hinsichtlich einer induzierten Phototoxizität verglichen. Die eingesetzte Photosensibilisatorkonzentration betrug für alle Ansätze und Formulierungen 1 µg/ml.

#### ***Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität***

Sowohl die Photo- als auch eine eventuell vorliegende Dunkeltoxizität wurden mit Hilfe von Standardzytotoxizitätstests evaluiert. Untersucht wurden mTHPC-behandelte und belichtete, sowie mTHPC-behandelte jedoch nicht illuminierte Zellen hinsichtlich der vorliegenden Zellviabilität (WST-1-Assay, siehe Punkt 2.2.3.1), Zellproliferation (BrdU-Assay, siehe Punkt 2.2.3.2) und Membranintegrität (LDH-Assay, siehe Punkt 2.2.3.3). Für

die Tests wurden jeweils 15.000 HT29-Zellen sowie 20.000 DiFi-Zellen gelöst in 100 µl in 96-Lochplatten ausgesät und für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Die jeweiligen Proben wurden am nächsten Tag zugegeben. Nach weiteren 2 bzw. 24 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Bestrahlung von je einer Platte (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>), wobei die zweite als Dunkelkontrolle verwahrt wurde. Die Assays wurden im Folgenden, wie bereits beschrieben, durchgeführt und sowohl die Photo- als auch die Dunkeltoxizität bestimmt. Als Kontrollen dienten unbehandelte als auch mit Lösungsmittel (Wasser; bezogen auf Nanopartikel-Solvent) behandelte Zellen, sowie mit 2 % Triton X-100 Lösung lysierte Zellen.

### **2.2.9.3 Bestimmung von Membranfluktuationen**

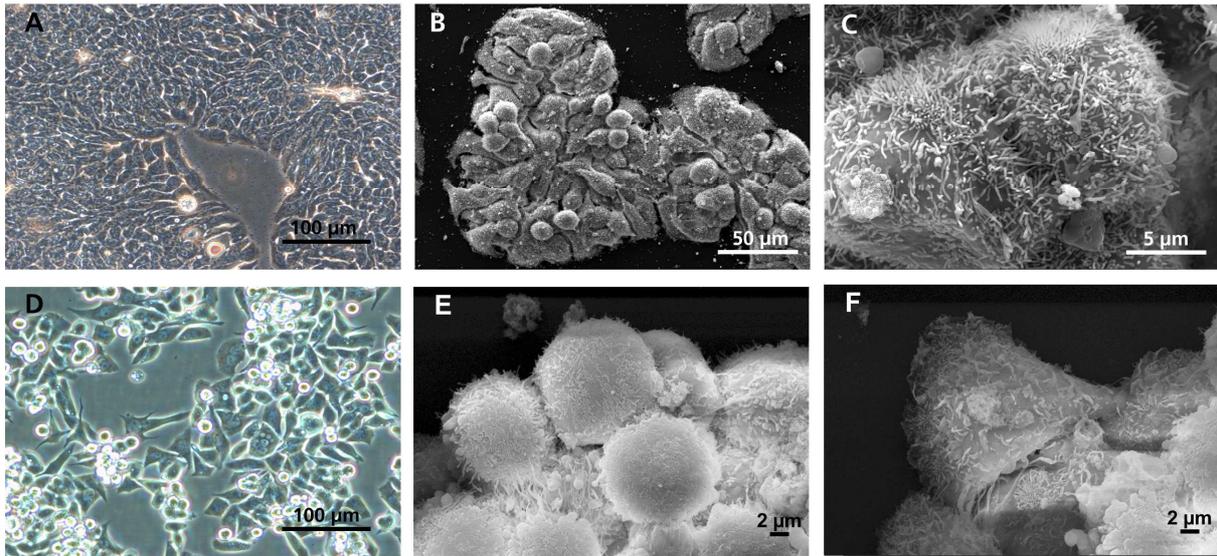
Zum Nachweis von Membranfluktuationen als Hinweis einer einsetzender Apoptose erfolgte die Inkubation mit der APOPercentage Apoptose Reagenz (siehe Punkt 2.2.7.3). Hierzu wurden 30.000 HT29-Zellen und 40.000 DiFi-Zellen in 96-Lochplatten kultiviert und mit dem nanopartikulär gebundenem mTHPC (eingesetzte Photosensibilisator-Konzentration: 1 µg/ml) für 2 bzw. 24 h kultiviert. Nachstehend wurde ein Teil der Proben illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) bzw. der verbleibende Anteil als Dunkelkontrolle gelagert und die Aufbereitung, wie unter Punkt 2.2.7.3 beschrieben, durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Morphologische Charakterisierung von Kolonkarzinomzelllinien

Zu Beginn der Arbeit wurden die verwendeten Zelllinien hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Wachstum vergleichend charakterisiert. Die humanen Kolonkarzinomzelllinien DiFi und HT29 zeigten in Kultur ein unbeschränktes Wachstum und mussten daher zwecks Subkultivierung einmal pro Woche passagiert werden. Die Zellen unterschieden sich *in vitro* weiterhin hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Morphologie. Zellen der Linie HT29 zeigten ein schnelles Wachstum und bildeten Kolonien (Abb. 12B), aus denen heraus sie die Kulturgefäße besiedelten. Nach Erreichen der Konfluenz (Abb. 12A) zeigten die epithelialen HT29-Zellen einen dichten Zellmonolayer. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde herangezogen, um die Zellen weiter zu charakterisieren (Abb. 12B,C). Die Kolonien wiesen innerhalb ihrer Strukturen mitotisch aktive Zellen auf (Abb. 12B), die sich durch ihre abgerundete Morphologie auszeichneten. Eine weitere Vergrößerung der Zelloberfläche visualisierte Flimmerhärchen auf der Oberfläche der Darmkrebszellen (Abb. 12C).

Die verwendete Zelllinie DiFi zeigte ein differenziertes Wachstum (Abb. 12D-F). Die Zellen wuchsen in zwei übereinander liegenden Zellschichten (Zelllayern). Der untere Layer zeichnete sich durch eine spindelförmige Morphologie aus. Zellen des darüber befindlichen Layers erschienen stark abgerundet. Mittels einer REM-Untersuchung konnten die verschiedenen Zellmorphologien wiedergefunden und genauer visualisiert werden (Abb. 12E,F). Die spindelförmigen Zellen wiesen ebenfalls kleine Härchen auf der Zelloberfläche auf, die jedoch weniger stark ausgeprägt als bei HT29 auftraten (Abb. 12E).



**Abb. 12: Morphologie von HT29- und DiFi-Zellen im Monolayer.**

Phasenkontrastaufnahmen eines konfluenten HT29 (A) und DiFi (D) Layers. REM-Aufnahmen von HT29-(B, C) und DiFi-(E, F) Zellen: (B) Übersicht über HT29 Kolonie; (C) Mikrovillistrukturen auf HT29 Zellmembran; (E) Vergrößerung des oberen Doppellayer einer DiFi-Kolonie; (F) Vergrößerung des unteren Doppel-Layer einer DiFi-Kolonie.

## 3.2 Nanopartikelcharakterisierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften sowie der Beladung mit dem Photosensibilisator mTHPC untersucht. Die Untersuchungen zur Charakterisierung der einzelnen Formulierungen wurden durch Nico Reum (Gold-Nanopartikel, UdS), Matthias Wacker (HSA-Nanopartikel, JWG) und Thomas Knobloch (PLGA-Nanopartikel, JWG) durchgeführt.

### 3.2.1 Gold-Nanopartikel

Die Synthese von Gold-Nanopartikeln (AuNP) erfolgte gemäß der Methode nach Frens<sup>(142)</sup> und Turkevich<sup>(143)</sup>. Im Anschluss wurden die citratstabilisierten AuNP mit Polyelektrolytschichten modifiziert. Die mTHPC-beladenen und unbeladenen Gold-Nanopartikel wiesen einen Kerndiameter von 14 nm auf (Tab. 4). Die Wirkstoff-unbeladenen AuNP wiesen zwei Polyelektrolytlayer auf der Oberfläche auf. Es handelte sich bei dem äußeren um Polystyrolsulfonat (PSS), das sich in einem negativen Zetapotential von -46 mV niederschlug. Die Modifizierung mit mTHPC über die adaptierte Layer-by-Layer-Technik<sup>(146)</sup> führte zu Nanopartikeln mit einem äußeren PSS-Layer und einem ebenfalls negativen Zetapotential (-41 mV). Die Beladung mit mTHPC betrug 9 µg/mg. Nachdem die beladenen als auch unbeladenen AuNP in Zellkulturmedium gelöst wurden, kam es in beiden Fällen zu einer Reduktion des ermittelten Zetapotentials. Dieses betrug in beiden Fällen -10 mV.

**Tab. 4: Physikochemische Charakterisierung von Gold-Nanopartikeln.**

Gold-Nanopartikel	Kern-diameter [nm]	Anzahl an Schichten	Äußere Schicht	Zeta-potential <sup>W</sup> [mV]	Zeta-potential <sup>ZM</sup> [mV]	Wirkstoff-beladung [µg/mg]
unbeladen	14	2	PSS	-46	-10	---
+ mTHPC	14	4	PSS	-41	-10	9

W: gelöst in Wasser; ZM: gelöst in Zellkulturmedium

### 3.2.2 Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA)

Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA) wurden mittels der gut beschriebenen Desolvationstechnik <sup>(147-149)</sup> synthetisiert. Die unbeladenen Nanopartikel wiesen eine mittlere Größe von  $227,57 \pm 23,85$  nm auf (Tab. 5). Der Polydispersitätsindex betrug  $0,042 \pm 0,02$  und verdeutlichte eine monodisperse Partikelgrößenverteilung. In Folge der kovalenten Anbindung des Photosensibilisators mTHPC nahm die mittlere Größe nur gering zu und betrug  $228,00 \pm 54,76$  nm. Die Wirkstoffbeladung betrug  $22,93 \pm 4,59$  µg/mg HSA-Nanopartikel und die Polydispersität lag bei  $0,026 \pm 0,01$ . Die kovalente Anbindung des Antikörpers Cetuximab wurde entsprechend dem beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikel (HSA-Cetuximab) sowie die dazugehörigen IgG-modifizierten Kontroll-Partikel (HSA-IgG) wiesen eine durchschnittliche Nanopartikelgröße von  $241,5 \pm 14,7$  nm bzw.  $239,5 \pm 22,7$  nm und eine Polydispersität von unter 0,1 auf (HSA-Cetuximab:  $0,068 \pm 0,06$ ; HSA-IgG:  $0,073 \pm 0,02$ ). Die Cetuximab-Beladung der Partikel lag durchschnittlich bei  $20,8 \pm 1,9$  µg Antikörper pro mg Nanopartikel. Die unspezifischen Kontrollnanopartikel wiesen  $16,7 \pm 2,8$  µg Antikörper pro mg Nanopartikel auf. Die größten Nanopartikel wiesen eine kovalente mTHPC-Anbindung sowie eine Antikörpermodifizierung auf der Oberfläche auf. Diese Nanopartikel verfügten über eine mittlere Größe von  $264,4 \pm 3,2$  nm (Cetuximab-Modifizierung) bzw.  $265,8 \pm 1,2$  nm (IgG-Modifizierung). Die Polydispersität von beiden Systemen lag deutlich unter 0,1 und die Formulierungen lagen somit monodispers in Lösung vor. Die Beladung mit dem Photosensibilisator mTHPC betrug  $20,53 \pm 1,72$  µg (HSA mTHPC-Cetuximab) bzw.  $20,77 \pm 1,81$  µg (HSA mTHPC-IgG) pro mg Nanopartikel. Eine entsprechende Antikörperkopplung konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Der gebundene Anteil Cetuximab betrug hierbei  $21,87 \pm 4,43$  µg/mg Nanopartikel sowie  $17,21 \pm 4,51$  µg/mg für den unspezifischen Kontrollantikörper IgG.

Tab. 5: Physikochemische Charakterisierung von HSA-Nanopartikel.

HSA-Nanopartikel	Partikelgröße [nm]	Polydispersität	Zeta-potential [mV]	Wirkstoff-beladung [µg/mg]	Antikörper-beladung [µg/mg]
unbeladen	227,57 ± 23,85	0,042 ± 0,02	n.b.	---	---
+ mTHPC	228,00 ± 54,76	0,026 ± 0,01	n.b.	22,93 ± 4,59	---
+ Cetuximab	241,5 ± 14,7	0,068 ± 0,06	n.b.	---	20,8 ± 1,9
+ IgG	239,5 ± 22,7	0,073 ± 0,02	n.b.	---	16,7 ± 2,8
+ mTHPC & Cetuximab	264,4 ± 3,2	0,022 ± 0,008	n.b.	20,53 ± 1,72	21,87 ± 4,43
+ mTHPC & IgG	265,8 ± 1,2	0,008 ± 0,009	n.b.	20,77 ± 1,81	17,21 ± 4,51

n. b.: nicht bestimmt

### 3.2.3 Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)

Die mittels Emulsions-Diffusions-Evaporations-Technik <sup>(78, 151)</sup> hergestellten unbeladenen PLGA-Nanopartikel wiesen eine mittlere Größe von  $275,73 \pm 7,81$  nm und eine Polydispersität von  $0,03 \pm 0,01$  auf (Tab. 6). Die Inkorporation von Lumogen Yellow® (LY) in die Partikelmatrix bedingte eine Reduktion der Partikelgröße auf  $261,67 \pm 7,45$  nm bei gleich bleibender Polydispersität. Die stärkste Größenzunahme konnte bei mTHPC-beladenen Nanopartikeln (mit und ohne LY) beobachtet werden. Die Größe lag hier bei  $283,2 \pm 20,4$  nm (ohne LY) bzw.  $282,9 \pm 24,9$  nm (mit LY). Die ermittelten Polydispersitätswerte lagen immer unter 0,1 und die Wirkstoffbeladung betrug  $24,5 \pm 2,0$  µg (ohne LY) bzw.  $24,3 \pm 1,7$  µg pro mg Nanopartikel. Die kleinsten Nanopartikel wiesen eine Oberflächenmodifizierung mit spezifischen bzw. unspezifischen Antikörpern auf. Die mittlere Größe von Cetuximab-modifizierten Nanopartikel betrug  $253,8 \pm 2,26$  nm und die entsprechende Polydispersität lag unter 0,1. Der Anteil an gebundenem Antikörper betrug  $10,3 \pm 0,01$  µg/mg PLGA-Nanopartikel. IgG-modifizierte Nanopartikel wiesen die geringste Größe ( $258,1 \pm 2,83$  nm) auf. Der ermittelte Polydispersitätswert lag unter 0,1 und der Anteil an gebundenem unspezifischem Antikörper lag bei  $10,84 \pm 1,84$  µg pro mg Nanopartikel. Alle synthetisierten Nanopartikel wiesen ein negatives Zetapotential auf. Dieses betrug für unbeladene PLGA-Partikel im Durchschnitt  $-19,2 \pm 4,4$  mV. Durch die Einführung von mTHPC ( $-22,7 \pm 3,1$  mV) bzw. der Antikörper (Cetuximab:  $-38,2 \pm 4,2$  mV; IgG:  $-37,2 \pm 3,6$  mV) konnte es weiter reduziert werden.

**Tab. 6: Physikochemische Charakterisierung von PLGA-Nanopartikel.**

PLGA-Nanopartikel	Partikelgröße [nm]	Polydispersität	Zeta-potential [mV]	Wirkstoff-beladung [µg/mg]	Antikörper-beladung [µg/mg]
unbeladen	275,73 ± 7,81	0,030 ± 0,01	-19,2 ± 4,4	---	---
unbeladen (LY)	261,67 ± 7,45	0,034 ± 0,02	-20,2 ± 2,6	---	---
+ mTHPC	283,2 ± 20,4	0,053 ± 0,03	-22,7 ± 3,1	24,5 ± 2,0	---
+ mTHPC (LY)	282,9 ± 24,9	0,063 ± 0,04	-23,8 ± 1,6	24,3 ± 1,7	---
+ Cetuximab (LY)	253,8 ± 2,26	0,076 ± 0,01	-38,2 ± 4,2	---	10,3 ± 0,01
+ IgG (LY)	258,1 ± 2,83	0,061 ± 0,02	-37,2 ± 3,6	---	10,84 ± 1,84

LY: Lumogen Yellow® (0,20 ± 0,01 µg/mg)

### 3.3 Bestimmung der Eigenschaften von Nanopartikeln

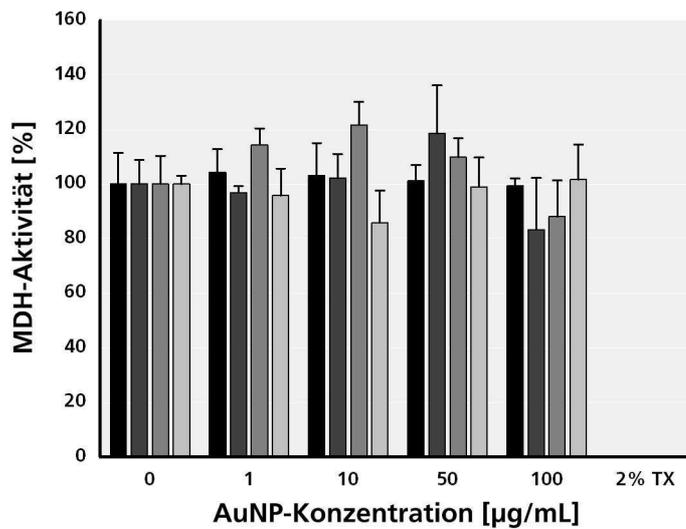
#### 3.3.1 Zytotoxizität

Alle in dieser Arbeit verwendeten nanopartikulären Formulierungen wurden zu Beginn hinsichtlich eines zytotoxischen Potentials untersucht. Hierzu wurden unterschiedliche Standardtests zur Evaluierung, eventuell durch Nanopartikel induzierter Effekte, durchgeführt. Die Untersuchungen umfassten die Bestimmung der Zellviabilität (mitochondriale Dehydrogenase (MDH)-Aktivität; WST-1-Assay), der Zellproliferation (BrdU-Inkorporation; BrdU-Assay) sowie eines vorliegenden Verlust der Zellmembranintegrität (Lactat Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung; LDH-Assay). Alle Tests wurden nach verschiedenen anhaltenden Inkubationszeiten mit ansteigenden Nanopartikel-Konzentrationen durchgeführt. Sofern die Ergebnisse eine unbedenkliche zelluläre Interaktion aufzeigten, wurden die nanopartikulären Formulierungen für weitere Untersuchungen hinsichtlich einer zellulären Akkumulation verwendet.

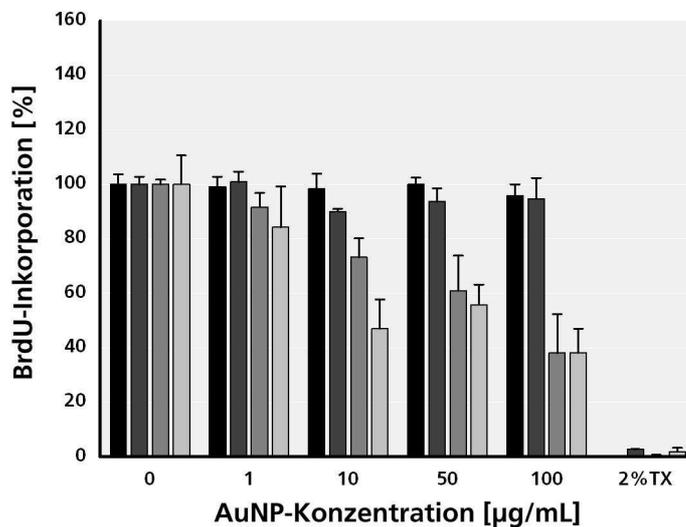
##### 3.3.1.1 Gold-Nanopartikel

Eventuell vorliegende zytotoxische Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln wurden nach einer Langzeitinkubation (4-72 h) an HT29-Zellen determiniert (Abb. 13). Die Inkubation erfolgte hierbei mit ansteigenden Konzentrationen (1-100 µg/ml) bei 37 °C. Eine Lösungsmittelkontrolle konnte vernachlässigt werden, da die Nanopartikel in Zellkulturmedium hergestellt wurden. Für alle untersuchten Gold-Nanopartikel-Konzentrationen sowie Inkubationszeiten konnten keine stark veränderten Zellviabilitätswerte evaluiert werden (Abb. 13A). Es traten leichte Schwankungen innerhalb der ersten 48 h auf, die sich jedoch um weniger als 20 % von der Kontrolle unterschieden und daher nicht als starker Effekt angesehen wurden. Zellen, die nach einer 4 und 72 h Inkubation untersucht wurden, zeigten nur geringfügig veränderte Viabilitätswerte verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen.

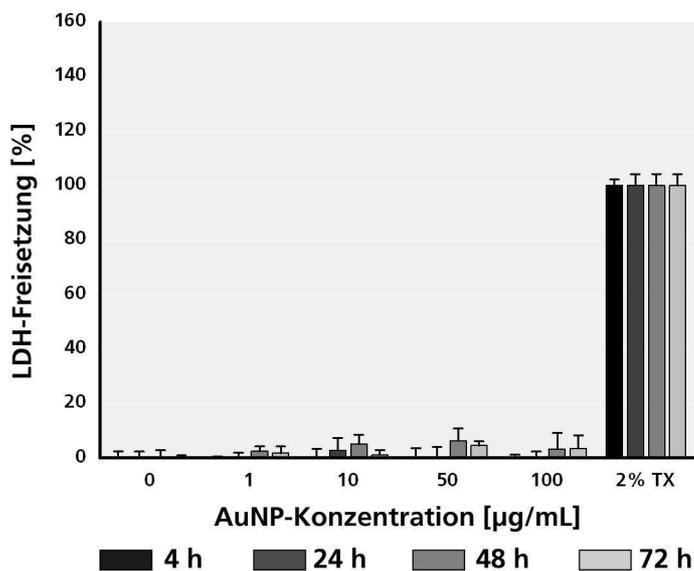
### A Zellviabilität



### B Zellproliferation



### C Zellmembranintegrität



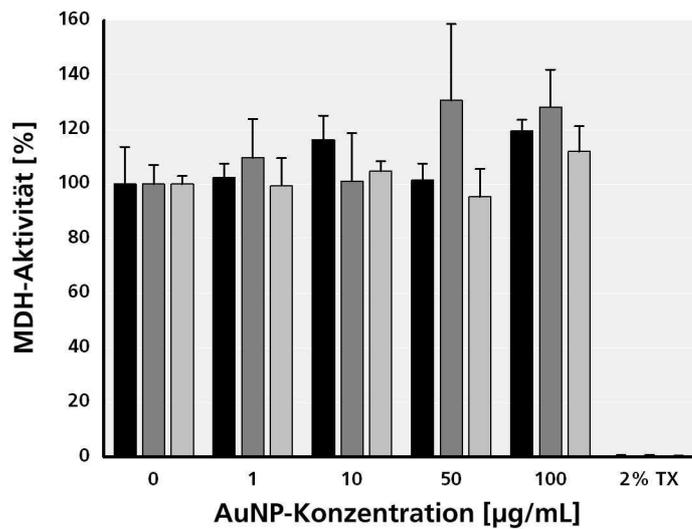
**Abb. 13: Bestimmung der Zytotoxizität in Folge einer Langzeitinkubation mit Gold-Nanopartikel.**

HT29-Zellen wurden mit ansteigenden Gold-Nanopartikel-Konzentrationen (AuNP; 0-100 µg/ml) für 4 bis 72 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellviabilität (A; WST-1-Assay), die Zellproliferation (B; BrdU-Assay) und die Zellmembranintegrität (C; LDH-Assay) mittels der beschriebenen Assays bestimmt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (0) bzw. mit 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

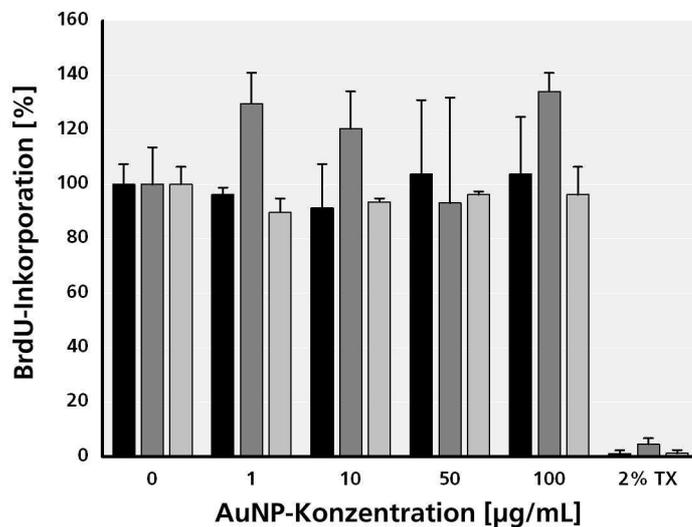
Die Inkubation mit 2 % Triton X-100, als Positivkontrolle, induzierte bei allen untersuchten Inkubationen eine nur noch marginal detektierbare Vitalität. Im Anschluss wurde die Zellproliferation nach erfolgter Partikel-Zugabe analysiert (Abb. 13B). Die Zellproliferation zeigte für die beiden kurzen Inkubationszeiten (4 und 24 h) keine Veränderungen. Die ermittelten Werte lagen alle im Bereich der Kontrollen und den entsprechenden Fluktuationen. Nach einer 48 bzw. 72-stündigen Inkubation konnte ein konzentrationsabhängiger Rückgang in der DNA-Neusynthese verzeichnet werden. In beiden Fällen konnte eine maximale Reduktion der Zellproliferation auf ca. 40 % (48 und 72 h, 100 µg/ml) verglichen mit unbehandelten Zellen beobachtet werden. Die stärkste Reduktion konnte aufgrund der Triton X-100-Behandlung in der Positivkontrolle abgelesen werden. Zuletzt konnte mittels des sensitiven LDH-Assays ein eventueller Verlust der Zellmembranintegrität verfolgt werden (Abb. 13C). Die untersuchten Gold-Nanopartikel zeigten bei keiner zugesetzten Konzentration eine stark erhöhte LDH-Freisetzung. Eine leichte Zunahme der LDH-Freisetzung konnte zeitabhängig detektiert werden. Alle ermittelten Werte lagen jedoch unter 10 %. Die Auswertung der Daten verdeutlichte, dass keine Zytotoxizität von den unbeladenen AuNP nach kurzzeitigen Inkubationszeiten ausging und diese nur einen gewissen Einfluss auf die Proliferation in Folge lang anhaltender Exposition hatten. Daher konnten die weiteren Untersuchungen fortgesetzt werden.

Im Anschluss an die ersten Untersuchungen wurden die Zellen hinsichtlich auftretender Folgeerscheinung nach einer Kurzzeitinkubation mit unbeladenen AuNP untersucht. Die Zellen wurden 4 h mit ansteigenden AuNP-Konzentrationen (1-100 µg/ml) inkubiert, anschließend gewaschen und für weitere 24-72 h bei 37 °C kultiviert (Abb. 14). Die entsprechenden Kontrollen für die jeweiligen Tests zeigten die erwarteten Effekte und werden daher nicht genauer erläutert. Die ermittelte Zellviabilität blieb für den überwiegenden Anteil der untersuchten Proben auf einem konstanten Niveau (Abb. 14A). Erst die Applikation von hohen AuNP-Konzentrationen (100 µg/ml) und einer entsprechenden Ruhephase bedingte einen Anstieg der Zellviabilität (48 h, 50 µg/ml: 131 %). Die anschließende Analyse der Zellproliferation zeigte zwei Reaktionen der Zellen nach einer Inkubation auf (Abb. 14B). Zum einen zeigten die Zellen 24 sowie 72 h nach der Inkubation keine veränderten Werte. Es konnte ausschließlich in Proben der 48 h andauernden Ruhephase eine nicht konzentrationsabhängige erhöhte Zellproliferation detektiert werden. Zuletzt wurde die Integrität der Zellmembran von HT29-Zellen untersucht (Abb. 14C). Hierbei konnten nur die Kontrollzellen einen leichten Anstieg vorweisen. Die weiteren Proben zeigten nur eine marginale LDH-Freisetzung in den Zellkulturüberstand.

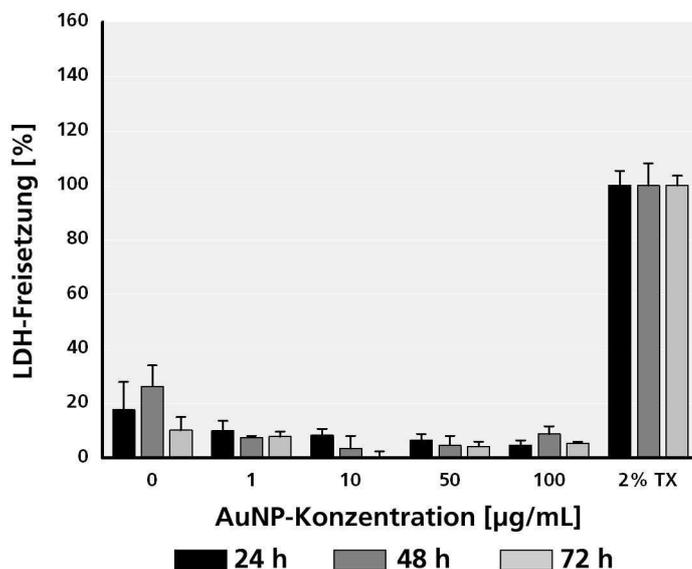
### A Zellviabilität



### B Zellproliferation



### C Zellmembranintegrität



**Abb. 14: Bestimmung von Folgeerscheinung in Anschluss an Kurzzeitinkubation mit Gold-Nanopartikeln.**

HT29-Zellen wurden mit ansteigenden Gold-Nanopartikel-Konzentrationen (AuNP; 0-100 µg/ml) für 4 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Ruheperiode von 24 h bis 72 h. Im Anschluss wurde die Zellviabilität (A; WST-1-Assay), die Zellproliferation (B; BrdU-Assay) und die Membranintegrität (C; LDH-Assay) mittels der beschriebenen Assays bestimmt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (0) bzw. mit 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mit untersucht.

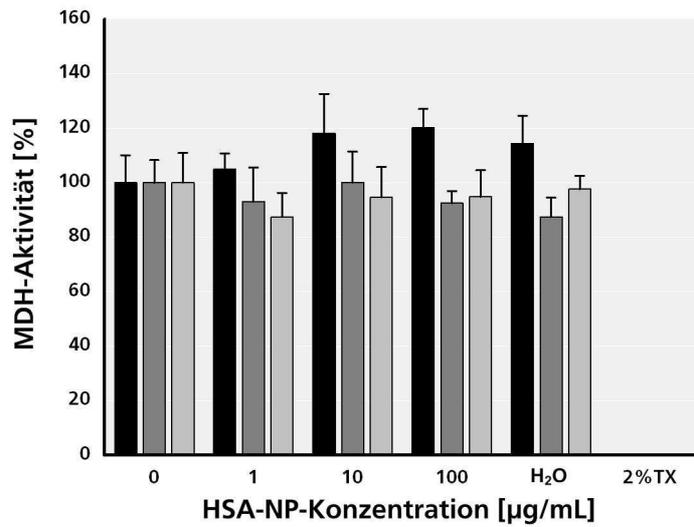
Die untersuchten Gold-Nanopartikel wiesen somit weder ein zytotoxisches Potential in Folge einer Langzeitkultivierung noch Folgeerscheinungen nach einer AuNP-Exposition auf und eignen sich für die weiteren Untersuchungen.

### **3.3.1.2 Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA)**

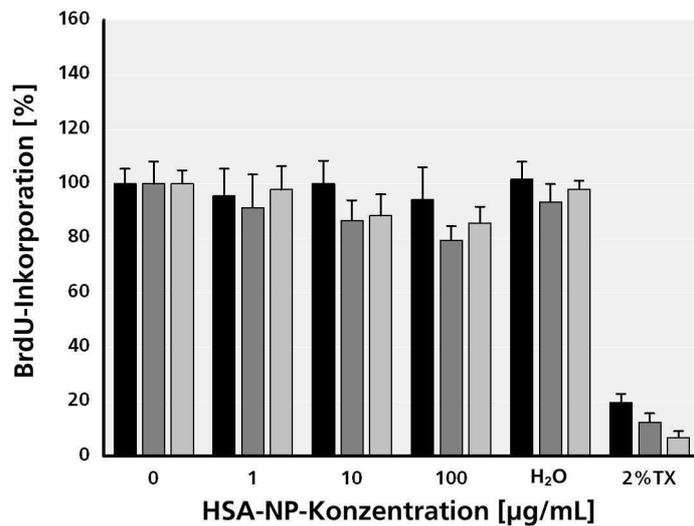
Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA) wurden ebenfalls hinsichtlich ihres Potentials zu einer Induktion von toxischen Effekten untersucht (Abb. 15). Hierzu wurden HT29-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen (1-100 µg/ml) für bis zu 72 h bei 37 °C kultiviert. Ferner wurde eine Positivkontrolle (Triton X-100), als auch eine Lösungsmittelkontrolle (Wasser) mituntersucht. Das Wasser diente hierbei als Referenz für das verwendete Nanopartikel-Lösungsmittel. Alle Untersuchungen erfolgten nach einem Mediumwechsel, beginnend mit der Bestimmung der Zellviabilität (Abb. 15A). Hierbei konnte ausschließlich eine konzentrationsabhängige, leichte Erhöhung der Zellviabilität in Folge einer 24 h Inkubation ermittelt werden. Dies konnte auch für die Lösungsmittelkontrolle bestimmt werden. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 48 bzw. 72 h bedingte keine weitere Erhöhung, jedoch eine geringe Reduktion der Zellviabilität. Die Positivkontrolle zeigte in allen Proben nur noch eine sehr gering detektierbare Viabilität (24 h: 0,12 %; 48 h: 0,08 %; 72 h: 0,15 %). Anschließend wurde die Zellproliferation in Folge der Nanopartikel-Inkubation evaluiert (Abb. 15B). HT29 zeigten hierbei nur eine geringe, zum Teil konzentrationsabhängige Reduktion der Zellproliferation in Anwesenheit von HSA-Nanopartikeln. Es konnten keine expliziten Unterschiede zu den Kontrollzellen detektiert werden. Die stärkste Reduktion erfolgte nach einer Inkubation mit 100 µg/ml für 48 h und bedingte eine Reduktion der Zellproliferation auf etwa 80 %. Die zuletzt evaluierte LDH-Aktivität bzw. Freisetzung in Folge einer anhaltenden Exposition mit HSA-Nanopartikeln zeigte eine leichte Erhöhung der LDH-Freisetzung zu allen Inkubationszeitpunkten (Abb. 15C). Die Freisetzung erfolgte hierbei weder zeit- noch konzentrationsabhängig und betrug maximal 10 % in Anlehnung an die Positivkontrolle (48 h, 100 µg/ml: 9,45 %).

Die gewonnenen Ergebnisse implizieren eine zelluläre Verträglichkeit von HSA-Nanopartikeln. Daher konnten die weitergehenden Untersuchungen vorgenommen werden.

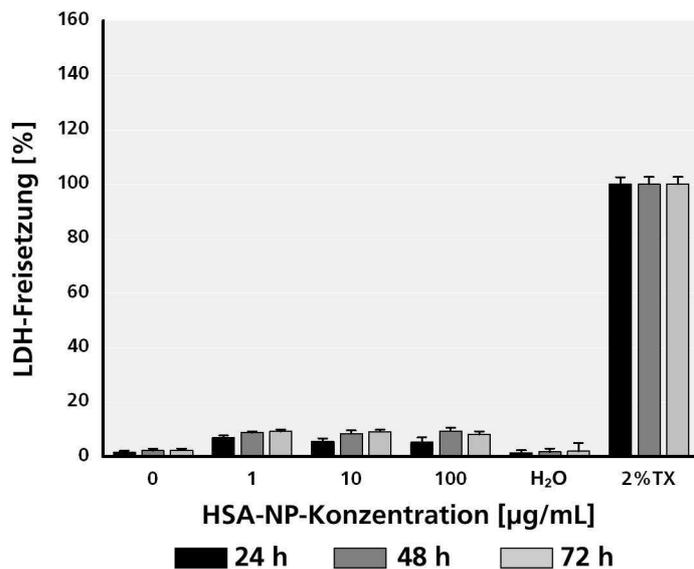
**A Zellviabilität**



**B Zellproliferation**



**C Zellmembranintegrität**



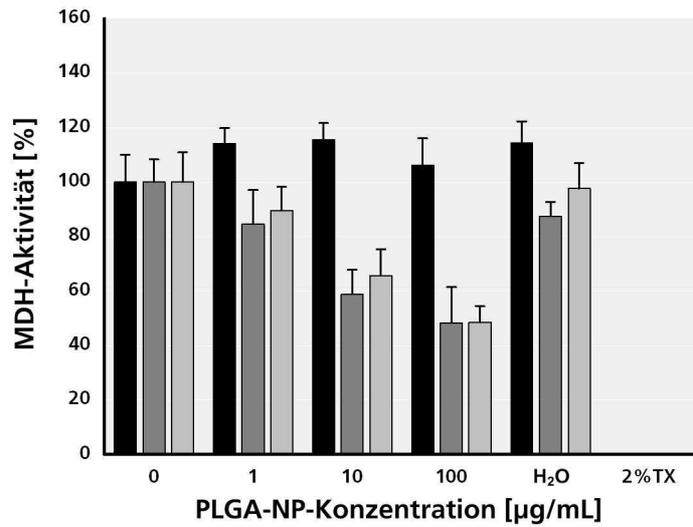
**Abb. 15: Bestimmung der Zytotoxizität in Folge einer Langzeitinkubation mit HSA-Nanopartikeln.**

HT29-Zellen wurden mit ansteigenden HSA-Nanopartikel-Konzentrationen (HSA-NP; 0-100 µg/ml) für 24, 48 und 72 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellviabilität (A; WST-1-Assay), die Zellproliferation (B; BrdU-Assay) und die Membranintegrität (C; LDH-Assay) mittels der beschriebenen Assays bestimmt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (0), mit Wasser (H<sub>2</sub>O) bzw. mit 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

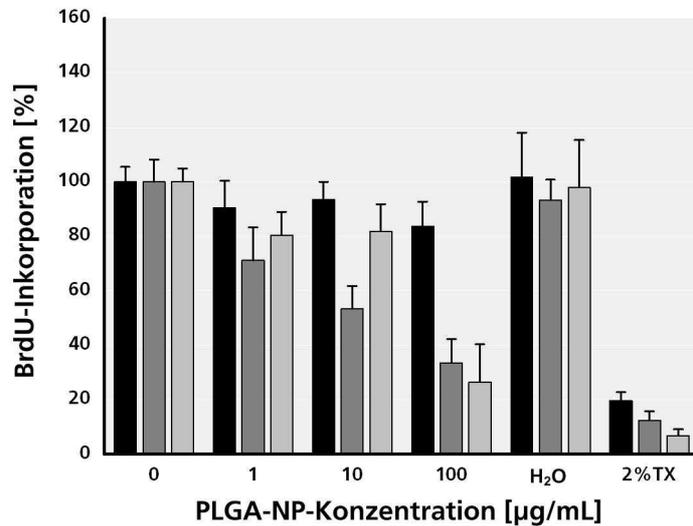
### **3.3.1.3 Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)**

Die Evaluierung einer von PLGA-Nanopartikeln (1-100 µg/ml) induzierten zellulären Toxizität erfolgte im Anschluss an unterschiedliche Inkubationszeiten (24-72 h; Abb. 16). Als Kontrolle wurden in allen Tests 2 % Triton X-100 behandelte Zellen als auch mit entsprechenden Volumina Wasser versetzte Zellen (Lösungsmittelkontrolle) untersucht. Im Folgenden traten in den Kontrollen die zu erwartenden Effekte (Positivkontrolle) bzw. ein fortlaufend konstantes Niveau (Wasserkontrolle) auf. Die anfänglich untersuchte Zellviabilität zeigte eine konzentrations- als auch zeitabhängige Reduktion (Abb. 16A). Hierbei fiel die ermittelte Viabilität auf ca. 50 % nach einer 48- und 72-stündigen Inkubation. Die einzige Ausnahme bildete hierbei die kürzeste Applikation von 24 h, die einen leichten, jedoch gleich bleibenden Anstieg aufzeigte. Für die Zellproliferation konnte ein ähnlicher Trend detektiert werden (Abb. 16B). Die Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellproliferation, die für kürzere Inkubationszeiten am geringsten ausfiel. Die maximale Reduktion der ermittelten Proliferation betrug nach 48-stündiger Inkubation 33 % und 27 % nach 72 h Inkubation mit einer Konzentration von 100 µg/ml. Die zuletzt durchgeführte Analyse der LDH-Freisetzung, als Hinweis auf eventuell vorliegende Zellmembranschädigungen, verdeutlichte einen Anstieg von freigesetztem LDH (Abb. 16C). Diese Freisetzung war zum einen konzentrationsabhängig, zum anderen zeitabhängig. Längere Inkubationen mit hohen PLGA-Konzentrationen induzierten eine Freisetzung von etwa 20 % (48 h; 100 µg/ml). Die untersuchten PLGA-Nanopartikel wiesen zwar einen Einfluss auf die Zellen auf, dieser manifestierte sich jedoch erst bei höheren Konzentrationen und länger anhaltenden Inkubationszeiten.

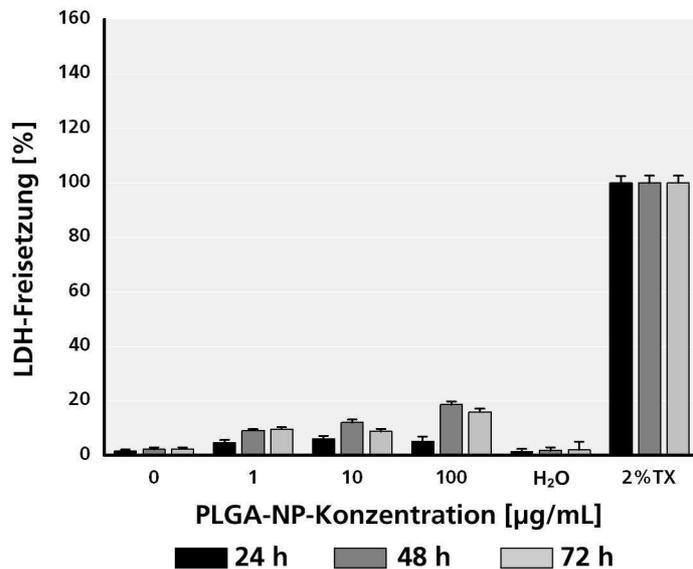
**A Zellviabilität**



**B Zellproliferation**



**C Zellmembranintegrität**



**Abb. 16: Bestimmung der Zytotoxizität in Folge einer Langzeitinkubation mit PLGA-Nanopartikeln.**

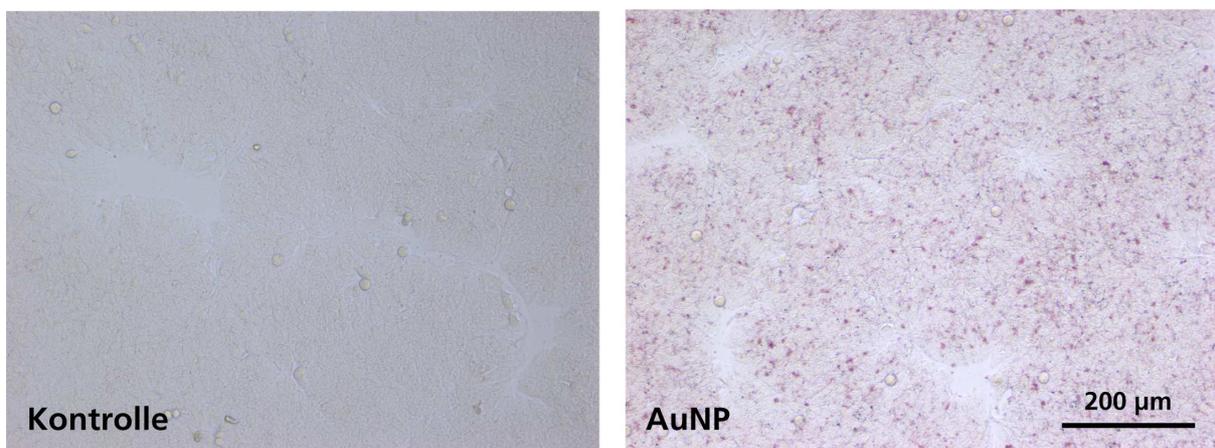
HT29-Zellen wurden mit ansteigenden PLGA-Nanopartikel-Konzentrationen (PLGA-NP; 0-100 µg/ml) für 24, 48 und 72 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellviabilität (A; WST-1-Assay), die Zellproliferation (B; BrdU-Assay) und die Membranintegrität (C; LDH-Assay) mittels der beschriebenen Assays bestimmt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (0), mit Wasser (H<sub>2</sub>O) bzw. mit 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

### 3.3.2 Zelluläre Bindung und subzelluläre Verteilung

Nach Überprüfung der unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen hinsichtlich einer Zytotoxizität wurde die zelluläre Bindung als auch die subzelluläre Akkumulation überprüft. Der Nachweis wurde hierbei zum einen mittels durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung der zellulären Bindung erbracht. Es erfolgten ebenfalls Untersuchungen mittels verschiedener Mikroskopietechniken in Abhängigkeit des untersuchten nanopartikulären Systems.

#### 3.3.2.1 Gold-Nanopartikel

Die Untersuchung der zellulären Akkumulation von Gold-Nanopartikeln erfolgte mittels unterschiedlicher Methoden. Zu Beginn konnte die Akkumulation der Nanopartikel mittels Hellfeldmikroskopie beobachtet werden. HT29-Zellen wurden hierzu mit einer konstanten Konzentration (100 µg/ml) bis zu 72 h inkubiert und die nanopartikuläre Anreicherung untersucht (Abb. 17). Es konnte eine zeitabhängige Akkumulation von Gold-Nanopartikeln in HT29-Zellen ermittelt werden (siehe Anhang, Abb. A1). Diese konnte an den rot gefärbten Ansammlungen abgelesen werden. Die Anreicherung erfolgte bereits nach 4 h und eine starke Sättigung konnte nach 24 h beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Inkubationszeit führte zu keiner visuell sichtbaren Verstärkung der Gold-Nanopartikel-Akkumulation.

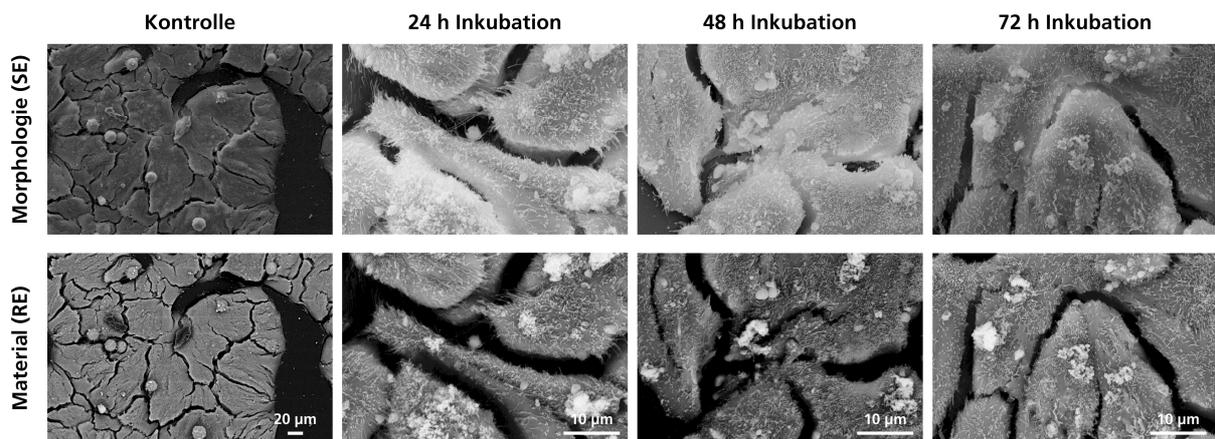


**Abb. 17: Zelluläre Bindung von Gold-Nanopartikeln an HT29-Zellen.**

HT29-Zellen wurden mit Gold-Nanopartikeln (AuNP; 100 µg/ml) für 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Hellfeld mikroskopisch dokumentiert. Akkumulierte Gold-Nanopartikel erscheinen rot.

Nachdem die zelluläre Akkumulation der Gold-Nanopartikel lichtmikroskopisch beobachtet werden konnte, wurde diese mittels Rasterelektronenmikroskopie überprüft. Aufgrund der sehr guten optischen und elektronenleitenden Eigenschaften waren die Gold-Nanopartikel hierfür sehr gut geeignet. Zu diesem Zweck wurden HT29-Zellen für 24-72 h mit Nanopartikeln einer Konzentration von 100 µg/ml kultiviert und anschließend einer etablierten Schwermetallkontrastierung zur Optimierung der

leitenden Eigenschaften unterzogen. Nach der Kontrastierung erfolgte die kritische Punkttrocknung (CPD) der Proben zur Erhaltung der zellulären Strukturen. Die Analyse der untersuchten Proben führte zur Bestätigung der Beobachtungen, die mittels Hellfeldmikroskopie erhalten wurden. Die Gold-Nanopartikel konnten auf den Zellen als akkumulierte Aggregate detektiert werden (Abb. 18). Durch die Detektion zweier unterschiedlicher Elektronensignale konnte die Zellmorphologie als auch die Materialeigenschaften sichtbar gemacht werden. Die Detektion der emittierenden Sekundärelektronen (SE) ermöglichte die Darstellung der zellulären Morphologie. Diese stimmte mit zuvor erhaltenen Beobachtungen von unbehandelten Kontrollzellen überein. Jedoch fielen auf den Zellen aufliegende Cluster auf. Durch die Wahl eines zweiten Detektors, der die tiefer liegenden Rückstreuielektronen (RE) detektiert, konnten die Cluster als angesammeltes Gold von der umliegenden zellulären Struktur abgehoben werden. Die Goldcluster zeichneten sich durch einen starken Kontrast aus und konnten auf der Zelloberfläche detektiert werden. Die Erhöhung der Inkubationszeit von 24 auf 72 h bedingte keine weitere Größenzunahme der Nanopartikelcluster. Die Beobachtungen mittels Hellfeldmikroskopie konnten somit bestätigt werden.

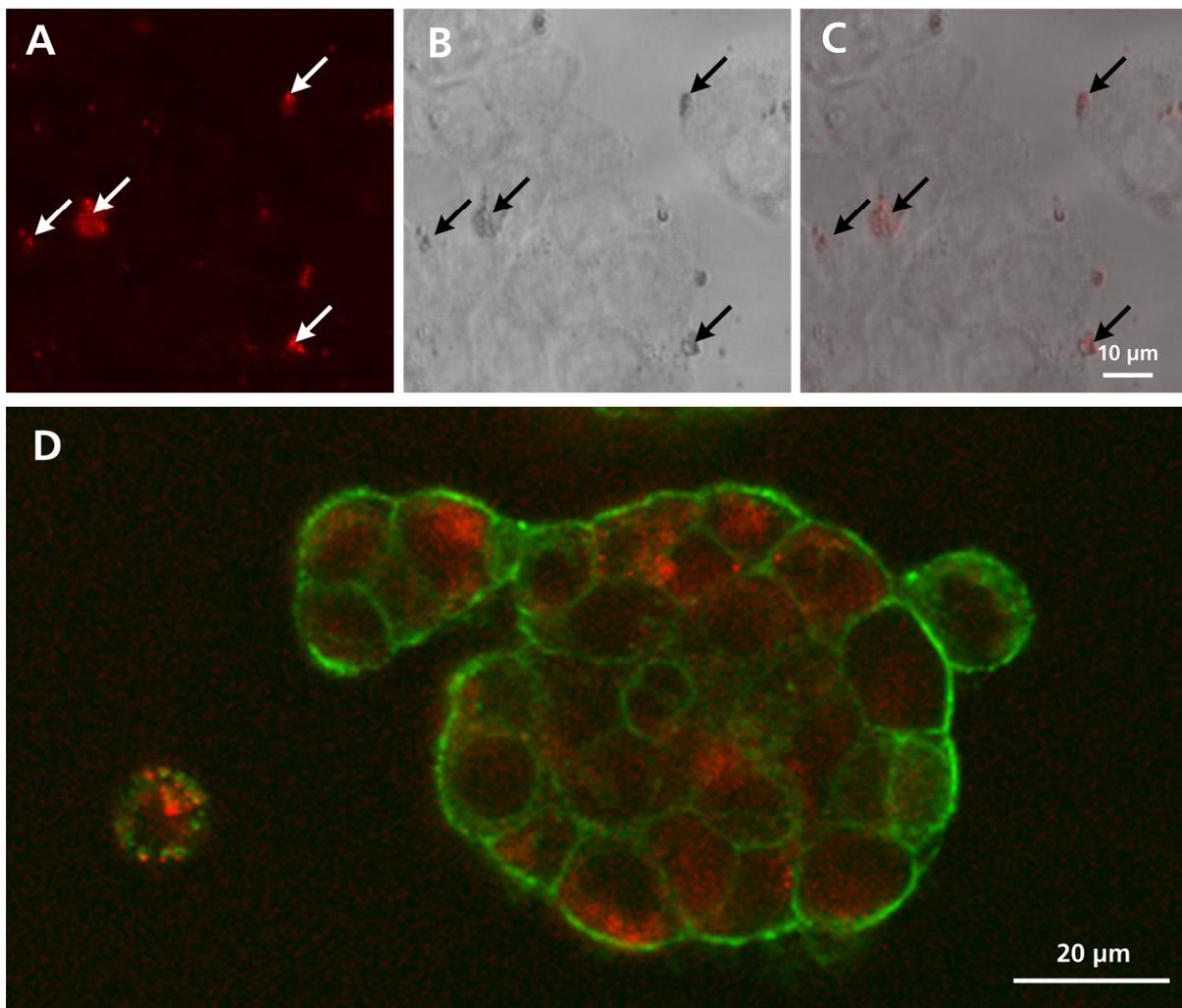


**Abb. 18: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Gold-Nanopartikeln an HT29-Zellen.**

HT29-Zellen wurden für 24-72 h mit Gold-Nanopartikeln (100 µg/ml) inkubiert und im Anschluss rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Darstellung von Sekundärelektronen (SE) zwecks Zellmorphologie und von Rückstreuielektronen (RE) zwecks Materialeigenschaft.

Im Anschluss an die vorangegangenen Untersuchungen blieb die Frage offen, ob sich die Gold-Nanopartikel nur außerhalb der Zellen befinden oder ob diese auch durch die Zellen aufgenommen werden. Um diese Frage zu beantworten, wurden HT29-Zellen mit 100 µg/ml Gold-Nanopartikeln für 24 h inkubiert und im Anschluss die Zellmembran zur Visualisierung gefärbt (Abb. 19). Die Lokalisation und Detektion der Nanopartikel innerhalb der Zelle wurde mit Hilfe einer Multiphotonen-basierten Analyse (MP-LSM) durchgeführt. Hierbei wurde ein gepulster Laser der Wellenlänge 820 nm über die Probe geführt und die Reflektion aufgenommen. Nach Reduktion des Glashintergrund-Signals,

blieb das vielfach stärkere Signal der Gold-Nanopartikel sichtbar (Abb. 19A). In einem zweiten Schritt wurde die angefärbte Zellmembran unter Verwendung des konfokalen Prinzips visualisiert. Die Überlagerung beider Messergebnisse zeigte, dass die Gold-Nanopartikel auch innerhalb der Zellen lokalisiert waren. Zur Kontrolle der erhaltenen Ergebnisse wurde von bestimmten Positionen eine Hellfeldaufnahme (Abb. 19B) angefertigt und die Positionen der Gold-Nanopartikel miteinander verglichen. Diese lagen genau übereinander (Abb. 19C). Es konnte somit bestätigt werden, dass es sich bei den Reflektionssignalen um die akkumulierten Nanopartikel handelte. Zudem konnte auch bestätigt werden, dass die Gold-Nanopartikel sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zellinneren lokalisiert waren.

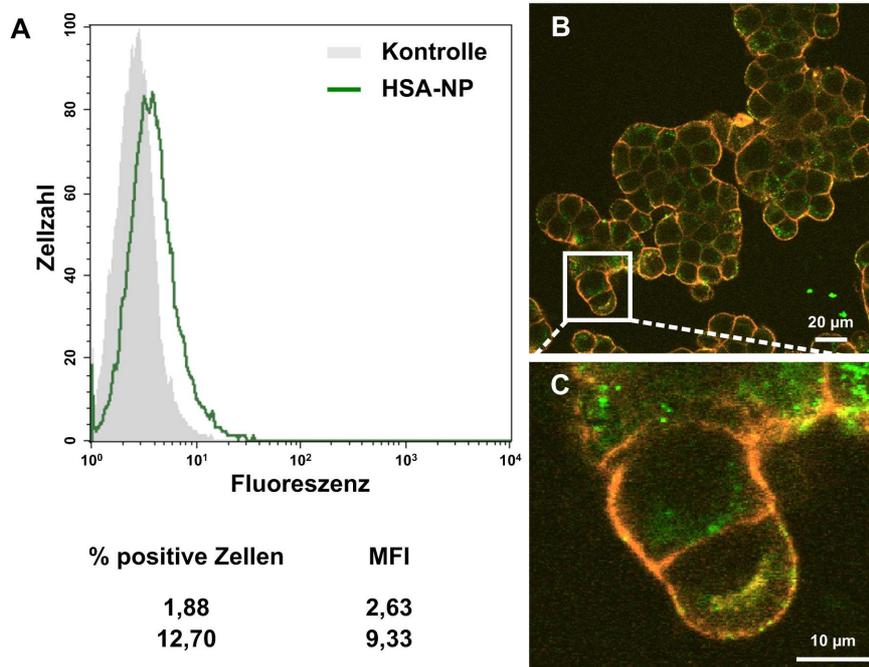


**Abb. 19: Subzelluläre Verteilung von Gold-Nanopartikeln in HT29-Zellen.**

HT29-Zellen wurden mit Gold-Nanopartikeln (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 24 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zur Visualisierung wurde die Zellmembran mittels eines Concanavalin A-Derivats (Alexa Fluor 488-gekoppelt; grün-H/K: 55) gegengefärbt und die Probe mittels CLSM und MP-LSM untersucht. (A) Detektion von Gold-Nanopartikeln via MP-LSM (rot), (B) Hellfeldaufnahme der Zellen und akkumulierten Nanopartikel, (C) Überlagerung von (A) und (B). Pfeile in (A-C) deuten auf nanopartikeluläre Cluster. (D) Intrazelluläre Akkumulation von Gold-Nanopartikeln in HT29-Zellen (AuNP: rot-H: 45).

### 3.3.2.2 Nanopartikel basierend auf humanem Serumalbumin (HSA)

Die Bestimmung der Bindung von unbeladenen HSA-Nanopartikeln erfolgte mittels Durchflusszytometrie als auch CLSM. Im Folgenden konnte aufgrund der grünen Autofluoreszenz von HSA-Nanopartikeln auf eine Modifizierung verzichtet werden, um die zelluläre Bindung verfolgen zu können. In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob die Nanopartikel an die Zellen binden. Hierzu erfolgte eine 4 h anhaltende Inkubation mit 100 µg/ml HSA-Nanopartikel und die anschließende durchflusszytometrische Analyse von 10000 Zellen. 12,70 % der untersuchten Zellen zeigten hierbei die spezifische Fluoreszenz der Nanopartikel (Abb. 20A).



**Abb. 20: Zelluläre Bindung und Akkumulation von HSA-Nanopartikeln.**

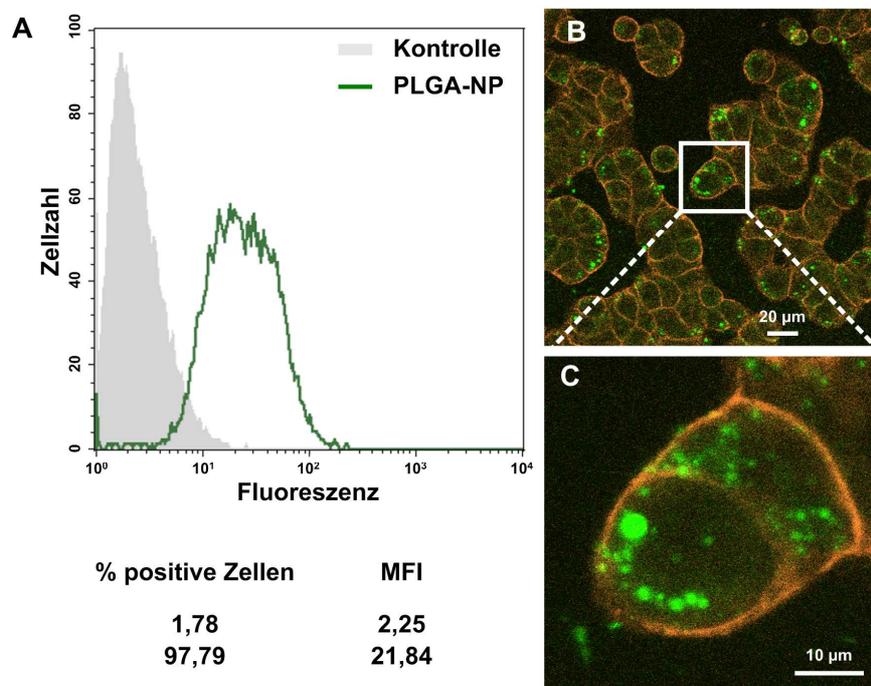
HT29-Zellen wurden mit unbeladenen HSA-Nanopartikeln (100 µg/ml) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die zelluläre Bindung mittels Durchflusszytometrie (A) sowie konfokaler Raster-Lasermikroskopie (B, C) untersucht. (A) Durchflusszytometrische Quantifizierung der zellulären Bindung. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mituntersucht. Die Daten sind sowohl als Histogramm sowie als Tabelle mit der entsprechenden Prozentzahl positiver Zellen sowie der MFI (mittleren Fluoreszenzintensität) dargestellt. Ein Experiment aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten ist dargestellt. (B, C) Für die visuelle Detektion ist die Membran mittels eines Concanavalin A-Derivates (Alexa Fluor Tetramethylrhodamin-gekoppelt; orange-H/K: 55) gegengefärbt worden. Die Nanopartikel konnten aufgrund der grünen Autofluoreszenz (H/K: 55) detektiert werden, (C) Vergrößerung aus (B) (weißen Quadrat).

Eine zelluläre Bindung von HSA-Nanopartikeln konnte bestätigt werden, jedoch konnte noch keine Aussage über die Lokalisation der nanopartikulären Formulierung getroffen werden. Daher wurde die Akkumulation mikroskopisch überprüft. Die Inkubation der Zellen erfolgte hierbei analog der durchflusszytometrischen Analyse. Für eine Visualisierung und für die Bestimmung des Aufenthaltsorts der Nanopartikel, wurde die Zellmembran mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Concanavalin A-Farbstoff

(Tetramethylrhodamin, orange) gefärbt. Diese Färbung ermöglichte es später eine Aussage zu treffen, ob die Partikel sich innerhalb oder außerhalb der gefärbten Zelle befinden. Die Analyse mittels CLSM ergab, dass die gebundenen Nanopartikel sich im Innern von HT29-Zellen befanden (Abb. 20B). Die Nanopartikel konnten hierbei deutlich als grüne Aggregate detektiert werden.

### 3.3.2.3 Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA)

Die Untersuchung der zellulären Bindung bzw. subzellulären Akkumulation von unbeladenen PLGA-Nanopartikeln erfolgte analog zu den vorherig untersuchten HSA-Nanopartikeln. Für die folgenden Untersuchungen wurden Lumogen Yellow<sup>®</sup> modifizierte PLGA-Nanopartikel verwendet, um die zelluläre Bindung nachverfolgen zu können. Die Analyse im Durchflusszytometer ergab eine, verglichen mit HSA-Nanopartikeln, gesteigerte zelluläre Bindung von 97,79 % (Abb. 21A).



**Abb. 21: Zelluläre Bindung und Akkumulation von PLGA-Nanopartikeln.**

HT29-Zellen wurden mit Lumogen Yellow<sup>®</sup>-modifizierten PLGA-Nanopartikeln (100 µg/ml) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die zelluläre Bindung mittels Durchflusszytometrie (A) sowie konfokaler Raster-Lasermikroskopie (B, C) untersucht. (A) Durchfluss-zytometrische Quantifizierung der zellulären Bindung. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mituntersucht. Die Daten sind sowohl als Histogramm sowie als Tabelle mit der entsprechenden Prozentzahl positiver Zellen sowie der MFI (mittleren Fluoreszenzintensität) dargestellt. Ein Experiment aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten ist dargestellt. (B, C) Für die visuelle Detektion ist die Membran mittels eines Concanavalin A-Derivates (Alexa Fluor Tetramethylrhodamin-gekoppelt; orange) gegengefärbt worden. Die Nanopartikel wiesen aufgrund des inkorporierten Lumogen Yellow<sup>®</sup> eine grüne Fluoreszenz auf, (C) Vergrößerung aus (B) (weißen Quadrat).

Die PLGA-Nanopartikel lagen ebenfalls im Innern der Zellen vor (Abb. 21B). Dies konnte durch eine CLSM-Analyse bestätigt werden. Die Lumogen Yellow® bedingte Fluoreszenz konnte in einer Vielzahl von HT29-Zellen detektiert werden. Die zuvor sehr hohe Bindung von PLGA-Nanopartikel an HT29-Zellen konnte somit verifiziert und darüber hinaus als eine intrazelluläre Akkumulation beschrieben werden.

Sowohl für die Gold-Nanopartikel als auch für die polymerbasierten HSA- und PLGA-Nanopartikel konnte eine zelluläre Bindung und subzelluläre Akkumulation in HT29-Zellen beobachtet werden. Die zelluläre Akkumulation fiel hierbei in Abhängigkeit der verwendeten nanopartikulären Formulierung unterschiedlich stark aus.

### **3.4 Zelluläre Bindung von freiem mTHPC**

Nachdem die unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen hinsichtlich einer vorliegenden zellulären Toxizität sowie ihrer zellulären Bindung und Akkumulation untersucht worden waren, erfolgte die Untersuchung des Photosensibilisators mTHPC. In vorangehenden Studien konnte der hydrophobe Photosensibilisator mTHPC für eine Vielzahl von Zelllinien *in vitro* charakterisiert werden. Für die folgenden Charakterisierungen wurde die zelluläre Bindung und intrazelluläre Akkumulation in HT29-Zellen untersucht. Alle Untersuchungen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Dies geschah, um eine mögliche Aktivierung des Photosensibilisators zu unterbinden.

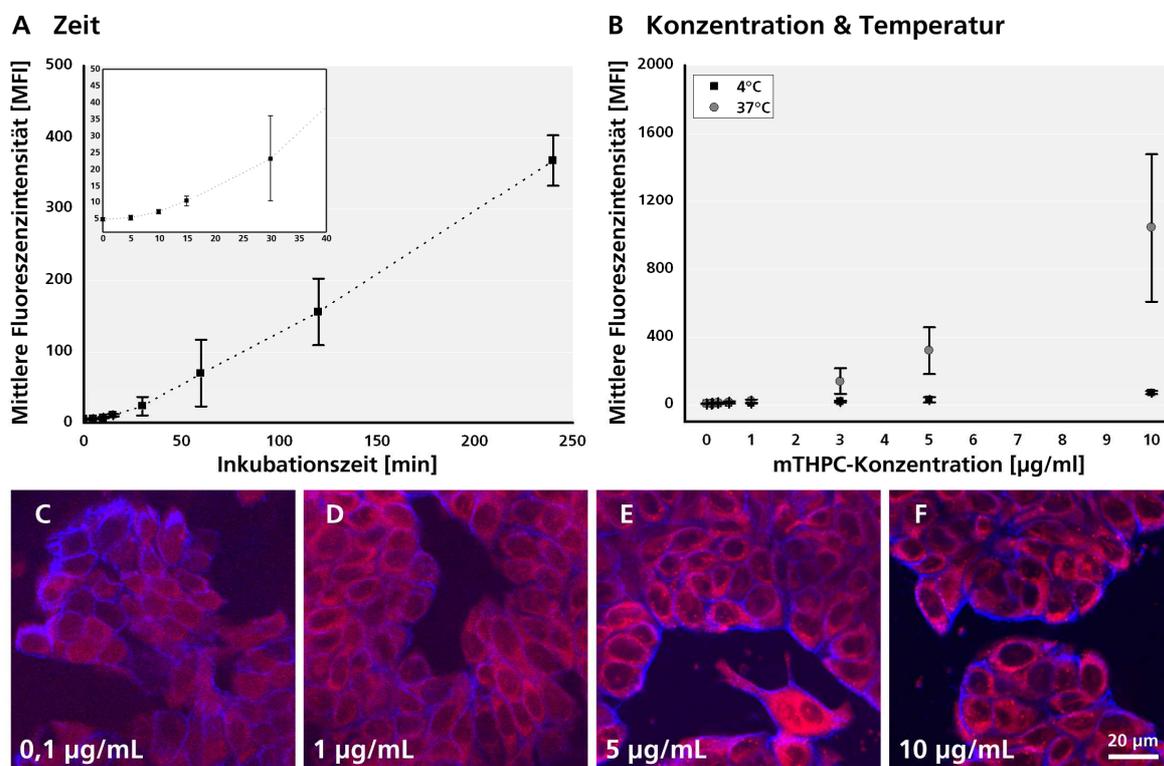
#### ***Zeitabhängige zelluläre Bindung***

In einem ersten Experiment wurde die zeitabhängige zelluläre Bindung von freiem mTHPC an HT29-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit einer konstanten Konzentration des Photosensibilisators (1 µg/ml) für 5 bis 240 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Analyse ergab eine linear ansteigende Anreicherung von mTHPC in HT29-Zellen (Abb. 22A). Mit ansteigender Expositionszeit erfolgte eine Zunahme der mTHPC-positiv detektierten Zellen. Diese schlug sich vor allem in einem Anstieg der ermittelten Fluoreszenzintensität nieder. Diese wird im weiteren Verlauf der Arbeit als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) angegeben und gibt Auskunft über die geometrischen Mittelwerte (Geo Mean) verschiedener Fluoreszenzintensitäten einer untersuchten Zellpopulation. Bereits wenige Minuten Exposition reichten hierbei aus, um die Mehrzahl der Zellpopulation deutlich anzufärben. Für die folgenden Versuche wurde die Inkubationszeit mit mTHPC auf eine Stunde festgelegt.

#### ***Konzentrations- und temperaturabhängige zelluläre Bindung***

Nachdem die relativ schnelle Bindung von mTHPC an HT29-Zellen determiniert werden konnte, erfolgte die Untersuchung der zu verwendenden mTHPC-Konzentration. Hierzu

wurden HT29-Zellen mit ansteigenden mTHPC-Konzentrationen (0,1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und nach 1 h Inkubation untersucht. Die Zugabe erfolgte sowohl unter Standardkultivierungsbedingungen bei 37 °C als auch bei einer reduzierten Inkubationstemperatur von 4°C zur Inhibierung von aktiven Aufnahmemechanismen. Die Auswertung der Ergebnisse ergab eine starke Zunahme der MFI in Abhängigkeit von der eingesetzten mTHPC-Konzentration (Abb. 22B). Die Zugabe von bereits 0,25  $\mu\text{g/ml}$  war hierbei ausreichend, um nahezu die komplette untersuchte Population anzufärben. Ausgehend von diesen Beobachtungen konnte eine mTHPC-Konzentration ausgesucht werden, die für die weiteren Versuche herangezogen werden konnte. Diese lag bei 1  $\mu\text{g/ml}$ . Durch Reduzierung der Kultivierungstemperatur auf 4 °C konnte eine stark reduzierte Fluoreszenz beobachtet werden. Die Messwerte lagen hierbei um das 10-Fache erniedrigt vor.



**Abb. 22: Bestimmung der zellulären Bindung und intrazellulären Akkumulation von freiem mTHPC in HT29-Zellen mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Raster-Lasermikroskopie.**

HT29-Zellen wurden zum einen mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1  $\mu\text{g/ml}$ ) bei 37 ° zwischen 5 und 240 min (A, Zeit) sowie mit ansteigenden mTHPC-Konzentrationen (0-10  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1 h bei 4 und 37 °C (B, Konzentration & Temperatur) inkubiert und durchflusszytometrisch zur Bestimmung der zellulären Bindung untersucht. Die Messung der zellulären mTHPC-Bindung wurde an unabhängigen Triplikaten durchgeführt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) dar. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (0) mituntersucht. (C-F) HT29-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen mTHPC (0,1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Visualisierung wurde die Zellmembran mit einem Concanavalin A-Derivat (Alexa Fluor 350-gekoppelt, blau-H/K: 55) gefärbt. Die rote Autofluoreszenz von mTHPC konnten für die Detektion verwendet werden.

### ***Intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung***

Zuletzt erfolgte eine visuelle Überprüfung der zellulären Bindung und subzellulären Verteilung des freien Photosensibilisators mTHPC. HT29-Zellen wurden mit ansteigenden mTHPC-Konzentrationen (0,1-10 µg/ml) für 1 h inkubiert. Im Anschluss an einen Zellmembranfärbung (Concanavalin A-Derivat, Alexa Fluor 350-gekoppelt, blau) erfolgte die Analyse mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie. Der aufgenommene Photosensibilisator konnte, aufgrund der induzierbaren Autofluoreszenz, im Innern der Zellen detektiert werden (Abb. 22C-F). Die Inkubation mit relativ geringen Konzentration (0,1 µg/ml) bedingte zwar eine Färbung der kompletten Zelle, jedoch fiel diese gering und zudem diffus aus (Abb. 22C). Eine Erhöhung der verwendeten mTHPC-Konzentration bedingte eine deutlichere und lokal nachweisbare Anreicherung. Die Zellen zeigten hierbei eine Verteilung des Photosensibilisators in der gesamten Zelle, jedoch nur im Zytoplasma und nicht im Nukleus (Abb. 22D-F). Die Zugabe von 1 µg/ml mTHPC reichte hierbei aus, um alle untersuchten Zellen ausreichend anzufärben (Abb. 22D). Eine weitere Erhöhung der verwendeten Photosensibilisator-Konzentration bedingte keine weitere Verbesserung (Abb. 22E,F). Daher wurde die einzusetzende mTHPC-Konzentration für CLSM basierte Analysen ebenfalls künftig mit 1 µg/ml gesetzt.

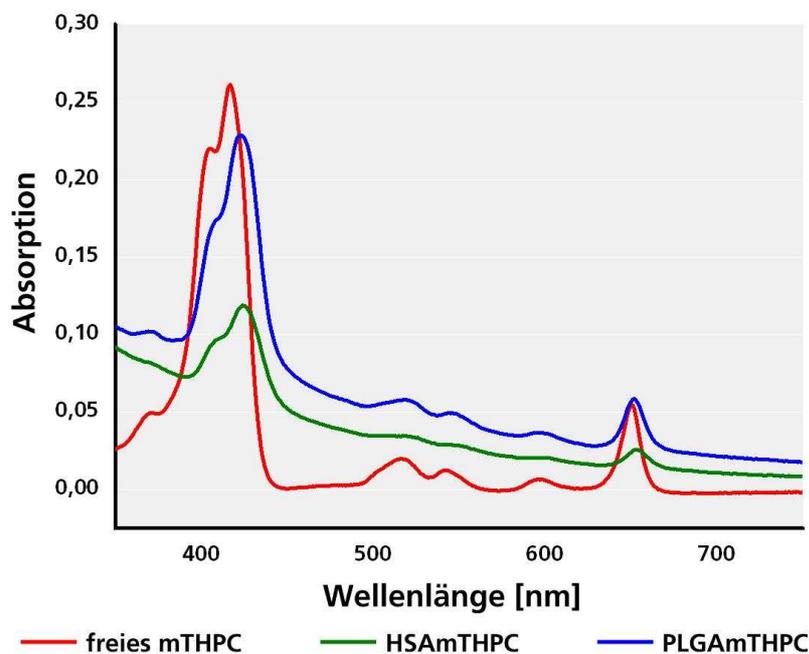
## **3.5 mTHPC-beladene Nanopartikel**

mTHPC-beladene Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer zellulären Akkumulation sowie des Transports des Photosensibilisators untersucht. Eine Untersuchung des Absorptionsspektrums sowie die Bestimmung der intrazellulären mTHPC-Akkumulation konnte aufgrund der begrenzten Nanopartikelvolumina für modifizierte Gold-Nanopartikel nicht durchgeführt werden.

### **3.5.1 Absorptionsspektren**

Die Polymer-basierten nanopartikulären Systeme bzw. das von ihnen transportierte mTHPC wurde spektroskopisch untersucht, um die Absorption bestimmen und eine Aussage über eine spätere Wirksamkeit treffen zu können. Freier und nanopartikulär-gebundener Photosensibilisator wurden in Ethanol bzw. Wasser gelöst und das Absorptionsspektrum zwischen 350 und 750 nm aufgenommen (Abb. 23). Die Auswertung der verschiedenen Spektren belegte, dass es sich in allen Fällen um ein transportiertes Chlorin handelte. Freies mTHPC zeichnete sich durch die ausgeprägte Soretbande (417 nm) sowie vier folgende Q-Banden (516, 542, 596 und 651 nm) aus. Die für die Photodynamische Therapie üblicherweise herangezogene vierte Q-Bande (651 nm) konnte deutlich im roten Wellenlängenbereich detektiert werden. Die Untersuchung von PLGA-transportierten mTHPC zeigte die charakteristischen Eigenschaften von mTHPC. Sowohl die Soret-Bande (423 nm) als auch die vier

folgenden Q-Banden (519, 546, 597 und 652 nm) konnten detektiert werden. Diese fielen jedoch nicht so ausgeprägt aus wie bei freiem mTHPC. Zudem war die Absorption im Vergleich reduziert und in den bathochromen Bereich verschoben. Die Soretbande wies hierbei ihr Maximum bei 423 nm und die vierte Q-Bande bei 652 nm auf. Zuletzt wurden mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel bzw. der transportierte Photosensibilisator untersucht. Hierbei fiel besonders die stark reduzierte Absorption auf. Die Soretbande (425 nm) war verglichen mit dem freien Photosensibilisator in ihrer Absorption um die Hälfte reduziert. Die folgenden drei Q-Banden (519, 545 und 597 nm) konnten nur noch als leichte Erhöhungen und nicht als distinkte Banden abgelesen werden. Die für die PDT wichtige Q-Bande im bathochromen Wellenlängenbereich (653 nm) lag noch als explizite Bande vor und ermöglicht somit die Aktivierung des Photosensibilisators mit rotem Licht.



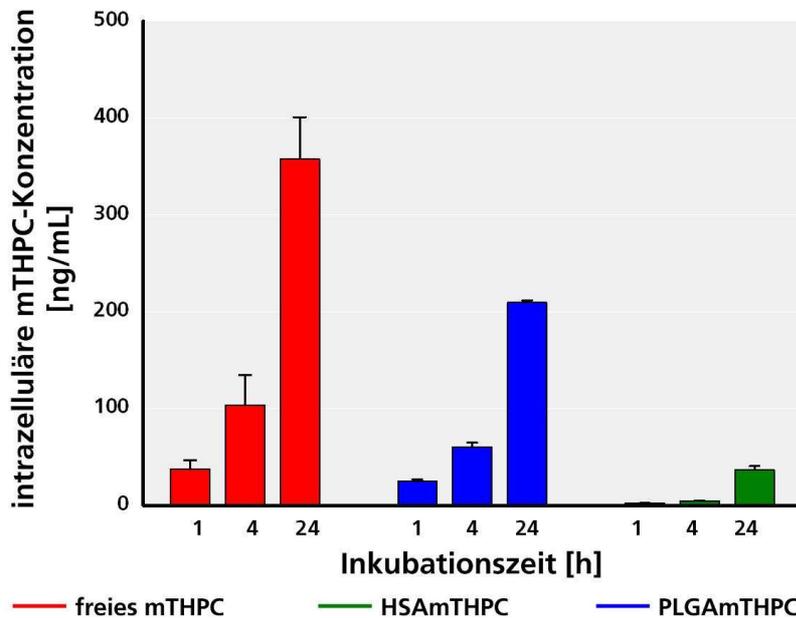
**Abb. 23: Absorptionsspektrum von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC.**

Freies und nanopartikulär gebundenes mTHPC (0,5 µg/ml) wurden in Ethanol bzw. Wasser gelöst und das Absorptionsspektrum zwischen 350 und 750 nm aufgenommen.

### 3.5.2 Zelluläre Anreicherung

Nachdem die Photosensibilisatoren hinsichtlich ihrer Absorptionsspektren untersucht worden waren, erfolgte die Bestimmung der intrazellulären mTHPC-Konzentration. HT29-Zellen wurden hierzu mit 1 µg/ml mTHPC bzw. angepassten Nanopartikel-Volumina für 1, 4 und 24 h inkubiert. Nach dem Lysieren der Zellen und dem Herauslösen des intrazellulären mTHPCs erfolgte die Bestimmung der Konzentration unter Verwendung einer Eichgerade. Die Analyse ergab eine zeitabhängige Anreicherung von freiem mTHPC in HT29-Zellen (Abb. 24). Nach einer Stunde konnten 37 ng/ml mTHPC detektiert werden. Dieser Gehalt betrug nach 24 h bereits 358 ng/ml. Sowohl für HSA- als auch PLGA-transportiertes mTHPC konnte ein ähnlicher zeitabhängiger Verlauf beobachtet werden. Dieser fiel jedoch für mTHPC, das mittels

HSA-Nanopartikel (HSAmTHPC) transportiert wurde, um ein Vielfaches geringer aus, als für PLGA-mTHPC. PLGA-transportiertes mTHPC zeigte ebenfalls einen zeitabhängigen Verlauf mit einer maximalen intrazellulären mTHPC-Konzentration von 209 ng/ml (24 h). Diese betrug für HSA lediglich 37 ng/ml.



**Abb. 24: Zelluläre Anreicherung von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC.**

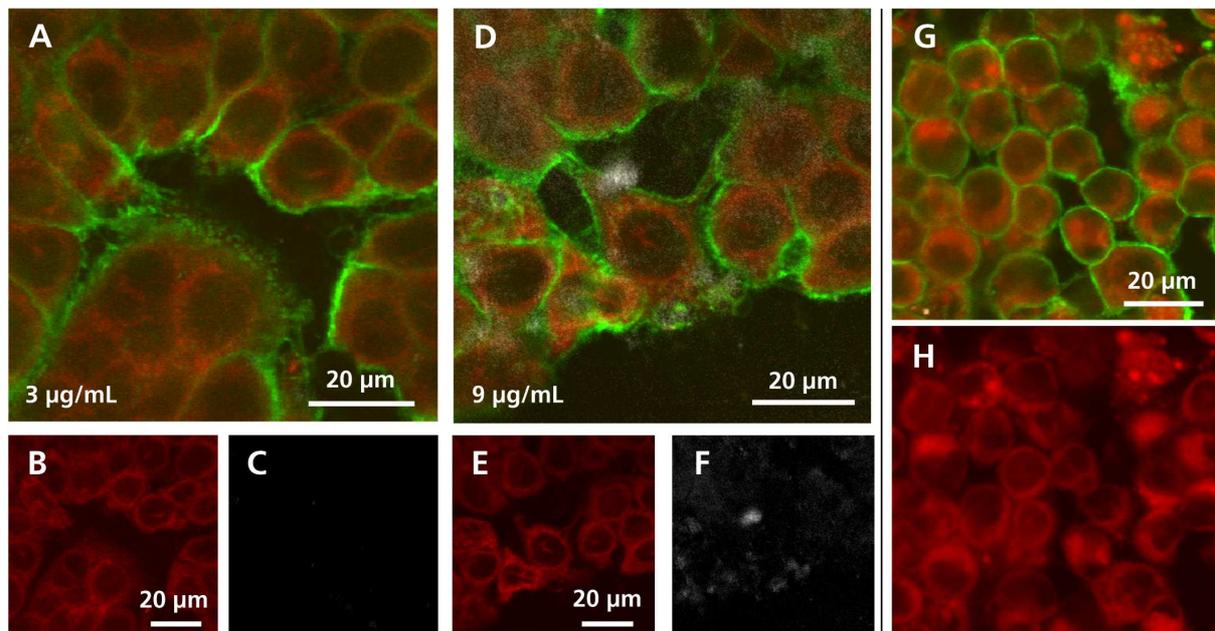
HT29-Zellen wurden mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (freies und nanopartikulär gebunden, 1 µg/ml) für 1, 4 und 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und der herausgelöste Photosensibilisator in EtOH aufgenommen und vermessen. Die Messung der zellulären Anreicherung wurde an Triplikaten durchgeführt.

### 3.5.3 Zelluläre Bindung und subzelluläre Verteilung

#### 3.5.3.1 mTHPC-beladene Gold-Nanopartikel

Die Analyse der subzellulären Akkumulation und zellulären Freisetzung von mTHPC wurde mittels CLSM sowie MP-LSM untersucht. In vorangegangenen Studien konnte MP-LSM als Methode zum Nachweis von AuNP innerhalb von Zellen evaluiert werden (Abb. 19). HT29 wurden hierzu mit den entsprechenden Formulierungen (eingesetzte mTHPC-Konzentration: 3 und 9 µg/ml) für 24 h kultiviert und im Anschluss einer Analyse unterzogen. Als Kontrollen wurden Zellen mituntersucht, die zuvor mit den entsprechenden Konzentrationen an freiem Photosensibilisator inkubiert wurden. Die Evaluierung der mTHPC-Freisetzung verdeutlichte einen Transport des Photosensibilisators durch die Gold-Nanopartikel in die untersuchten Zellen (Abb. 25). Innerhalb der Zellen bzw. innerhalb des Zytoplasmas konnte die charakteristische mTHPC-Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 25B,E). Die MP-LSM gestützte Detektion der Gold-Nanopartikel verdeutlichte eine Akkumulation der Nanopartikel an der Zellmembran (Abb. 25D) als auch innerhalb der gefärbten Zellen (Abb. 25A). Es konnte keine Überlagerung von Gold-Nanopartikeln und mTHPC detektiert werden. Die Kontrollzellen, also Zellen die mit freiem mTHPC inkubiert wurden, wiesen ebenfalls die charakteristische Fluoreszenz innerhalb des kompletten Zytoplasmas auf (Abb. 25H).

Jedoch zeigten die Zellen eine veränderte Morphologie (Abb. 25G). Die Zellen erschienen abgerundet und aus dem Zellverband herausgelöst. Der Vergleich mit Zellen, die zuvor mit nanopartikulär-gebundenem mTHPC versetzt wurden, zeigte die Veränderung deutlich auf. Diese behielten ihre Struktur und bildeten einen soliden Monolayer. Aufgrund einer zytotoxischen Wirkung von freiem mTHPC in hohen Konzentrationen (9  $\mu\text{g/ml}$ ) konnten keine Aufnahmen von entsprechend kultivierten Zellen aufgenommen werden. Die Zellen waren gänzlich vom Untergrund gelöst und konnten daher nicht untersucht werden. Zusammenfassend konnte mTHPC in allen Proben nachgewiesen werden. mTHPC-beladene Gold-Nanopartikel transportierten dieses zu den Zellen und ermöglichten die dortige Freisetzung in die Zellen. Die Morphologie und die Monolayer-Struktur blieben in Folge der Inkubation erhalten. Dagegen erschienen die mit entsprechenden mTHPC-Konzentrationen (frei) inkubierten Zellen in ihrer Morphologie und zellulären Anordnung verändert.

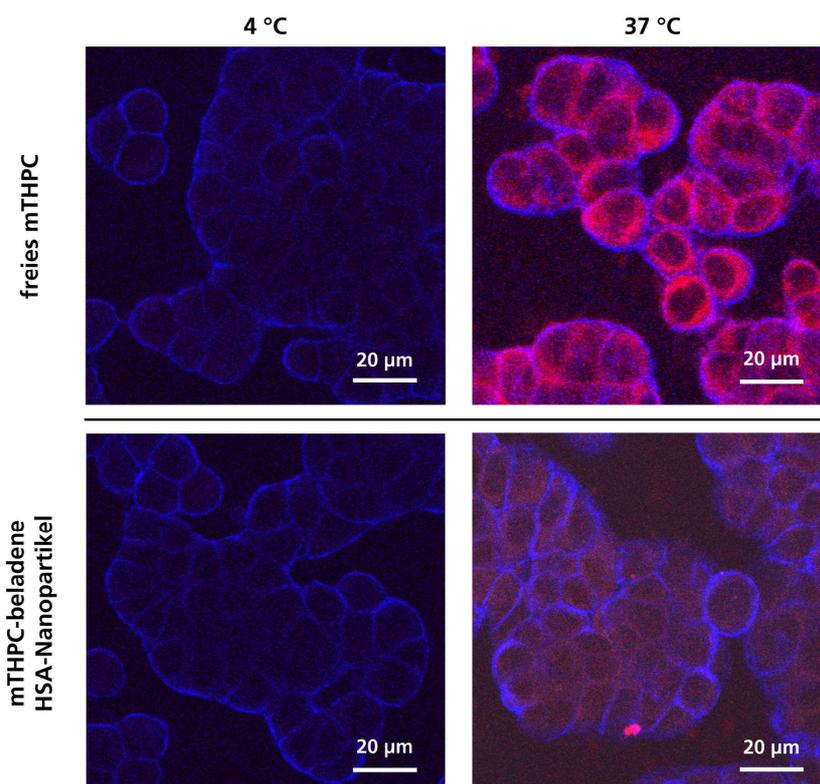


**Abb. 25: Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC (Gold-Nanopartikel).**

HT29-Zellen wurden auf Glasobjektträgern kultiviert und mit freiem mTHPC (G, H; 3  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie mit mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikeln (A-C: 3  $\mu\text{g/ml}$  mTHPC-Konzentration; D-F: 9  $\mu\text{g/ml}$  mTHPC-Konzentration) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Für die Detektion wurde die Zellmembran mittels eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Concanavalin A-Derivats (grün-H/K:60) gefärbt. Die rote Autofluoreszenz (H/K: 60) des Photosensibilisators und die Multiphotonen-induzierte Reflexion von Gold-Nanopartikel (AuNP, weiß-H/K: 40/60) wurden für die Visualisierung verwendet. (A-F) Akkumulation von mTHPC-beladenen AuNP, (G, H) Akkumulation von freiem mTHPC, (B, E, H) rote Autofluoreszenz von mTHPC sowie (C, F) akkumulierte AuNP (weiß).

### 3.5.3.2 mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel

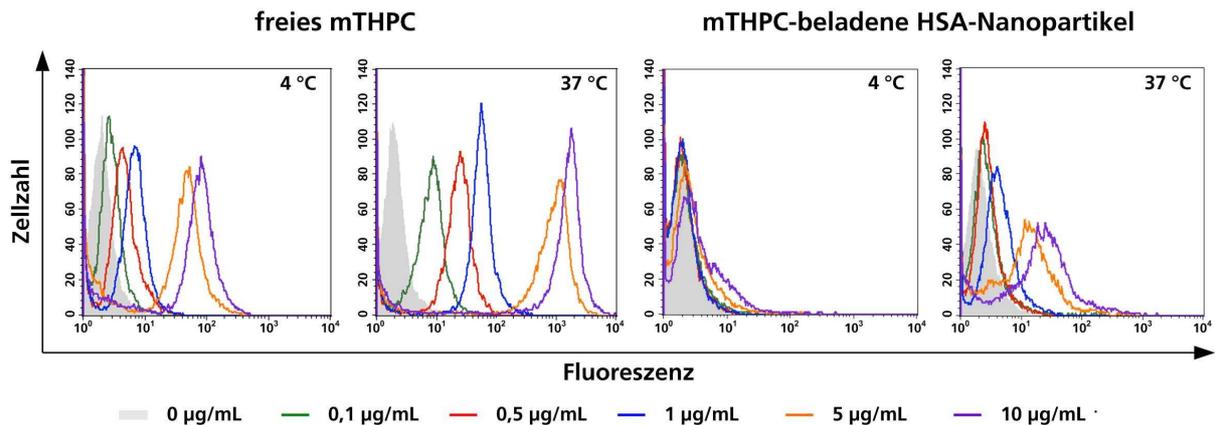
Die Untersuchung der zellulären Akkumulation von mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln erfolgte an HT29-Zellen, die auf Glasobjektträgern kultiviert und mit der entsprechenden Formulierung (eingesetzte mTHPC-Konzentration: 1 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert worden waren. Neben dem nanopartikelgebundenem Photosensibilisator wurde auch freies mTHPC (1 µg/ml) zur Inkubation eingesetzt. Nach Anfärben der Zellmembran erfolgte die CLSM-Analyse. Zellen, die bei 4 °C mit den unterschiedlichen Formulierungen inkubiert wurden, zeigten keine Fluoreszenzsignale innerhalb des Zytoplasmas (Abb. 26). Es konnte nur die gefärbten Zellmembranen visualisiert werden. Die Inkubation bei 37 °C bedingte eine Anfärbung des kompletten Zytoplasmas mit mTHPC. Sowohl freies als auch nanopartikelgebundenes mTHPC füllte die ganze Zelle aus. Es konnten keine nanopartikelgebundenen Cluster innerhalb der gefärbten Zellen ermittelt werden. Zusammenfassend konnte die Anreicherung von mTHPC durch Reduktion der Temperatur beeinflusst werden.



**Abb. 26: Intrazelluläre Akkumulation von mTHPC und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in HT29-Zellen bei 4 & 37 °C.**

HT29-Zellen wurden mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1 µg/ml) für 1 h bei 4 oder 37 °C inkubiert. Zur Visualisierung wurde die Zellmembran mit einem Concanavalin A-Derivat (Alexa Fluor 350-gekoppelt; blau-H/K:55) gefärbt. Die rote Autofluoreszenz von mTHPC (H/K: 55) konnte zur Detektion herangezogen werden.

Neben der visuellen Untersuchung der zellulären Anreicherung mittels CLSM wurde die zelluläre Bindung auch unter Verwendung von durchflusszytometrischen Analysen untersucht. Dementsprechend wurden HT29-Zellen mit ansteigenden mTHPC-Konzentrationen (freies als auch nanopartikelgebundenes; 0-10 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert und anschließend die Bindung ermittelt. Freies mTHPC zeigte eine konzentrationsabhängige Anreicherung sowohl bei 4 als auch bei 37 °C (Abb. 27; Tab. 7).



**Abb. 27: Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln.**

Zur Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC sowie nanopartikulär-gebundenem mTHPC (HSA-Nanopartikel) wurden HT29-Zellen mit ansteigenden Photosensibilisator-Konzentrationen (0-10 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert und anschließend die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Dargestellt sind die Daten als Histogramme des Fluoreszenzkanals (Autofluoreszenzbereich des Photosensibilisators). Dargestellt ist ein Experiment aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Durch Reduktion der Inkubationstemperatur auf 4 °C konnte die zelluläre Bindung jedoch stark reduziert werden. Sowohl der Anteil an positiv detektierten Zellen als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zeigten eine deutliche Reduktion (Tab. 7). Die Inkubation mit mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln bei 37 °C bedingte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Anreicherung (Abb. 27). Diese fiel jedoch deutlich geringer aus als eine Vergleichbare mit freiem mTHPC.

**Tab. 7: Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln mittels Durchflusszytometer (n=3).**

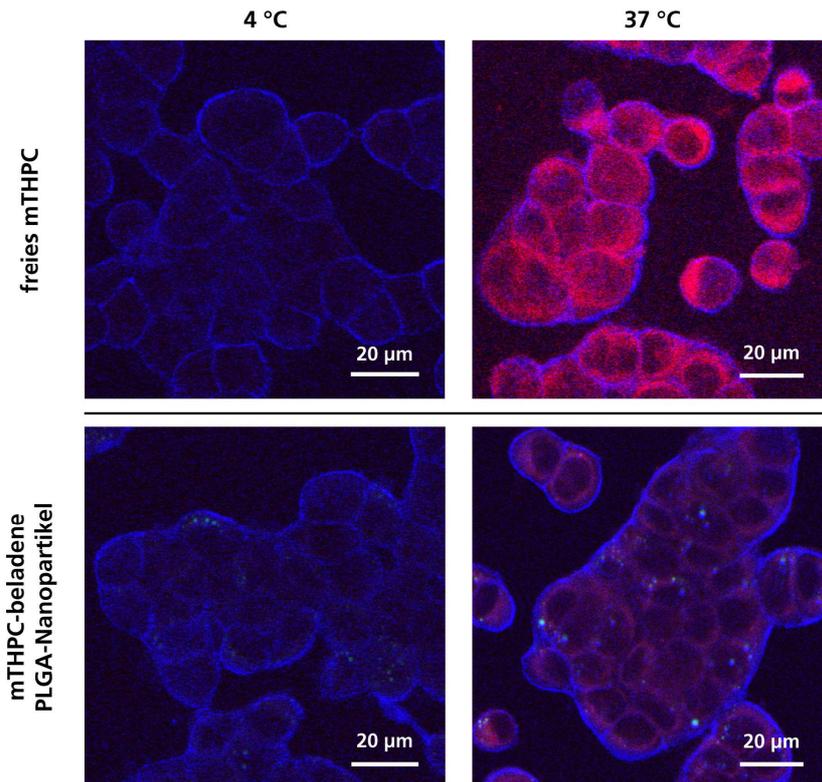
	mTHPC-Konzentration [µg/ml]	4 °C		37 °C	
		% positive Zellen	MFI	% positive Zellen	MFI
freies mTHPC	0	2,52 ± 1,05	6,83 ± 1,36	1,83 ± 0,11	5,35 ± 0,60
	0,1	5,12 ± 2,35	7,07 ± 1,18	43,67 ± 31,04	6,17 ± 0,16
	0,5	28,92 ± 18,98	7,83 ± 1,00	92,30 ± 8,65	13,71 ± 6,34
	1	46,65 ± 30,14	8,31 ± 0,64	97,69 ± 2,19	20,22 ± 9,94
	5	96,89 ± 2,38	28,26 ± 15,45	99,81 ± 0,15	322,36 ± 136,90
	10	99,40 ± 0,28	71,30 ± 8,90	99,81 ± 0,11	1045,15 ± 435,21
mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel	0	1,81 ± 0,16	7,08 ± 0,44	1,84 ± 0,19	6,68 ± 0,25
	0,1	2,87 ± 1,04	7,79 ± 0,48	8,81 ± 5,60	7,82 ± 1,03
	0,5	2,68 ± 0,61	7,68 ± 0,62	16,30 ± 12,33	7,29 ± 0,09
	1	3,10 ± 1,21	7,88 ± 0,50	35,90 ± 13,24	7,67 ± 0,05
	5	8,06 ± 3,44	9,49 ± 2,11	90,22 ± 8,82	15,12 ± 1,60
	10	16,87 ± 9,86	10,43 ± 1,68	96,79 ± 4,14	24,22 ± 2,21

MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

Nach Erniedrigung der äußeren Temperatur auf 4 °C und der anschließenden Bestimmung der zellulären Bindung konnte nur noch bei hohen Konzentrationen des partikel-gebundenen Wirkstoffs (5 und 10 µg/ml; Abb. 27; Tab. 7) eine Bindung detektiert werden. Die anderen untersuchten Proben zeigten keinerlei zelluläre Interaktion.

### **3.5.3.3 mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel**

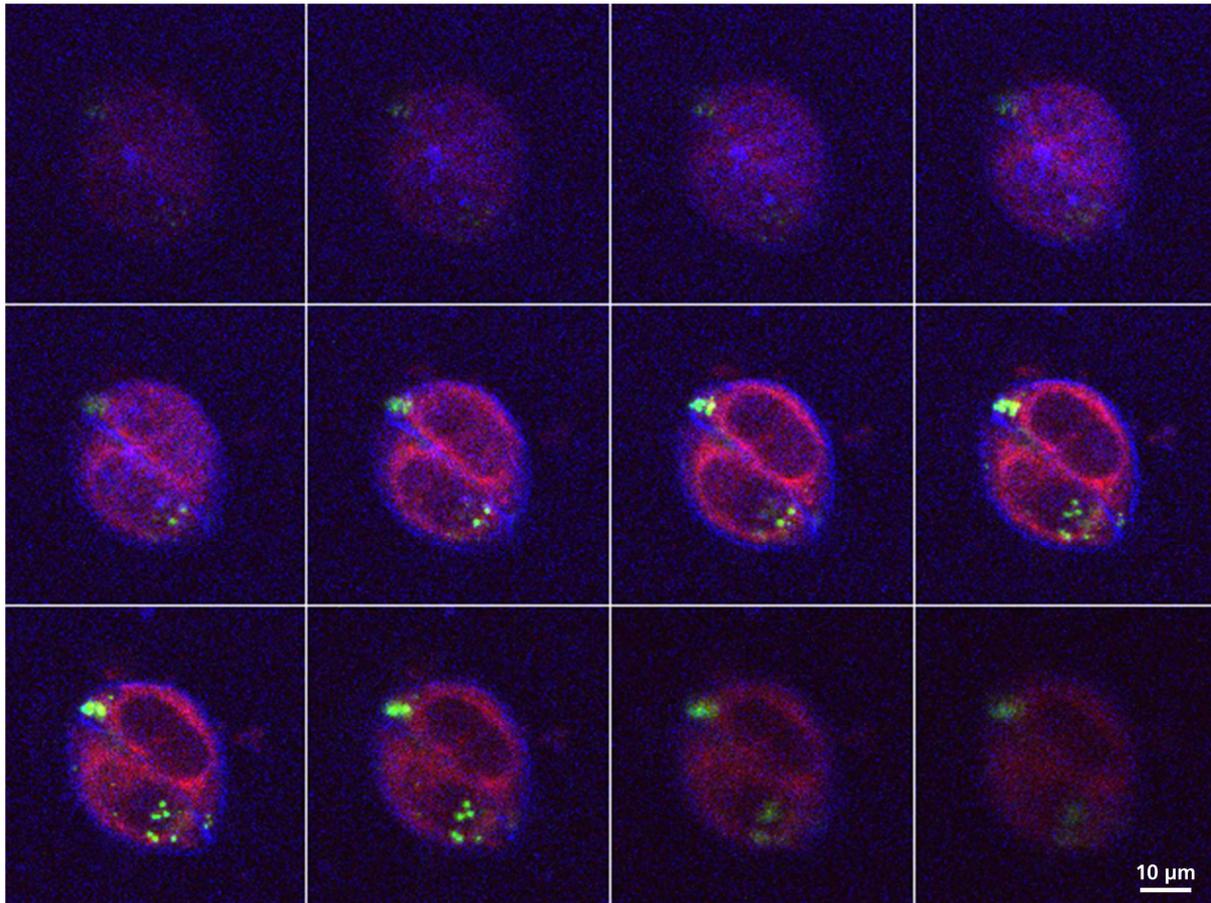
Zur Untersuchung der zellulären Akkumulation von mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikel wurden HT29-Zellen auf Glasobjektträgern kultiviert und mit der entsprechenden Formulierung (eingesetzte mTHPC-Konzentration: 1 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert. Die Nanopartikel wiesen ferner inkorporiertes Lumogen Yellow® in ihrer Matrix auf, das im späteren Verlauf die Detektion der Nanopartikel ermöglichte. Neben dem nanopartikel-gebundenen Photosensibilisator wurde auch freies mTHPC (1 µg/ml) zur Untersuchung eingesetzt. Nach Anfärben der Zellmembran erfolgte die CLSM-Analyse. Zellen, die bei 4 °C mit den unterschiedlichen Formulierungen inkubiert wurden, zeigten keine charakteristische mTHPC-Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas (Abb. 28). Es konnten ausschließlich die gefärbten Zellmembranen sowie vereinzelte PLGA-Nanopartikel visualisiert werden. Die Inkubation bei 37 °C bedingte eine Anfärbung des kompletten Zytoplasmas mit mTHPC. Sowohl freies als auch nanopartikel-gebundenes mTHPC füllte die ganze Zelle aus. Ferner konnten distinkte nanopartikel-Cluster innerhalb der gefärbten Zellen ermittelt werden. Zusammenfassend zeigte PLGA-transportiertes mTHPC eine deutliche zelluläre Interaktion, die durch Reduktion der Temperatur verringert werden konnte.



**Abb. 28: Intrazelluläre Akkumulation von mTHPC und mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln in HT29-Zellen bei 4 & 37 °C.**

HT29-Zellen wurden mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert. Zur Visualisierung wurde die Zellmembran mit einem Concanavalin A-Derivat (Alexa Fluor 350 gekoppelt; blau-H/K: 55) gefärbt. Die rote Autofluoreszenz von mTHPC (H/K: 55) konnte zur Detektion herangezogen werden. Die Nanopartikel wiesen aufgrund des inkorporierten Lumogen eine grüne Fluoreszenz auf.

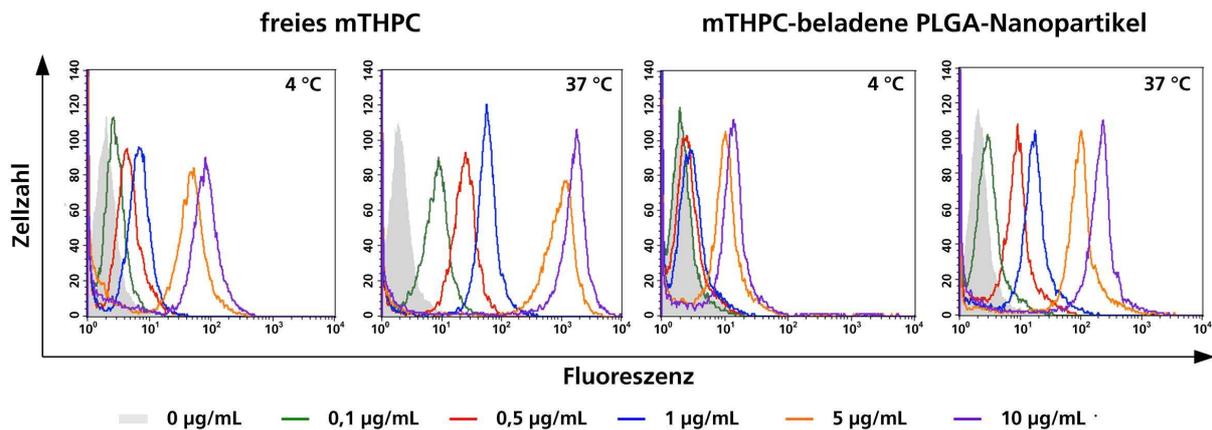
Zur Bestimmung des Aufenthaltsorts von mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln wurde von ausgewählten Bereichen eine Schnittfolge in Z-Richtung erstellt. In einem Abstand von 1 µm wurde der entsprechende Bereich analysiert und die erhaltenen Signale übereinander gelegt (Abb. 29). Entsprechend den vorangegangenen Untersuchungen konnte der Photosensibilisator mTHPC gemäß seiner roten Autofluoreszenz innerhalb der ganzen Zellen detektiert werden. Der Nukleus blieb entsprechend ungefärbt. Neben der charakteristischen mTHPC-Färbung konnten vereinzelte PLGA-Nanopartikel-Cluster visualisiert werden. Diese befanden sich innerhalb der angefärbten Zellmembran und somit im Innern der Zelle.



**Abb. 29: Zelluläre Akkumulation von PLGA<sub>m</sub>THPC in HT29.**

HT29-Zellen wurden mit mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln (konstante mTHPC-Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die rote Autofluoreszenz des Photosensibilisators mTHPC (H/K: 55) und die grüne Fluoreszenz des inkorporierten Lumogen Yellow<sup>®</sup> wurden für die Detektion verwendet. Die Zellmembran wurde mit einem Concanavalin A-Derivat (Alexa Fluor 350-gekoppelt; blau-H/K: 55) gefärbt. In einem Abstand von 1  $\mu\text{m}$  in Z-Achse wurde eine Schnittfolge erzeugt.

Anschließend erfolgte die Ermittlung der zellulären Bindung mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden HT29-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an freiem als auch nanopartikulär-gebundenem mTHPC (0-10  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1 h bei 4 bzw. 37 °C inkubiert und untersucht. Der freie Photosensibilisator zeigte sowohl bei 4 als auch bei 37 °C eine konzentrationsabhängige zelluläre Bindung (Abb. 30), die jedoch durch die Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 4 °C deutlich reduziert werden konnte (Abb. 30; Tab. 8). Das nanopartikulär-gebundene mTHPC zeigte einen identischen Trend bei 4 als auch 37 °C (Abb. 30). Mit ansteigenden mTHPC- bzw. Nanopartikel-Konzentrationen konnte eine Verschiebung der untersuchten Fluoreszenz, als Indiz für eine verstärkte Bindung, beobachtet werden (0,1  $\mu\text{g/ml}$ : MFI  $7,38 \pm 1,32$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ : MFI  $326,55 \pm 132,82$ ). In Folge der Temperaturerniedrigung auf 4 °C konnte die zelluläre Bindung ebenfalls reduziert werden (Abb. 30; Tab. 8). Nur noch die Zugabe von hohen Konzentrationen (5 und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) von nanopartikulär-transportierten Wirkstoff ermöglichte eine Detektion von zellulär gebundenem mTHPC.



**Abb. 30: Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln.**

Zur Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC sowie nanopartikulär-gebundenem mTHPC (PLGA-Nanopartikel) wurden HT29-Zellen mit ansteigenden Photosensibilisator-Konzentrationen (0-10 µg/ml) für 1 h bei 4 und 37 °C inkubiert und anschließend die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Dargestellt sind die Daten als Histogramme des Fluoreszenzkanals (Autofluoreszenzbereich des Photosensibilisators). Dargestellt ist ein Experiment aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

**Tab. 8: Bestimmung der zellulären Bindung von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels Durchflusszytometer (n=3).**

	mTHPC-Konzentration [µg/ml]	4 °C		37 °C	
		% positive Zellen	MFI	% positive Zellen	MFI
freies mTHPC	0	2,52 ± 1,05	6,83 ± 1,36	1,83 ± 0,11	5,35 ± 0,60
	0,1	5,12 ± 2,35	7,07 ± 1,18	43,67 ± 31,04	6,17 ± 0,16
	0,5	28,92 ± 18,98	7,83 ± 1,00	92,30 ± 8,65	13,71 ± 6,34
	1	46,65 ± 30,14	8,31 ± 0,64	97,69 ± 2,19	20,22 ± 9,94
	5	96,89 ± 2,38	28,26 ± 15,45	99,81 ± 0,15	322,36 ± 136,90
	10	99,40 ± 0,28	71,30 ± 8,90	99,81 ± 0,11	1045,15 ± 435,21
mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel	0	1,94 ± 0,12	7,75 ± 1,83	2,00 ± 0,03	7,05 ± 1,26
	0,1	1,29 ± 0,34	8,35 ± 2,14	14,44 ± 5,63	7,38 ± 1,32
	0,5	3,47 ± 0,57	7,87 ± 2,08	89,51 ± 9,88	12,82 ± 3,79
	1	9,52 ± 9,78	9,29 ± 2,27	98,40 ± 1,43	28,76 ± 11,14
	5	85,42 ± 8,84	11,22 ± 1,70	99,63 ± 0,10	160,90 ± 65,38
	10	95,88 ± 3,35	15,79 ± 2,27	99,61 ± 0,14	326,55 ± 132,82

MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

Zusammenfassend zeigten freies als auch nanopartikulär-gebundenes mTHPC (HSA und PLGA) eine konzentrationsabhängige Anreicherung in HT29-Zellen. Diese Bindung konnte durch die vorliegende Temperatur (4 oder 37 °C) beeinflusst werden. Die untersuchten nanopartikulären Systeme transportierten den untersuchten Photosensibilisator somit effektiv in die untersuchten Zellen.

### 3.6 Bestimmung der Photozytotoxizität

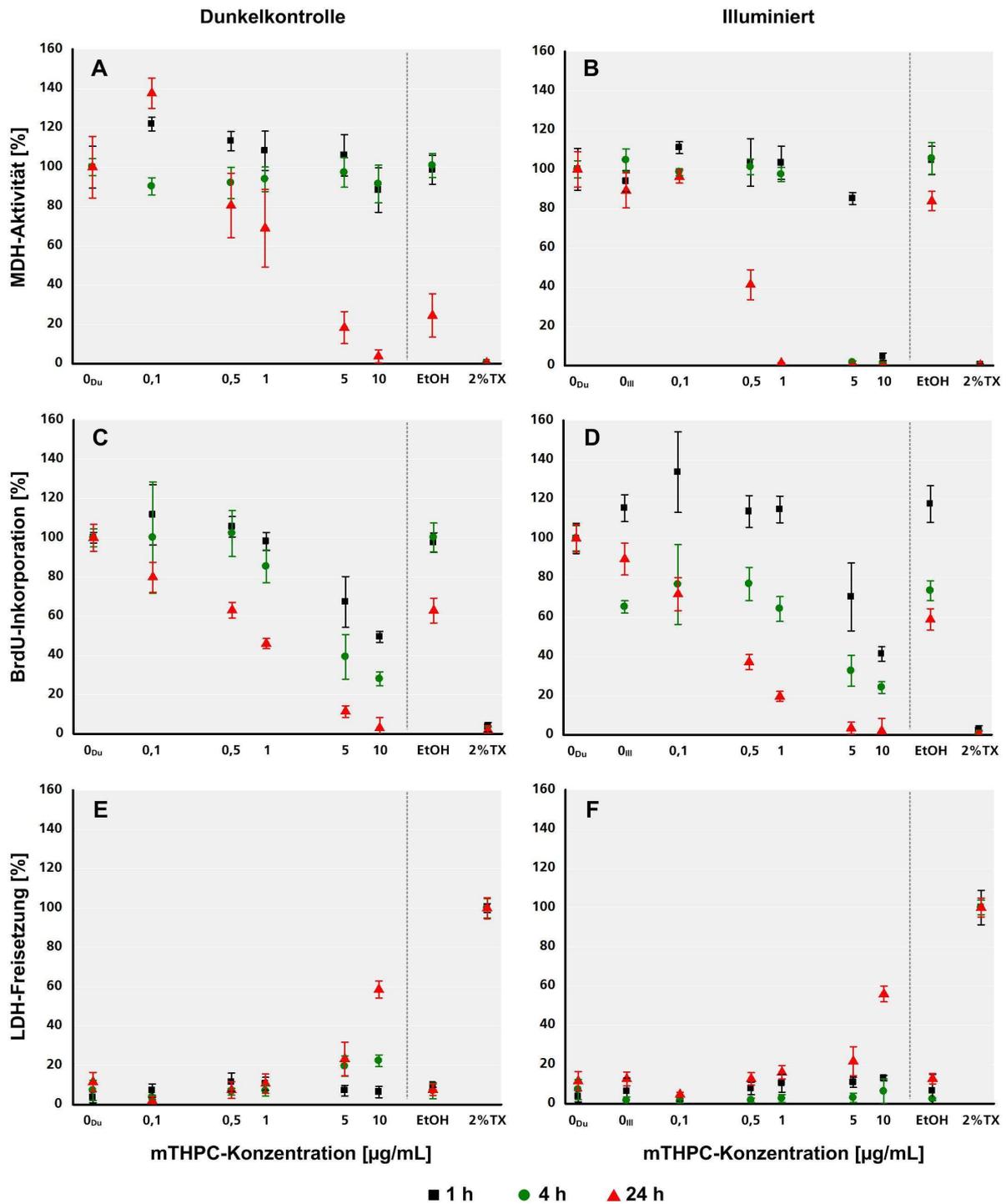
Im Anschluss an die Bestimmung des Wirkstofftransportes durch die verschiedenen nanopartikulären Systeme und der Freisetzung von mTHPC aus diesen in die Zellen, wurden die entwickelten Arzneistoff-Trägersysteme hinsichtlich ihrer Effektivität untersucht. Zur Bestimmung der Effektivität wurden neben der induzierten Photozytotoxizität auch apoptotische Ereignisse nachgewiesen.

#### 3.6.1 Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität

Die Untersuchung bezüglich der Effektivität des Photosensibilisators mTHPC bzw. der entwickelten Arzneistoff-Trägersysteme und die daraus resultierende Photozytotoxizität erfolgte mittels Standardzytotoxizitätstests. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen beleuchtet und die jeweiligen Untersuchungen durchgeführt.

##### ***Freies mTHPC***

Zu Beginn wurde die Effektivität sowie eine eventuell vorliegende Dunkeltoxizität des freien Photosensibilisators mTHPC bestimmt. Hierzu wurden HT29-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen mTHPC (0-10 µg/ml) für 1, 4 und 24 h bei 37 °C inkubiert, ein Teil der Proben anschließend belichtet (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und der verbleibende Teil als Dunkelkontrolle gelagert. Die Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität als auch die der Dunkeltoxizität wurden anschließend mittels der bereits beschriebenen Standardzytotoxizitätstests (BrdU-, LDH- und WST-1-Assay) durchgeführt. In allen durchgeführten Untersuchungen konnte eine gewisse Toxizität des freien Photosensibilisators ohne Belichtung nachgewiesen werden (Dunkeltoxizität; Abb. 31A,C;E). Diese fiel zum einen konzentrations- als auch zeitabhängig aus. Die ermittelte Zellviabilität bzw. die daran assoziierte MDH-Aktivität zeigte vor allem nach einer Inkubation von 24 h eine starke Reduktion auf ~ 4 % (10 µg/ml; Abb. 31A) verglichen mit unbehandelten Zellen. Jedoch zeigte auch die untersuchte Lösungsmittelkontrolle (Ethanol) diesen Trend. Kürzere Inkubationszeiten bedingten nur eine leichte und vernachlässigbare Fluktuation. Die Proliferation (BrdU-Inkorporation) zeigte starke Veränderungen bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen (Abb. 31C). Die Reduktion der Proliferation fiel hierbei auch zeit- und konzentrationsabhängig aus. Bereits eine 1-stündige Inkubation mit 5 µg/ml freiem mTHPC bedingte eine Reduktion der Proliferation auf etwa 70 %. Eine Erhöhung der eingesetzten Konzentration (10 µg/ml) verstärkte diese Entwicklung auf ca. 50 %. Die Verlängerung der Inkubationszeit bedingte eine Verstärkung der zuvor beobachteten Effekte. Bereits geringe Konzentrationen (0,5 µg/ml) führten nach einer lang anhaltenden Kultivierung zu einer verminderten Proliferation (63 %).



**Abb. 31: Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität von freiem mTHPC.**

HT29-Zellen wurden mit ansteigenden mTHPC-Konzentrationen (0-10 µg/ml) für 1, 4 und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen beleuchtet (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>; B, D, F) und die Zellviabilität (WST-1-Assay; A, B), die Zellproliferation (BrdU-Assay; C, D) sowie die Membranintegrität (LDH-Assay; E, F) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte (0<sub>Du</sub>; illuminiert: 0<sub>Il</sub>), Lösungsmittel-behandelte (EtOH) sowie 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

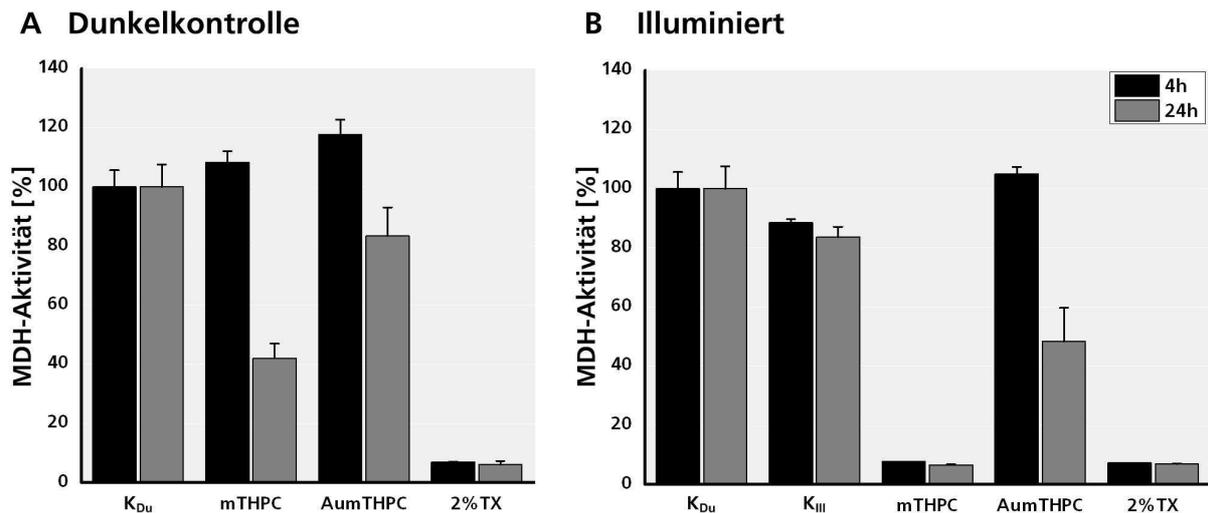
Neben einer reduzierten Zellviabilität als auch Zellproliferation konnte auch ein Verlust der Zellmembranintegrität (LDH-Freisetzung) mit andauernder Exposition verzeichnet werden (Abb. 31E). Hierbei traten vor allem bei der längsten Inkubationszeit (24 h) starke Erhöhungen der ermittelten LDH-Freisetzung auf (24 h, 10 µg/ml: 55,95 %).

Die illuminierten Proben zeigten den erwartungsgemäßen Verlauf (Abb. 31B,D,E). Nach Beleuchtung und Aktivierung erfolgte eine kontinuierliche Abnahme der Zellviabilität (Abb. 31B) als auch der Zellproliferation (Abb. 31D). Diese fielen umso stärker aus, je länger inkubiert wurde (24 h > 4 h > 1 h) bzw. je höher die eingesetzte Konzentration war. Die Membranintegrität zeigte verglichen mit der Dunkelkontrolle einen ähnlichen Verlauf (Abb. 31F). Die stärkste LDH-Freisetzung erfolgte nach 24 h Exposition mit 10 µg/ml und betrug in etwa 55 %. Zusammenfassend stellt mTHPC einen effektiven Photosensibilisator dar, der bereits bei geringen Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten eine starke induzierte Photozytotoxizität aufweist. Demgegenüber weist mTHPC jedoch auch beträchtliche dunkeltoxische Effekte auf.

### ***mTHPC-beladene Gold-Nanopartikel***

Die Untersuchung der induzierten Photozytotoxizität von mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikeln erfolgte aufgrund der limitierten Probenvolumina ausschließlich mittels eines Viabilitätstests (WST-1-Assay). HT29-Zellen wurden hierzu mit freiem als auch nanopartikulär-gebundenem mTHPC (eingesetzte Photosensibilisator-Konzentration: 3 µg/ml) für 4 und 24 h bei 37 °C inkubiert. In Anschluss an einem Mediumwechsel wurde eine Platte illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und die verbleibende Platte als Dunkelkontrolle gelagert. Die Auswertung der jeweiligen Platten ergab, dass der freie Photosensibilisator mTHPC nach 24 h eine Dunkeltoxizität aufwies (Abb. 32A). Eine 4 h andauernde Inkubation hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Zellen. HT29-Zellen, die mit der nanopartikulären Formulierung versetzt wurden, wiesen nach 4 h eine leicht erhöhte Zellviabilität auf. Mit anhaltender Inkubation (24 h) nahm diese ab und betrug letztendlich 83 % (24 h). Das nanopartikuläre System wies somit einen geringeren Einfluss auf die Zellen auf als der freie Photosensibilisator.

Nach Belichtung (Abb. 32B) konnten in der mTHPC-behandelten Proben nur noch ein marginaler Anteil an viablen Zellen (4 h: 8 %; 24 h: 7 %) detektiert werden. Die illuminierten Kontrollzellen (K<sub>III</sub>) wiesen hingegen nur eine gering reduzierte Aktivität auf. Die ermittelte Viabilität bzw. induzierte Phototoxizität von mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikeln betrug nach 4-stündiger Inkubation 105 %. Erst eine länger anhaltende Inkubationszeit von 24 h bedingte eine Reduktion der Viabilität auf 48 %. Die Beleuchtung führte somit zu einer weiteren Reduzierung der Zellviabilität um ca. 35 %. Zusammenfassend konnten die untersuchten mTHPC-beladenen AuNP eine toxische Wirkung in den untersuchten Zellen nach Belichtung entfalten.



**Abb. 32: Bestimmung der induzierten Phototoxizität von mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikeln.**

HT29-Zellen wurden mit freiem und nanopartikelgebundenem mTHPC (entsprechend einer mTHPC-Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$ ) für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 5  $\text{J/cm}^2$ ) und die Zellviabilität (WST-1-Assay) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von drei durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (K<sub>Du</sub>: Dunkelkontrolle; K<sub>III</sub>: illuminierte Kontrolle) sowie mit 2 % Triton X-100 (2 % TX) behandelte Zellen mituntersucht.

Durch die Komplexbildung des Photosensibilisators an die Goldpartikel konnte deren dunkeltoxische Wirkung zum Teil reduziert werden. Die entwickelten Partikel stellen somit ein viel versprechendes System dar, das jedoch noch weiteren Untersuchungen unterzogen werden muss.

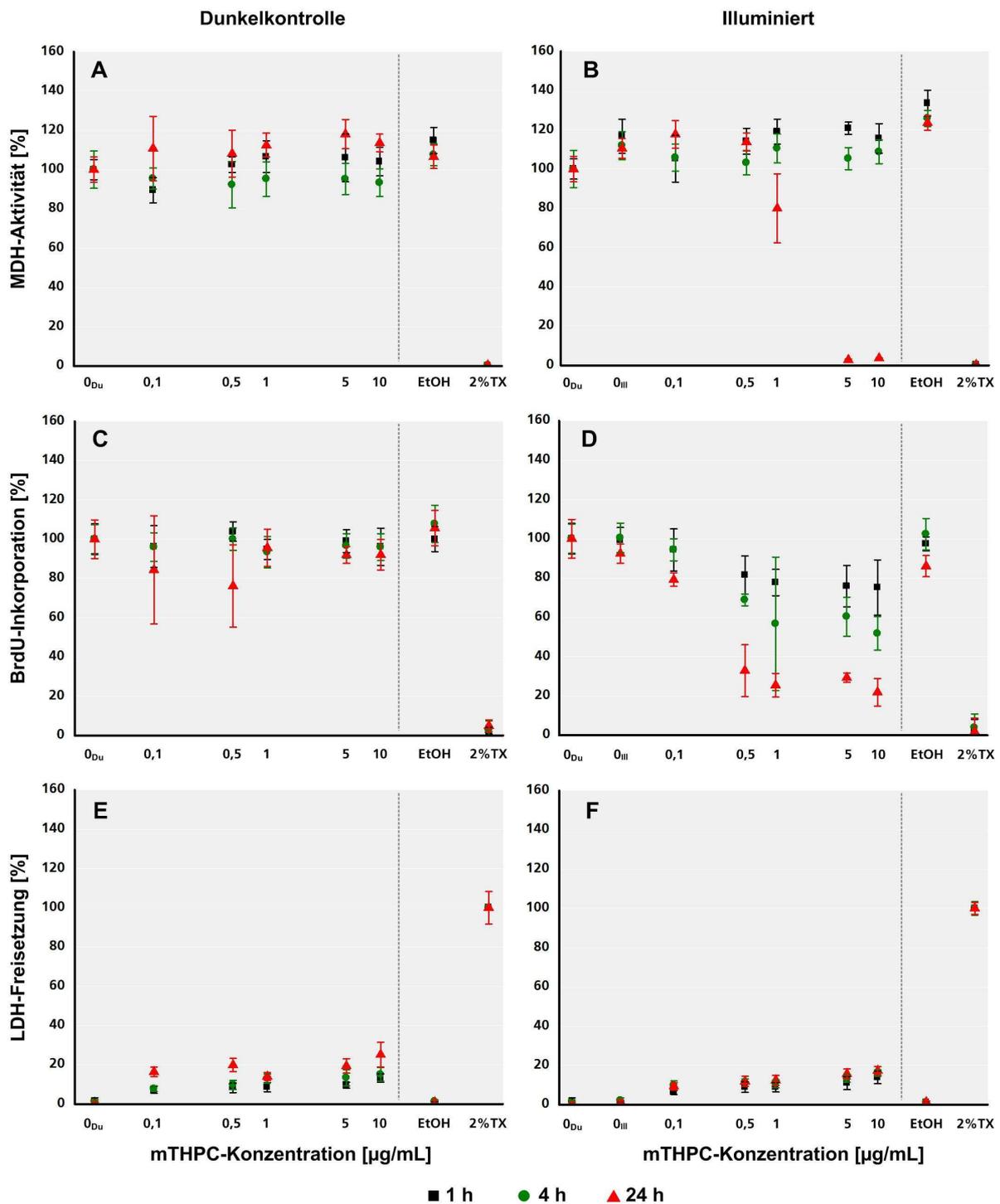
### ***mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel***

Die Evaluierung einer eventuellen Dunkeltoxizität sowie Photozytotoxizität wurde entsprechend dem freien Wirkstoff mTHPC durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu mit ansteigenden Volumina mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln (entsprechend einer steigenden mTHPC-Konzentration: 0-10  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1, 4 und 24 h inkubiert, illuminiert (652 nm, 5  $\text{J/cm}^2$ ) und untersucht. Anfänglich wurden die Zellen der Dunkelkontrolle untersucht (Abb. 33A,C,E). Die Auswertung der Zellviabilität ergab einen konstanten Verlauf der ermittelten MDH-Aktivität für die Dunkelkontrolle (Abb. 33A). Es konnten für alle getesteten Konzentrationen als auch Inkubationsintervalle nur marginale Schwankungen detektiert werden. Ebenso verhielt es sich für die untersuchte Zellproliferation (Abb. 33C). Die Dunkelkontrolle zeigte hierbei nur Schwankungen nach einer 24-stündigen Exposition mit geringen Konzentrationen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ : 84 %; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ : 76 %). Zellen, die mit höheren Konzentrationen (1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert wurden, wiesen wiederum eine nahezu unveränderte Proliferation auf und verliefen auf einem konstanten Niveau. Die ermittelte LDH-Freisetzung zeigte für alle Inkubationszeiten der Dunkelkontrolle eine leichte Steigerung (Abb. 33E). Diese fiel

konzentrationsabhängig aus und erreichte ihren maximalen Wert nach 24 h Inkubation mit 10 µg/ml (25 %).

Die illuminierten Proben wiesen nach der Bestrahlung eine reduzierte MDH-Aktivität, Zellproliferation und gleich bleibende LDH-Freisetzung auf (Abb. 33B,D,F). Die Viabilität stieg nach einer 1 bzw. 4 h andauernden Inkubation und Bestrahlung in Vergleich mit unbehandelten Zellen für alle Proben leicht an (Abb. 33B). Erst eine zuvorige Inkubation von 24 h bedingte einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Zellviabilität. Die Inkubation mit hohen mTHPC-Konzentrationen (5 und 10 µg/ml) und die anschließende Beleuchtung bewirkten eine Reduktion der Viabilität auf ca. 3 %. Die zelluläre Proliferation nahm bereits nach kurzen Inkubationszeiten ab (Abb. 33D). Bereits nach einer 1-stündigen Inkubation konnte dies beobachtet werden. Die Zellen zeigten bei geringen Konzentrationen (0,5 µg/ml) eine reduzierte BrdU-Inkorporation (1 h: 81 %; 4 h: 69 %; 24 h: 33 %). Die stärkste Reduktion konnte nach einer Inkubation für 24 h abgelesen werden. Die Zellen wiesen nach einer Inkubation mit 0,5 µg/ml bereits nur noch 32,91 % proliferierende Zellen auf. Dieser Trend setzte sich für die weiteren Konzentrationen weiter fort und es konnten letztendlich nur noch 21,81 % (10 µg/ml) proliferierende Zellen detektiert werden. Die ermittelte LDH-Freisetzung im Anschluss an eine Bestrahlung zeigte für alle Zeiten einen Anstieg entsprechend der eingesetzten HSA-mTHPC-Konzentration (Abb. 33F). Die höchste ermittelte LDH-Freisetzung betrug nach 24 h Inkubation mit 10 µg/ml 17 % (1 h: 14 %; 4 h: 16 %).

Zusammenfassend zeichneten sich die Proben durch eine reduzierte Dunkeltoxizität gegenüber dem freien Photosensibilisator mTHPC aus (siehe Abb. 31). Aus den Ergebnissen lässt sich ablesen, dass die Effektivität von mTHPC erhalten blieb. Besonders nach länger andauernden Inkubationszeiten konnte dieses seine volle Wirksamkeit entwickeln.



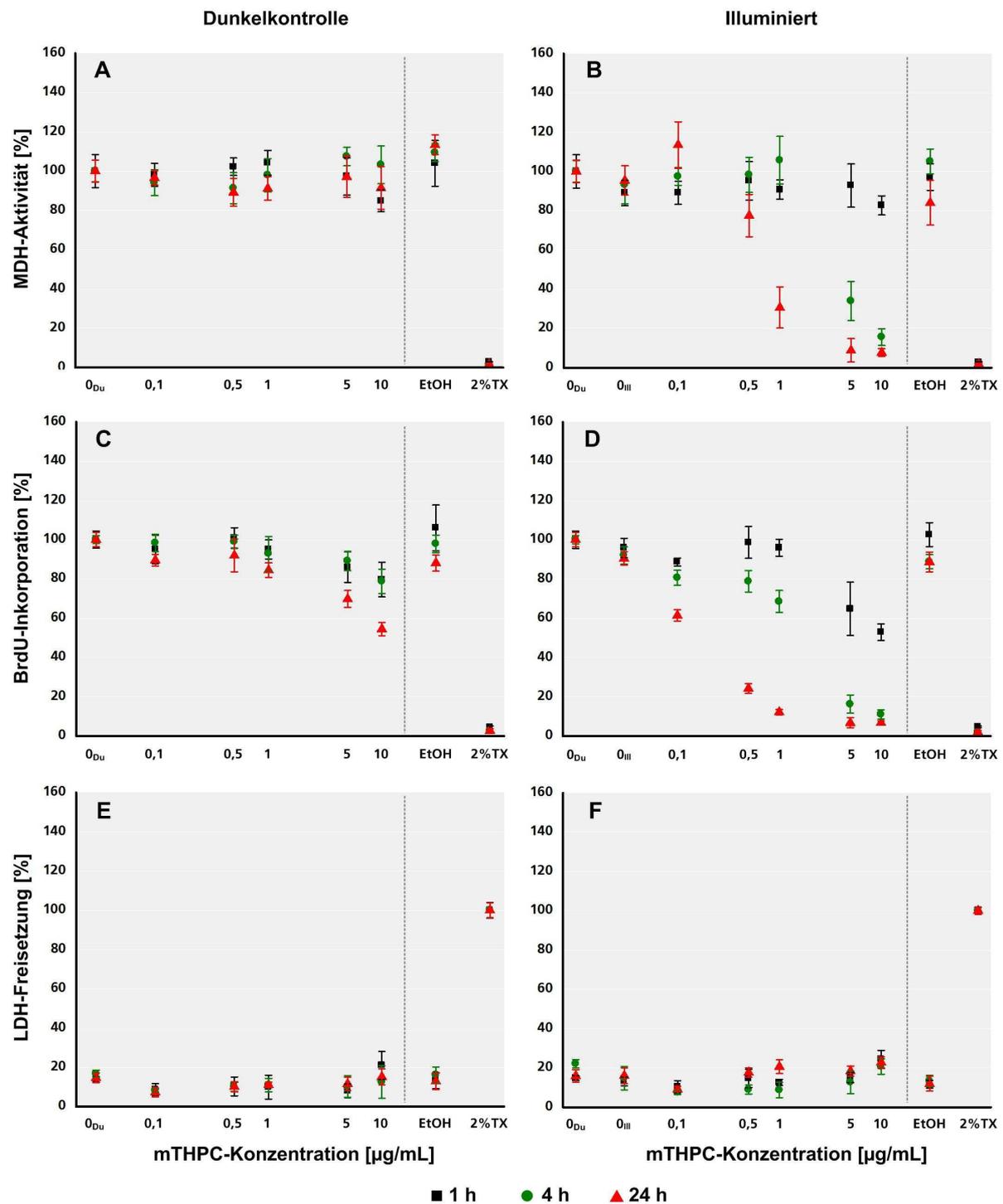
**Abb. 33: Bestimmung der induzierten Phototoxizität von mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln.**

HT29-Zellen wurden mit ansteigenden HSA-mTHPC-Konzentrationen (entsprechend einer mTHPC-Konzentration von 0-10 µg/ml) für 1, 4 und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>; B, D, F) und die Zellviabilität (WST-1-Assay; A, B), die Zellproliferation (BrdU-Assay; C, D) sowie die Membranintegrität (LDH-Assay; E, F) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte (0; illuminiert: 0<sub>ill</sub>), Lösungsmittel-behandelte (H<sub>2</sub>O) sowie 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

### ***mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel***

Zuletzt wurden die synthetisierten mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikel den Untersuchungen unterzogen, um ihre Photozytotoxizität (Abb. 34B,D,F) und Dunkeltoxizität (Abb. 34A,C,E) bestimmen zu können. Wie bereits zuvor für HSAmTHPC-Nanopartikel beschrieben, erfolgte eine unterschiedlich andauernde Inkubation (1-24 h) mit ansteigenden mTHPC-Konzentrationen (0-10 µg/ml). Die untersuchte Lösungsmittelkontrolle (Wasser) wies für die jeweiligen Untersuchungen geringe Fluktuationen auf, die innerhalb der jeweiligen Kontrollmessungen lagen. Die Proben der Dunkelkontrolle zeigten sowohl für die Viabilität als auch für die LDH-Freisetzung einen gleichbleibenden Verlauf für alle getesteten Konzentrationen und Zeiten (Abb. 34A,E). Innerhalb der Messungen traten nur kleine Schwankungen auf. Eine Reduktion der ermittelten Proliferation konnte vor allem für die längste Inkubation (24 h) evaluiert werden (Abb. 34C). Hierbei konnte eine Verminderung auf 55 % beobachtet werden. Für die kürzeren Inkubationszeiten von 1 und 4 h betrug dieser lediglich 80 % bzw. 78 %. Die Bestrahlung bedingte einen erwartungsgemäßen Rückgang der Viabilität und Proliferation bei gleichbleibender LDH-Freisetzung (Abb. 34B,D,F). Besonders die längeren Inkubationen (4 und 24 h) mit hohen PLGA<sub>m</sub>THPC-Konzentrationen bedingten einen starken Rückgang der Viabilität (Abb. 34B) und Proliferation (Abb. 34D). Die ermittelte LDH-Freisetzung in Folge an eine Inkubation und Bestrahlung zeigte für alle Inkubationszeiten einen gleich bleibenden Verlauf (Abb. 34F). Für mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel gab es keine Hinweise für eine vorliegende Dunkeltoxizität. Alle Untersuchungen belegten nahezu unveränderte Werte in Vergleich mit unbehandelten Zellen. Die Bestrahlung per se hatte keinen Einfluss auf die Zellen. In Folge der Illuminierung konnte eine starke Photozytotoxizität beobachtet werden, die sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ausfiel. mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel wiesen sich durch eine verstärkte Phototoxizität bei deutlich verminderter Dunkeltoxizität aus. Sie stellten somit ein effektives Trägersystem für den hydrophoben Photosensibilisator mTHPC da, ohne dass dieser seine Wirksamkeit verlor.

Für alle synthetisierten Arzneistoff-Trägersysteme sowie den freien Wirkstoff konnte die funktionelle Effektivität im Anschluss an eine Beleuchtung demonstriert werden. Um Aussagen bezüglich einer Induktion von Apoptose treffen zu können, wurde das Vorhandensein entsprechender Marker in den folgenden Versuchen untersucht.



**Abb. 34: Bestimmung der induzierten Phototoxizität von mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln.**

HT29-Zellen wurden mit ansteigenden PLGA-mTHPC-Konzentrationen (entsprechend einer mTHPC-Konzentration von 0-10 µg/ml) für 1, 4 und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und die Zellviabilität (WST-1-Assay), die Zellproliferation (BrdU-Assay) sowie die Membranintegrität (LDH-Assay) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte (0; illuminiert: 0<sub>ill</sub>), Lösungsmittel-behandelte (H<sub>2</sub>O) sowie 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

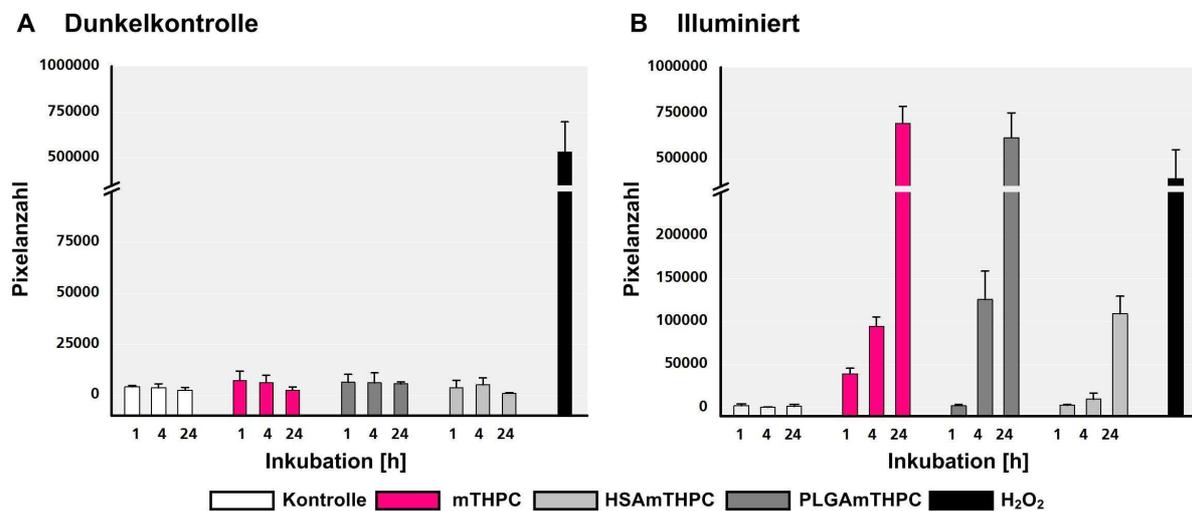
### 3.6.2 Nachweis von apoptotischen Ereignissen

Als Apoptose wird im Allgemeinen der programmierte Zelltod einer Zelle bezeichnet. Im Gegensatz zur Nekrose findet diese in geordneten Bahnen statt und bedingt keine Entzündungsreaktion der umliegenden Gewebsfläche. Nach Induktion der Apoptose erfolgt die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die u.a. zur Degradation der nukleären DNA, einer veränderten Zellmembranzusammensetzung und Spaltung von Zielproteinen führen.

#### ***Nachweis von Membranfluktuationen***

Ein sogenannter Membran-„Flip-Flop“ stellt einen Marker der Apoptose dar. Hierbei wird das normalerweise intrazellulär exprimierte Phospholipid Phosphatidylserin auf die äußere Seite der Plasmamembran transloziert. Hier fungiert es als Erkennungsmerkmal apoptotischer Zellen für Makrophagen. Die Apoptose wurde unter zu Hilfenahme des APOPercentage Apoptosis Assay quantifiziert. Hierzu wurden HT29-Zellen bis zu 24 h mit den jeweiligen Formulierungen (freies und nanopartikulär-gebundenes mTHPC; eingesetzte Konzentration: 1 µg/ml) inkubiert, bestrahlt (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) oder für eine spätere Bestimmung einer Dunkeltoxizität verwahrt. Als Kontrolle und für eine spätere Quantifizierung wurden Wasserstoffperoxid-behandelte Zellen (2,5 mM) in die Untersuchung miteinbezogen. Durch die Akkumulation des rot-gefärbten APOPercentage Reagenz erschienen apoptotische Zellen im Laufe der Untersuchung rot und konnten für eine Bestimmung herangezogen werden. Für eine genauere Quantifizierung der induzierten Apoptose wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen ermittelt und mit den Kontrollen verglichen. Die Quantifizierung erfolgte über die Bestimmung der Pixelanzahl des intrazellulären Reagenz mit Hilfe der frei zugänglichen Software *GIMP*. Von allen erhaltenen Aufnahmen wurden dementsprechend der Pixelwert ermittelt und gegeneinander aufgetragen (Abb. 35). In allen nicht-illuminierten Proben (Dunkelkontrolle) konnten nur vereinzelte apoptotische Zellen detektiert und somit ausgewertet werden. Diese traten auch bei den untersuchten unbehandelten Kontrollen auf. Ausschließlich Zellen der Positivkontrolle wiesen eine starke Rotfärbung und somit erhöhte Pixelzahl als Indiz für Apoptose auf (Abb. 35A; siehe Anhang Abb. A2A). Sowohl die unbehandelten als auch die Photosensibilisator-behandelten Zellen wiesen nur im geringen Maß das gesuchte Reagenz auf. Im Schnitt lag die ermittelte Pixelanzahl unter 10.000. Im Vergleich dazu betrug die Pixelnummer von Wasserstoffperoxid-behandelten Zellen über 500.000. Anschließend erfolgte die Auswertung der Photosensibilisator-behandelten und illuminierten Proben (Abb. 35B). Alle Photosensibilisator-behandelten und illuminierten Proben wiesen apoptotische Zellen innerhalb des Zelllayers auf (siehe Anhang Abb. A2B). Es konnte für alle getesteten Formulierungen eine zeitabhängige Induktion ermittelt werden. Nach einer

1-stündigen Inkubation waren vereinzelt apoptotische Zellen innerhalb der Proben zu verzeichnen. Mit ansteigender Inkubationszeit nahm der Anteil an apoptotischen Zellen deutlich zu, bis nach 24 h eine Vielzahl an Zellen die charakteristische Färbung aufwies. Freies mTHPC (1 h:  $40.000 \pm 7.000$ ; 24 h:  $695.000 \pm 92.000$ ) und PLGA-assoziiertes mTHPC (1 h:  $2.300 \pm 1.300$ ; 24 h:  $615.000 \pm 14.000$ ) zeigten hierbei die stärksten Reaktionen. Die ermittelten Werte lagen hierbei im Bereich der Positivkontrolle ( $400.000 \pm 16.000$ ). Die durch HSA-Nanopartikel bzw. des daran gebundenen mTHPC induzierte Apoptose fiel am geringsten aus (1 h:  $2.500 \pm 1.380$ ; 24 h:  $110.000 \pm 20.000$ ). Unbehandelte, aber bestrahlte Zellen wiesen nur vereinzelt Zellen innerhalb des Layers auf. Eine Bestrahlung allein, also ohne die Anwesenheit eines Photosensibilisators, führte somit nicht zur Induktion von Apoptose.



**Abb. 35: Quantifizierung der Apoptoseinduktion mittels APOPercentage Apoptosis Assay und Pixelwertbestimmung.**

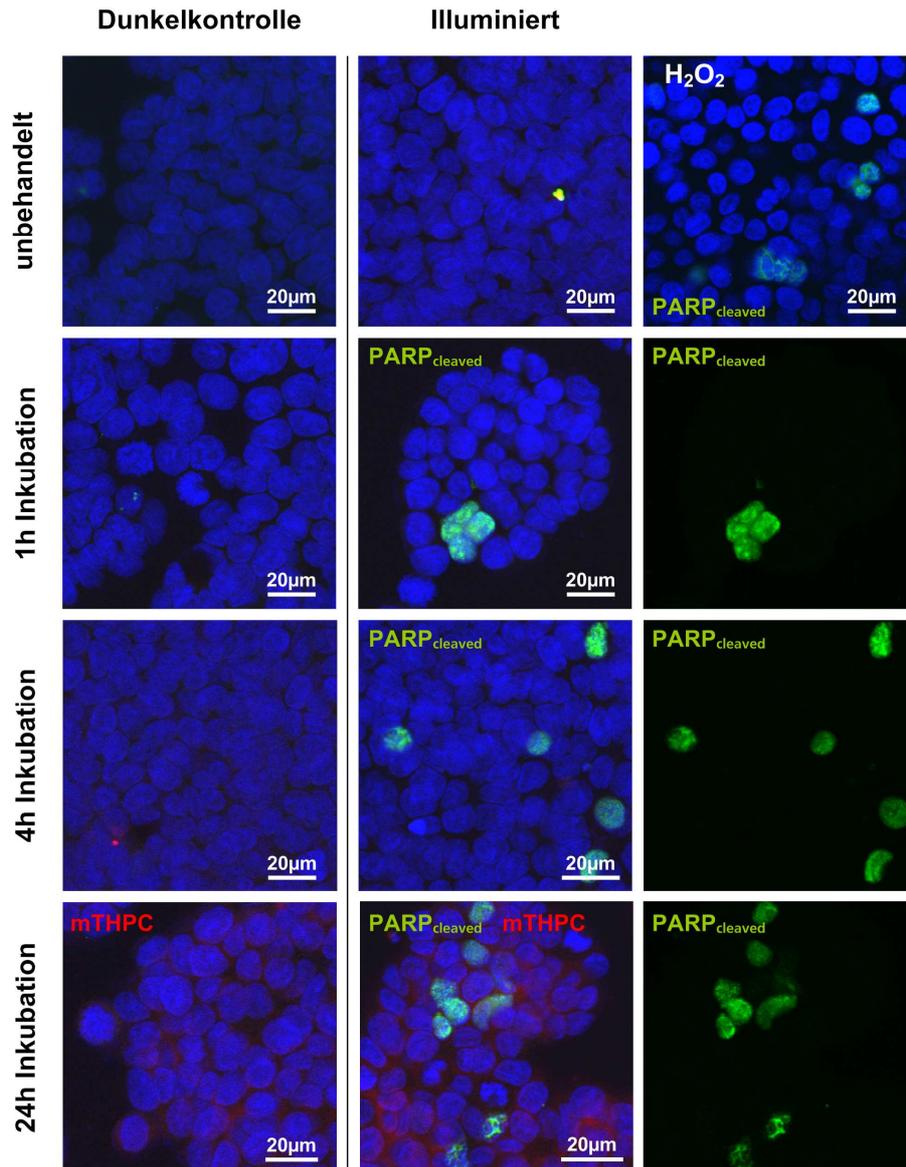
Zum Nachweis von Apoptoseinduktion sind HT29-Zellen mit  $1 \mu\text{g/ml}$  freiem mTHPC sowie mTHPC-beladenen Nanopartikeln (HSA und PLGA,  $1 \mu\text{g/ml}$  mTHPC-Konzentration) für 1, 4 und 24 h inkubiert und anschließend für 30 min mit der APOPercentage Reagenz (rot) behandelt worden. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle und  $\text{H}_2\text{O}_2$ - ( $2,5 \text{ mM}$ ) behandelte Zellen als Positivkontrolle. Bestimmung der inkorporierten APOPercentage Reagenz (Pixelanzahl) ohne (A, Dunkelkontrolle, siehe Anhang Abb. A2A) und mit (B, Illuminiert, siehe Anhang Abb. A2B) PDT-Behandlung. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von drei durchgeführten Experimenten dar.

**Immunhistochemischer Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub>**

Das körpereigene Enzym Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) ist an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Im Rahmen der Apoptoseinduktion und den daran beteiligten Signaltransduktionsprozessen wird PARP proteolytisch durch Caspase-3 gespalten (PARP<sub>cleaved</sub>). Dieser Schritt kann daher als Marker für eine bereits stattfindende Apoptose herangezogen werden.

Zum qualitativen Nachweis der Spaltung von PARP zu PARP<sub>cleaved</sub> wurden HT29-Zellen ausgesät und mit den verschiedenen Formulierungen (freies und nanopartikelgebundenes mTHPC; eingesetzte mTHPC-Konzentration: 1 µg/ml) für 1, 4 und 24 h inkubiert und entweder bestrahlt (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) oder als Dunkelkontrolle verwahrt. Die fixierten und permeabilisierten Proben wurden anschließend auf die Präsenz von PARP<sub>cleaved</sub> immunhistochemisch untersucht.

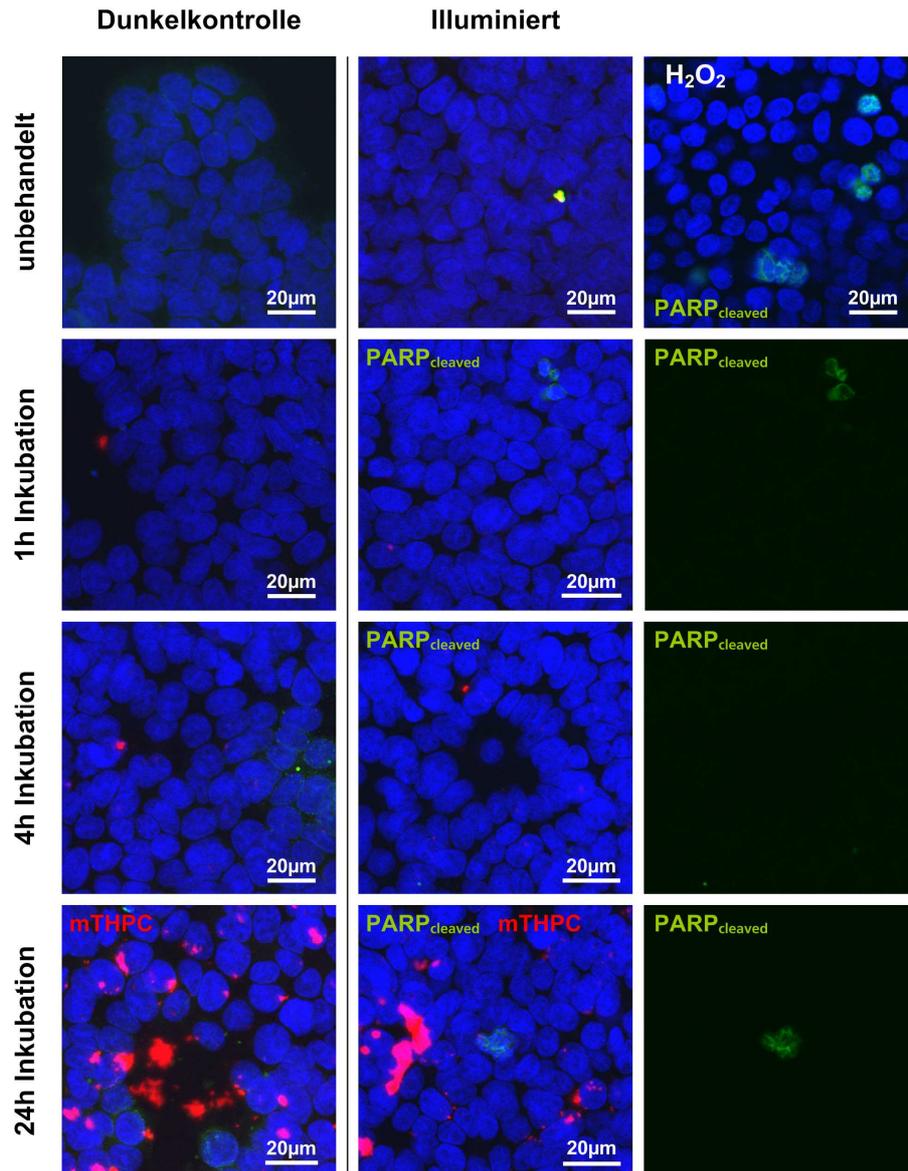
Zellen, die zuvor mit freiem mTHPC inkubiert worden waren, zeigten nach Bestrahlung die Anwesenheit von PARP<sub>cleaved</sub> (Abb. 36). In allen untersuchten Proben konnte die grüne Fluoreszenz des verwendeten Sekundärsantikörpers detektiert werden. Mit steigender Inkubationszeit nahm der Anteil an PARP<sub>cleaved</sub>-positiven Zellen zu. Die Zellen wiesen eine starke Färbung der Zellkerne bzw. der entstandenen intranukleären Zwischenräume auf. Unbehandelte als auch unbestrahlte Zellen zeigten nur vereinzelt PARP<sub>cleaved</sub>-positive Zellen innerhalb des Zellrasens. Vereinzelt konnte in Zellen, die 24 h mit mTHPC versetzt worden waren, Reste des Photosensibilisators detektiert werden. Kürzer inkubierte Proben wiesen dies nicht mehr auf. Längere Inkubationszeiten bedingten hierbei eine stärkere zelluläre Anreicherung des Photosensibilisators. Die durchgeführten Waschschriffe reichten hierbei nicht aus, um den Photosensibilisator gänzlich zu entfernen. Daher konnten v. a. bei länger inkubierten Proben Reste von mTHPC detektiert werden.



**Abb. 36: Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> nach Behandlung mit freiem mTHPC.**

HT29-Zellen wurden mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1 μg/ml) für 1, 4 und 24 h behandelt. Im Anschluss wurde ein Teil der Zellen illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>), der verbleibende Anteil als Dunkelkontrolle beibehalten und PARP<sub>cleaved</sub> nachgewiesen. Zur Visualisierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau-H/K: 60) gegengefärbt und die Proben mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün-H/K: 55) zum Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte sowie unbehandelte Zellen mituntersucht. Reste des Photosensibilisators erscheinen aufgrund der Autofluoreszenz rot.

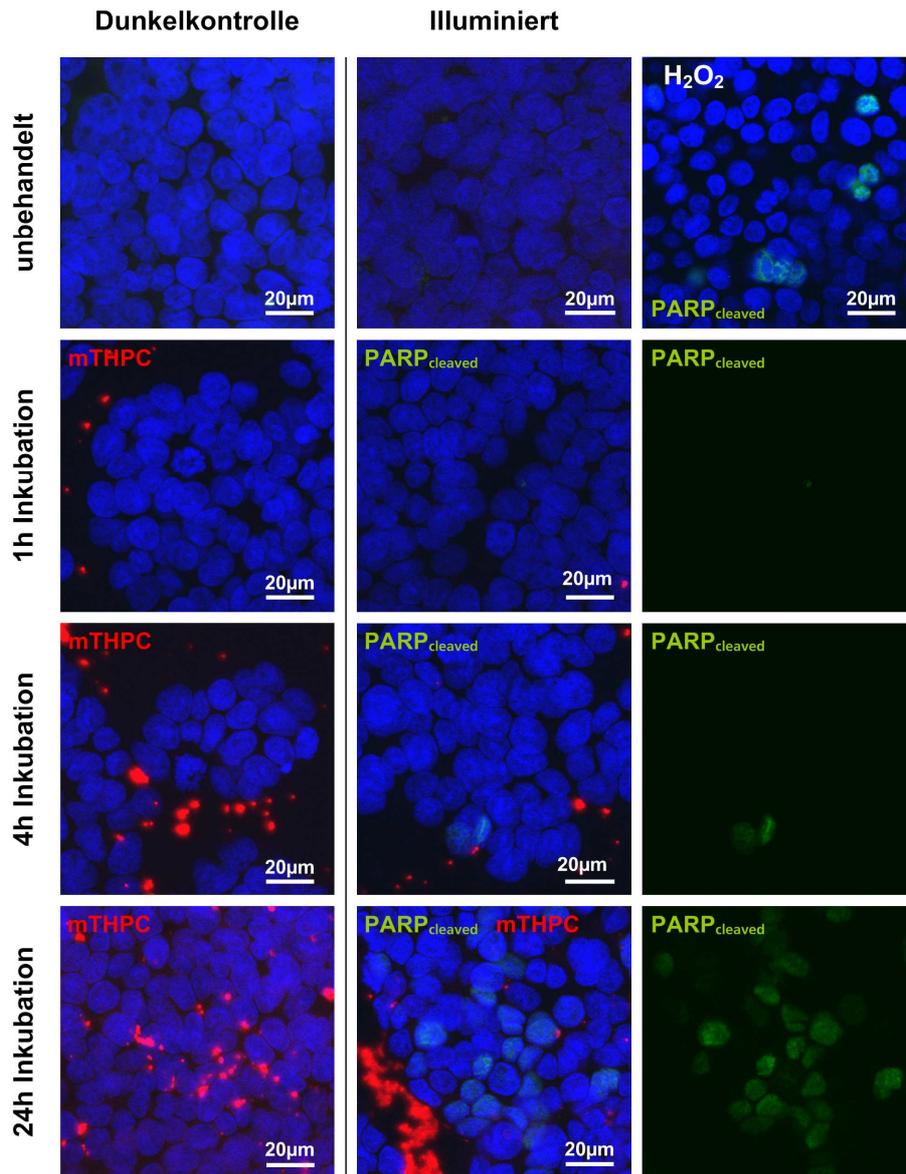
Neben freiem mTHPC wurde dann die Apoptoseinduktion nach einer Inkubation mit mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln untersucht. Hierbei konnten vereinzelt Reste von mTHPC in den Proben ermittelt werden (rot; Abb. 37). Diese befanden sich vorwiegend zwischen den Zellen. Es konnten nur vereinzelt PARP<sub>cleaved</sub>-positive Zellen (nach 1 h und 24 h Inkubation) visualisiert werden. Eine Zeitabhängigkeit, wie zuvor bei freiem mTHPC ermittelt, konnte nicht bestätigt werden. Die Bestrahlung bzw. die Inkubation mit dem Arzneistoff-Trägersystem führte zu einer leichten Apoptoseinduktion.



**Abb. 37: Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> nach Behandlung mit mTHPC-beladener HSA-Nanopartikel.**

HT29-Zellen wurden mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1 μg/ml; gebunden an HSA-Nanopartikel) für 1, 4 und 24 h behandelt. Im Anschluss wurde ein Teil der Zellen illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>), der verbleibende Anteil als Dunkelkontrolle beibehalten und PARP<sub>cleaved</sub> nachgewiesen. Zur Visualisierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau\_H/K: 60) gegengefärbt und die Proben mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün-H/K: 55) zum Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte sowie unbehandelte Zellen mituntersucht. Reste des Photosensibilisators erscheinen aufgrund der Autofluoreszenz rot.

Abschließend erfolgte die Untersuchung von mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln (Abb. 38). Wie zuvor beschrieben, konnten Reste des Photosensibilisators zwischen den Zellen bzw. in den Interzellularräumen detektiert werden. Das ermittelte PARP<sub>cleaved</sub>-Signal zeigte einen zeitabhängigen Anstieg in seiner Intensität. Nach 1 h Inkubation konnten nur vereinzelt, schwache Loci detektiert werden, die mit zunehmender Inkubationsdauer (4 h) an Größe und Intensität zunahm. Eine Inkubation von 24 h führte zu einer zahlreichen proteolytischen Spaltung und Aktivierung von PARP.



**Abb. 38: Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> nach Behandlung mit mTHPC-beladener PLGA-Nanopartikel.**

HT29-Zellen wurden mit einer konstanten mTHPC-Konzentration (1 μg/ml; gebunden an PLGA-Nanopartikel) für 1, 4 und 24 h behandelt. Im Anschluss wurde ein Teil der Zellen illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>), der verbleibende Anteil als Dunkelkontrolle beibehalten und PARP<sub>cleaved</sub> nachgewiesen. Zur Visualisierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau-H/K: 60) gegengefärbt und die Proben mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün-H/K: 55) zum Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte sowie unbehandelte Zellen mituntersucht. Reste des Photosensibilisators erscheinen aufgrund der Autofluoreszenz rot.

Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse bekräftigt die Wirksamkeit der neu entwickelten nanopartikulären Formulierungen hinsichtlich einer Photozytotoxizität und Aktivierung von Apoptose. Obwohl die mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikel eine sehr viel versprechende Tendenz aufwiesen, musste aufgrund der limitierenden Probenmengen auf weitere Untersuchungen zugunsten der anderen kolloidalen Systeme verzichtet werden.

### 3.6.3 3D-Tumormodell

Neben den Untersuchungen bezüglich einer zellulären Anreicherung sowie einer induzierten photozytotoxischen Wirksamkeit wurde das Verhalten der synthetisierten Arzneistoff-Trägersysteme an einem realistischeren 3D-Tumormodell (Sphäroid) untersucht. In der Folge wurde ein Protokoll zur Herstellung von Tumor-Sphäroiden aus HT29-Zellen etabliert.

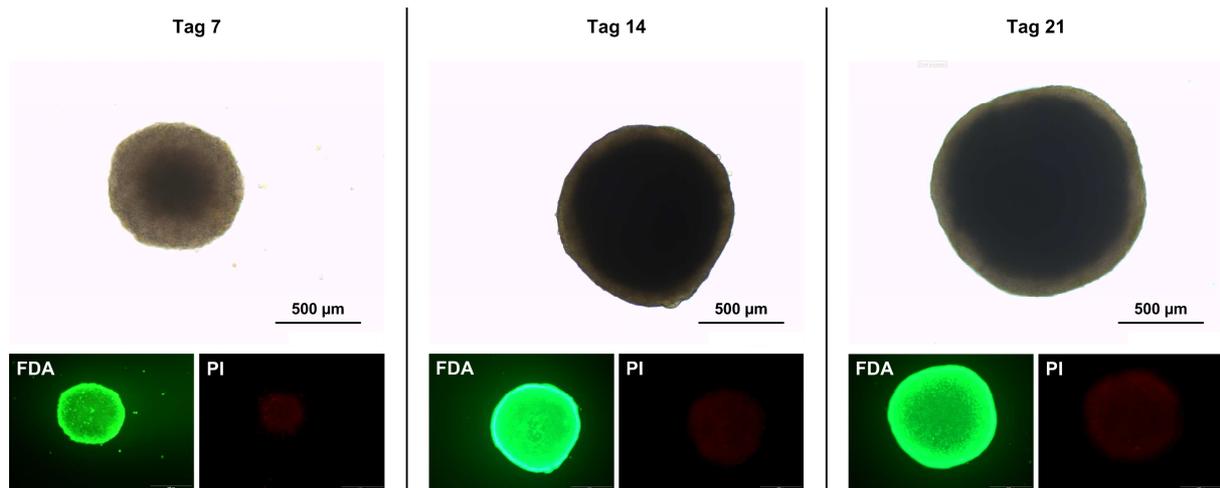
#### 3.6.3.1 Wachstumsverhalten von Sphäroiden

Die Herstellung von Sphäroiden aus der Zelllinie HT29 erfolgte mittels der „Hanging-Drop“-Technik. Die erhaltenen Sphäroide wiesen nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen eine mittlere Größe von  $830 \pm 68 \mu\text{m}$  auf (Tab. 9). Diese nahm mit voranschreitender Kultivierungsdauer weiter zu (14 Tage:  $1021 \pm 46 \mu\text{m}$ ; 21 Tage:  $1247 \pm 112 \mu\text{m}$ ).

**Tab. 9: Wachstumszunahme von HT29-Sphäroiden, die mittels „Hanging-Drop“-Technik hergestellt wurden.**

Tag	Größe [ $\mu\text{m}$ ]	Anzahl
7	$829 \pm 68$	50
14	$1021 \pm 46$	14
21	$1247 \pm 112$	11

Neben der Volumenzunahme konnte eine Veränderung der äußeren Erscheinung verzeichnet werden. Anfänglich wiesen die Sphäroide zwei distinkt voneinander zu trennende Bereiche auf (Abb. 39). Der äußere Sphäroidbereich erschien im Vergleich zum dunklen Sphäroidinnern hell und vereinzelte Strukturen waren sichtbar. In Folge der Kultivierung nahm dieser Bereich zugunsten eines wachsenden Zentrums ab. Nach 21 Tagen wiesen die Sphäroide ein vergleichsweise großes, dunkles Zentrum mit einer reduzierten äußeren Hülle auf.

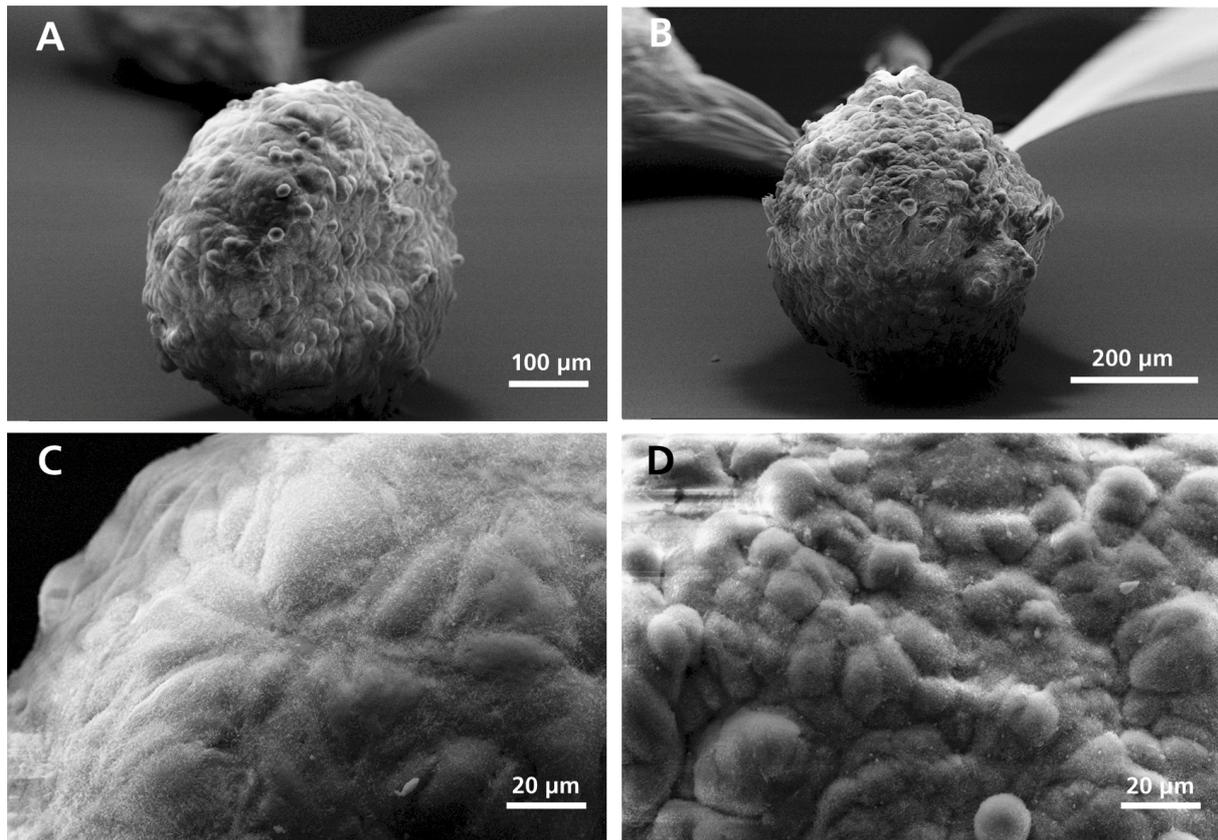


**Abb. 39: Wachstum und Vitalitätsnachweis von HT29-Sphäroiden.**

Aus HT29-Zellen hergestellte Sphäroide wurden alle sieben Tage hinsichtlich ihrer Größe (Phasenkontrast-Aufnahmen) und Vitalität (Lebend-Tot-Färbung) untersucht. Lebende Zellen erscheinen grün (FDA) und tote Bereiche aufgrund des inkorporierten Propidiumiodids (PI) rot.

Durch eine Färbung mit Fluoresceindiacetat (FDA; lebend) in Kombination mit Propidiumiodid (PI; tot) konnte die Viabilität (Lebend-Tot-Färbung) der Zellen innerhalb des 3D-Aggregats nachgewiesen werden. Die generierten Sphäroide wiesen an allen untersuchten Kultivierungstagen im Innern eine schwache Anreicherung von toten/PI-positiven Zellen auf (Abb. 40). Die grüne Fluoreszenz von FDA, die lebende Zellen anzeigte, konnte über den gesamten Sphäroid detektiert werden. Hierbei viel v. a. der äußere Randbereich der 3D-Aggregate auf. Dieser zeichnete sich durch ein intensiveres FDA-Signal aus.

Weiterhin wurde die Morphologie der erhaltenen Sphäroide rasterelektronenmikroskopisch evaluiert. Neben sieben Tage alten Proben wurden Sphäroide, die bereits 21 Tage kultiviert wurden, untersucht (Abb. 40). Die untersuchten Sphäroide wiesen nach sieben Tagen eine kompakte Form mit vereinzelt noch sichtbaren Zellen auf (Abb. 40A). Eine weitere Vergrößerung bestätigte die erhaltene Beobachtung (Abb. 40C). Die Zellen wiesen eine raue Oberfläche auf. Ferner konnten einzelne Strukturen innerhalb der Oberfläche identifiziert werden. HT29-Sphäroide, die sich bereits 21 Tage in Kultur befanden, wiesen auch eine kompakte Form auf (Abb. 40B). Hierbei konnten durch eine weitere Vergrößerung (Abb. 40D) ebenfalls die einzelnen Zellen und assoziierten Strukturen illustriert werden.



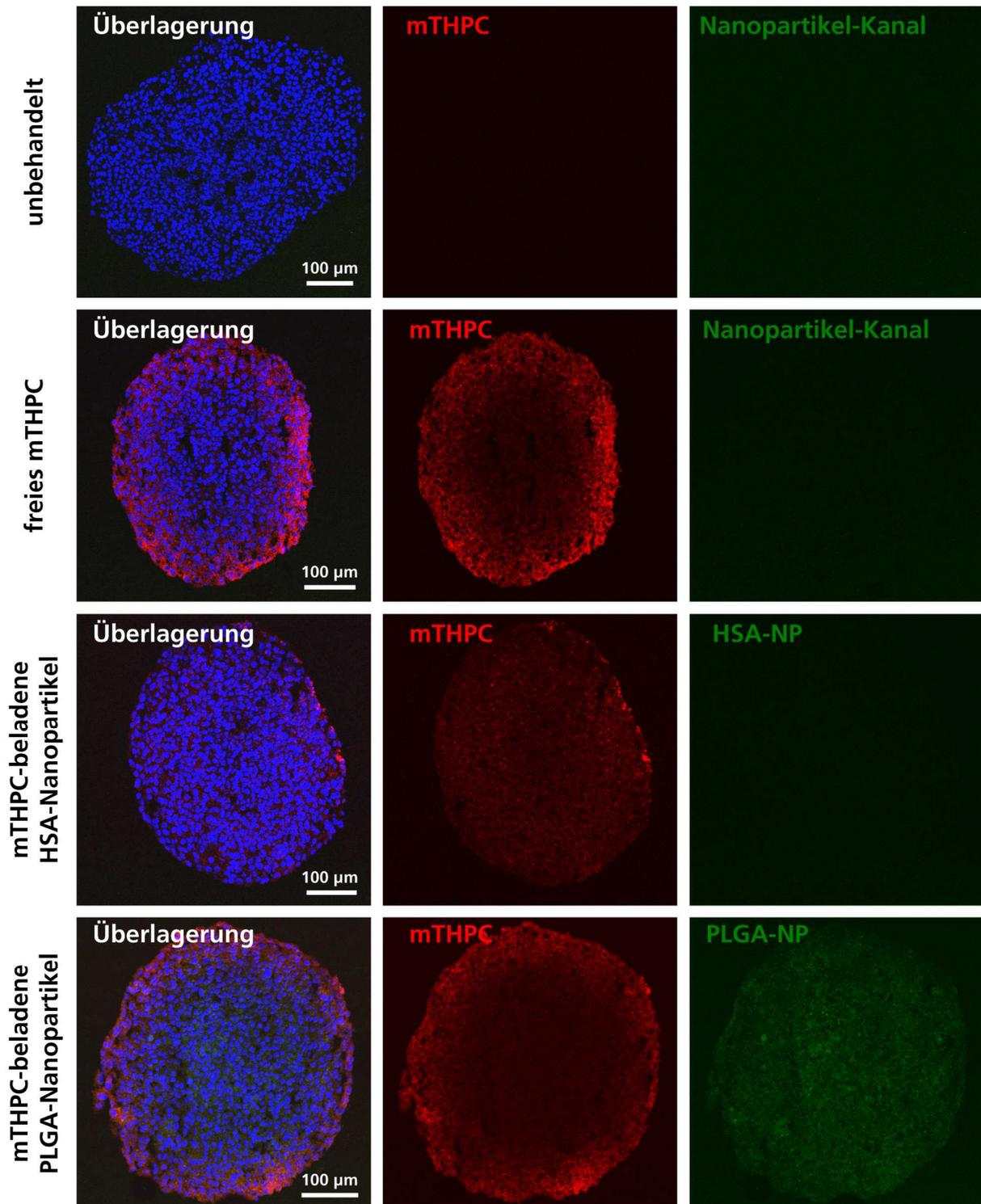
**Abb. 40: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von HT29-Sphäroiden.**

Sieben Tage alte HT29-Sphäroide (A, C), und 21 Tage alte Sphäroide (B, D), wurden mittels einer Schwermetallkontrastierung behandelt und mittels REM untersucht.

Für die folgenden Versuche wurde, basierend auf den erhaltenen Ergebnissen, eine Kultivierungsdauer von sieben Tagen, zur Generierung von Sphäroiden, herangezogen. Die Sphäroide wiesen eine ausreichende Größe und passende Verteilung an lebenden und toten Zellen auf.

### 3.6.3.2 Zelluläre Akkumulation von freiem und nanopartikulär gebundenem mTHPC in HT29-Sphäroiden

Nachdem ein Protokoll zur Herstellung von Sphäroiden aus HT29 etabliert werden konnte, sollte im weiteren Verlauf die zelluläre Akkumulation des freien Wirkstoffs und der neu entwickelten nanopartikulären Formulierungen erfolgen. Sechs Tage alte Sphäroide wurden mit den zu untersuchenden Substanzen (freies mTHPC; mTHPC-beladene HSA/PLGA-Nanopartikel; eingesetzte mTHPC-Konzentration: 3 µg/ml) für 24 h unter Lichtausschluss kultiviert, eingefroren und 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Eine Aufnahme des Photosensibilisators konnte für alle Proben demonstriert werden (Abb. 41). Die stärkste Anreicherung und Verteilung konnte neben dem freien Wirkstoff für das Transportsystem basierend auf PLGA detektiert werden. Hier konnte eine starke Fluoreszenz im äußeren Randbereich ermittelt werden, die zum Zentrum hin in ihrer Intensität abnahm.



**Abb. 41: Nachweis von freiem mTHPC und mTHPC-beladenen Nanopartikeln (PLGA & HSA) in HT29-Sphäroiden.**

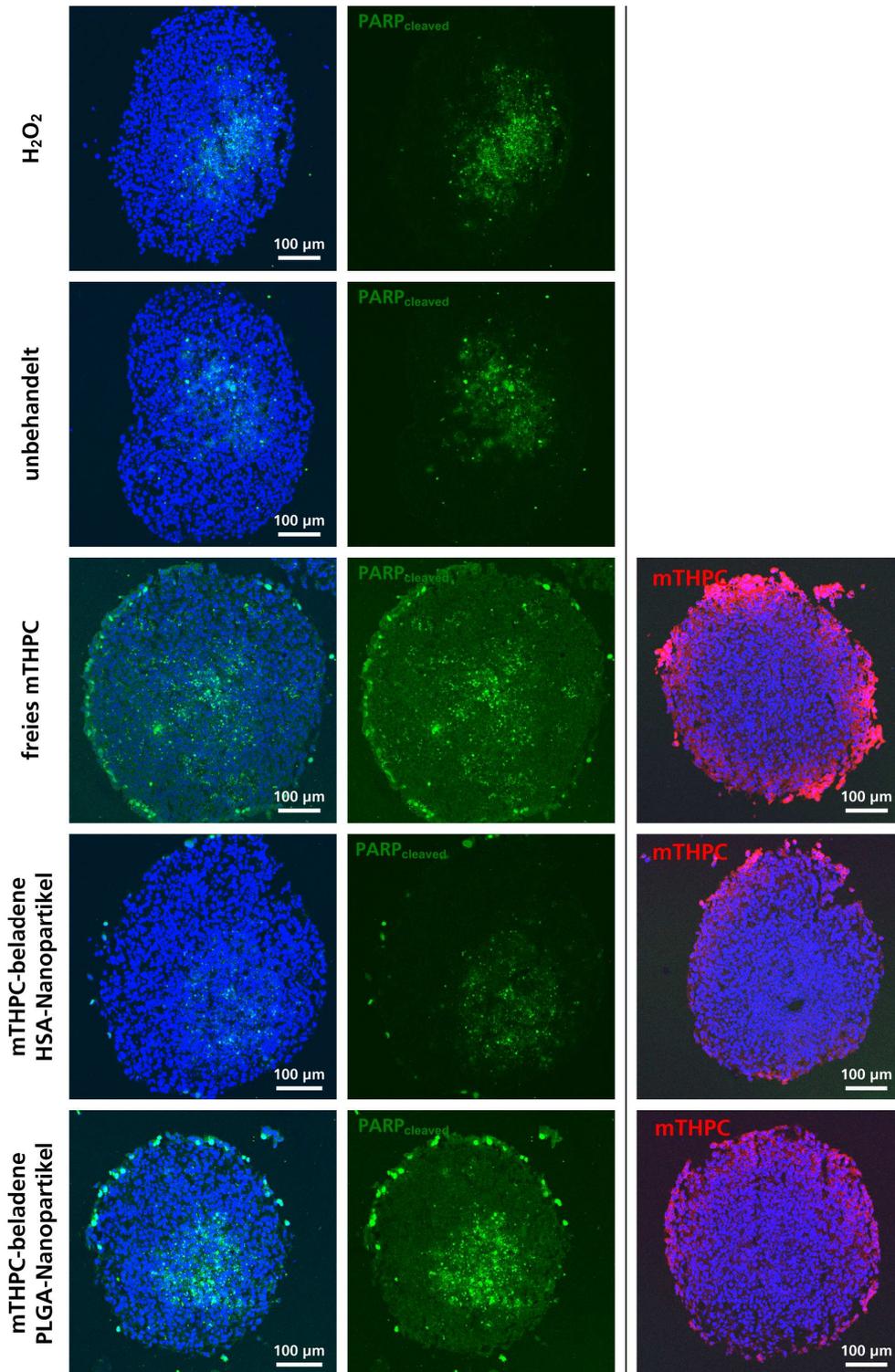
Nach sechs Tagen Kultivierung wurden die Sphäroide mit freiem mTHPC sowie mTHPC-beladenen Nanopartikeln (HSA und PLGA) (mTHPC-Konzentration: 3 µg/ml) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroide geschnitten und die Akkumulation mittels Raster-Lasermikroskopie untersucht. Die Zellkerne wurden zwecks Visualisierung mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die rote Autofluoreszenz von mTHPC sowie die grüne Autofluoreszenz von HSA-Nanopartikeln wurden zur Detektion verwendet. PLGA-Nanopartikel konnten über das inkorporierte Lumogen Yellow® (grün) detektiert werden (alle Kanäle auf H/K: 55 eingestellt).

Das mittels HSA-Nanopartikeln transportierte mTHPC wies dagegen nur eine schwache Färbung des Sphäroids auf. Diese fiel vornehmlich gleich verteilt über den ganzen Schnitt aus und wies vereinzelt punktuelle Intensitätsmaxima in den Randbereichen auf. Der Nachweis der Nanopartikel konnte über die HSA-eigene Autofluoreszenz bzw. das inkorporierte Lumogen Yellow® für PLGA-Nanopartikel erfolgen. Für HSA konnten keine Signale innerhalb der Schnitte detektiert werden. Die Aufnahmen wiesen den gleichen schwachen Hintergrund wie die unbehandelten Kontrollschnitte und mTHPC-behandelten Proben auf. Ein Signal konnte ausschließlich für Sphäroide ermittelt werden, die mit PLGA-Nanopartikeln inkubiert wurden. Hierbei konnte eine sich über den ganzen Schnitt verteilte Fluoreszenz mit lokalen Intensitätsmaxima ausfindig gemacht werden. Die Kontrolle wies weder eine Rot- noch eine Grün-Färbung auf.

Die Nanopartikel waren somit fähig, den gebundenen Photosensibilisator in die Sphäroide zu transportieren und dort freizusetzen. PLGA-assoziiertes mTHPC wies dabei eine ebenso gute Anreicherung wie der freie ungebundene Wirkstoff auf.

### **3.6.3.3 Nachweis von apoptotischen Ereignissen**

In einem weiteren Experiment sollte die Fähigkeit der jeweiligen Formulierung zur Apoptoseinduktion in HT29-Sphäroiden determiniert werden. Dies erfolgte über den immunhistochemischen Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub>. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen Proben, mit der Ausnahme, dass die Zellen nach erfolgter Inkubation zur Aktivierung der aufgenommenen Photosensibilisatoren bestrahlt (652 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>) wurden. In allen Proben konnte PARP<sub>cleaved</sub> zentrumsnah nachgewiesen werden (Abb. 42). Die Kontrollen, unbehandelte jedoch bestrahlte Sphäroide sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte Proben, wiesen keine weiteren Signale auf. In Folge der Wasserstoffperoxid-Behandlung waren die erhaltenen Sphäroide weniger kompakt sowie instabil und wiesen Risse beim Anfertigen der Schnitte auf. Die mTHPC-behandelten Proben wiesen neben den PARP<sub>cleaved</sub>-Signalen im Inneren der Sphäroide noch Signale im Randbereich auf. Diese Bereiche betrafen im Allgemeinen nur die abschließende Zellschicht und ummantelten den gesamten Sphäroid. Die Induktion fiel besonders stark für freies als auch PLGA-gebundenes mTHPC aus. Für HSA-transportiertes mTHPC konnten nur vereinzelt PARP<sub>cleaved</sub>-positive Zellen detektiert werden. Zum Vergleich und zur Bestätigung der Anwesenheit von mTHPC in den Proben wurden Photosensibilisator-behandelte und bestrahlte, jedoch nicht gefärbte Schnitte analysiert. Hierbei konnte die zuvor bereits beschriebene Lokalisation des Photosensibilisators vor allem in den äußeren Randbereichen bestätigt werden. Da in allen mTHPC-behandelten Proben PARP<sub>cleaved</sub> nachgewiesen werden konnte, konnte die Effektivität der jeweiligen Formulierungen auch am Tumormodell bestätigt werden.



**Abb. 42: Nachweis von PARP<sub>cleaved</sub> in Sphäroiden nach einer PDT-Behandlung.**

Sphäroide, hergestellt aus HT29-Zellen, wurden mit freiem und nanopartikelgebundenem mTHPC (HSA- und PLGA-Nanopartikel; konstante mTHPC-Konzentration 3 µg/ml; rot) für 24 h behandelt. Im Anschluss wurden die Sphäroide illuminiert (652 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>) und PARP<sub>cleaved</sub> immunhistochemisch nachgewiesen. Zur Visualisierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt und die Proben mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte sowie unbehandelte Zellen sowie zum Nachweis von mTHPC (rot) bestrahlte, aber nicht PARP<sub>cleaved</sub>-gefärbte Schnitte mituntersucht (alle Kanäle auf H/K: 55 eingestellt).

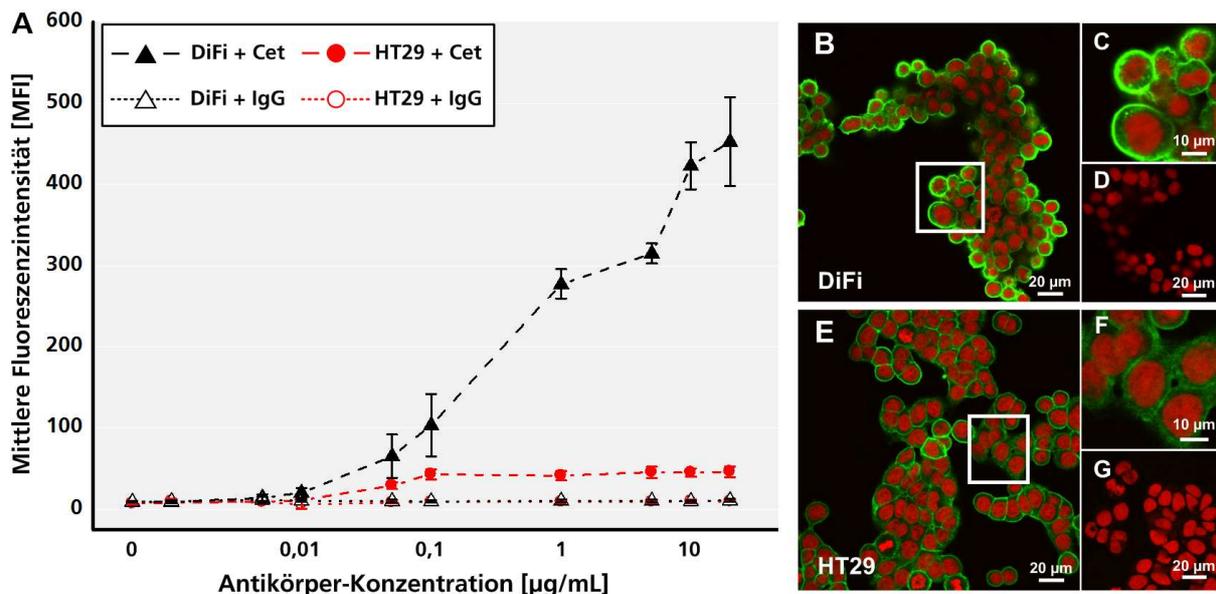
### **3.7 Zelltyp-spezifische nanopartikuläre Anreicherung**

Neben dem Photosensibilisator mTHPC sollten die neu entwickelten Formulierungen einen Zelltyp-spezifischen Liganden aufweisen, der eine spezifische Anreicherung im Zielgewebe ermöglichte. Durch ein Zelltyp-spezifisches Targeting kann der spezifische Transport eines Arzneistoffs in das gewünschte Zielgewebe ermöglicht werden. Zur Evaluierung einer Zelltyp-spezifischen nanopartikulären Akkumulation war zunächst der Expressionsstatus des zu bindenden Rezeptors zu überprüfen. Als Target diente der in vielen Tumoren überexprimierte, epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Anfänglich wurde der vorliegende Status der verwendeten Zelllinien überprüft (HT29 und DiFi), bevor die nanopartikulären Formulierungen getestet wurden.

#### **3.7.1 EGFR-Oberflächenexpression**

Die Untersuchung der EGFR-Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie (Abb. 43A) als auch Immunhistochemie (Abb. 43B-G) durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab bzw. einem unspezifischen IgG-Antikörper versetzt und die Bindung nachgewiesen. DiFi-Zellen zeigten hierbei einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Cetuximab-Bindung, wohingegen HT29-Zellen bereits ab geringen Antikörper-Konzentrationen (0,1 µg/ml) einen Sättigungseffekt erfuhren (Abb. 43A). Weder für HT29 noch für DiFi-Zellen konnte eine gesteigerte Interaktion mit dem unspezifischen IgG-Antikörper nachgewiesen werden.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie demonstrierte eine starke EGFR-Färbung von DiFi-Zellen (Abb. 43B, E). Diese zeigten eine intensive Färbung der gesamten Zelloberfläche, das ein verstärktes Vorhandensein des EGFR betonte. Im Gegensatz dazu wiesen HT29-Zellen nur eine schwache und zum Teil diffuse Färbung auf (Abb. 43E, G). Das erhaltene Signal war punktuell über die Zelle hinweg verteilt. Die Analyse verdeutlichte somit, dass es sich bei HT29-Zellen um EGFR-schwach exprimierende Zellen handelte, wohingegen DiFi-Zellen diesen Rezeptor in einer hohen Kopienzahl auf der Zelloberfläche exprimierten. Als Kontrolle wurden Zellen untersucht, die mit dem verwendeten Sekundärantikörper inkubiert wurden (Abb. 43D,G). Wiederum blieben die Kontrollen ohne Befund.



**Abb. 43: Bestimmung der EGFR-Expression von DiFi- und HT29-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie.**

(A) DiFi- und HT29-Zellen wurden mit ansteigenden IgG- und Cetuximab-Konzentrationen (0-20 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert und durchflußzytometrisch zur Bestimmung der zellulären Bindung untersucht. Die Messung der zellulären Cetuximab-Bindung wurde an unabhängigen biologischen Triplikaten durchgeführt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mituntersucht (0). (B-G) DiFi- und HT29-Zellen wurden auf Glassobjektträgern kultiviert und mit dem spezifischen Antikörper Cetuximab für 1 h bei RT inkubiert. Zur Visualisierung wurde die Zellmembran mit einem Alexa Fluor 488-gekoppeltem Sekundärantikörper (grün) sowie die Zellkerne mit Propidiumiodid (rot) gefärbt. (B, D) DiFi-Zellen, (B) Gesamtübersicht, (C) Vergrößerung aus B (weißes Quadrat), (D) Kontrolle (Sekundärantikörper). (E, G) HT29-Zellen, (E) Gesamtübersicht, (F) Vergrößerung aus E (weißes Quadrat), (G) Kontrolle (Sekundärantikörper).

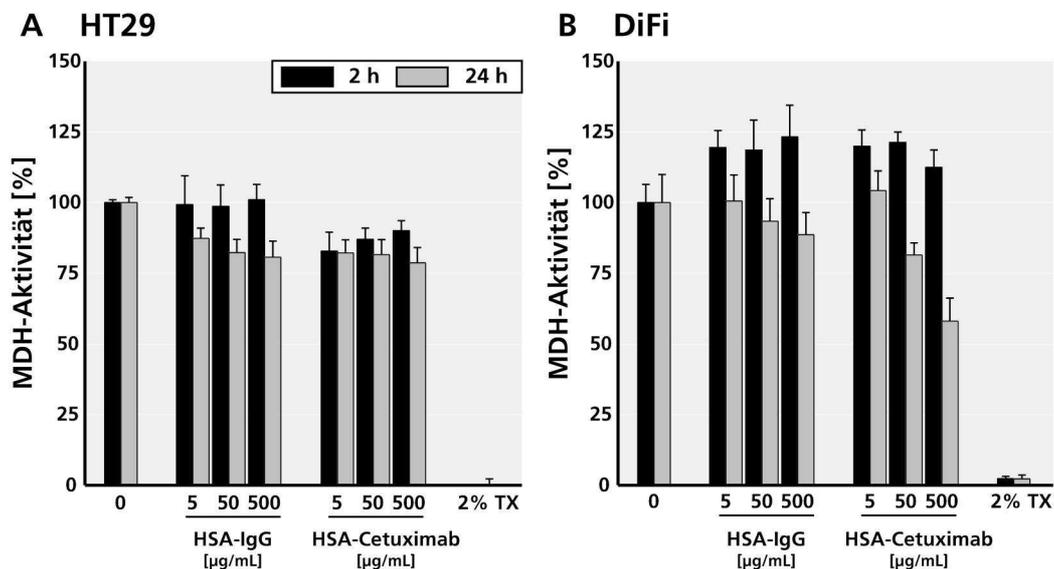
### 3.7.2 Spezifische HSA-Nanopartikel

Die Überprüfung der Spezifität von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikel erfolgte über verschiedene Untersuchungen, die durchflusszytometrische und mikroskopische Ansätze umfassten.

#### 3.7.2.1 Zytotoxizität

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die entwickelten Nanopartikel hinsichtlich ihres Einflusses auf die MDH-Aktivität bzw. damit assoziierte zelluläre Viabilität untersucht. HT29- und DiFi-Zellen wurden entsprechend mit ansteigenden Nanopartikel-Konzentrationen (5-500 µg/ml Nanopartikel  $\approx$  0,1-10 µg/ml Cetuximab) für 2 und 24 h inkubiert und anschließend die Aktivität bestimmt (Abb. 44). Die ermittelte Viabilität für DiFi-Zellen nahm nach einer 2 h Inkubation für alle untersuchten Nanopartikel (HSA-IgG und HSA-Cetuximab) und eingesetzten Konzentration zu. Nach Erhöhung der Expositionsdauer auf 24 h konnte eine konzentrationsabhängige Verminderung der MDH-Aktivität detektiert werden. Die stärkste Reduktion (58 %) wurde hierbei für die höchste HSA-Cetuximab-Konzentration (500 µg/ml) ermittelt. HT29-Zellen wiesen nach

2 h Inkubation mit den Kontrollpartikeln (HSA-IgG) eine gleichbleibende Viabilität auf. Diese nahm für alle getesteten Konzentrationen mit Anstieg der Inkubationsdauer leicht ab. Zellen, die mit HSA-Cetuximab Nanopartikeln inkubiert wurden, verfügen über eine reduzierte Viabilität, die jedoch unabhängig von der jeweiligen Inkubationszeit war.



**Abb. 44: Toxizität von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln.**

HT29- und DiFi-Zellen wurden mit ansteigenden HSA-Nanopartikel-Konzentrationen (HSA-IgG- & HSA-Cetuximab-Nanopartikeln; 5-500 µg/ml) für 2 und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellviabilität (WST-1 Assay) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (0) sowie mit 2 % Triton X-100 behandelte Zellen (2 % TX) mituntersucht.

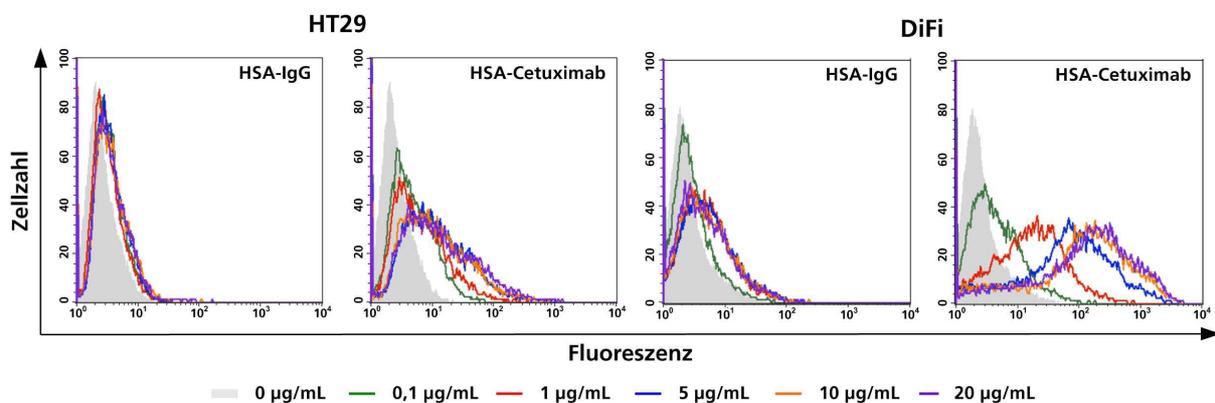
### 3.7.2.2 Zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln

#### **Konzentrationsabhängige spezifische Bindung**

Nach der Testung der Nanopartikel hinsichtlich einer eventuellen Zytotoxizität erfolgte die Analyse der spezifischen Bindung. Diesbezüglich wurden die Zellen (HT29 und DiFi) mit den jeweiligen Formulierungen (HSA-IgG, HSA-Cetuximab; 0-20 µg/ml Antikörper) für 2 h inkubiert und die Bindung via Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 45). Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse für HT29 verdeutlichte eine gesteigerte Bindung der Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikel gegenüber den unspezifischen IgG-Kontrollpartikeln (Abb. 45; Tab. 10). Diese wiesen selbst bei Erhöhung der eingesetzten Antikörperkonzentration keine gesteigerte Bindung auf. Der maximale Anteil an Zellen, die positiv für eine Bindung mit HSA-IgG Nanopartikeln detektiert wurden, betrug  $5,41 \pm 2,12$  % (20 µg/ml; Tab. 10). Die zelluläre Bindung der Cetuximab-modifizierten Nanopartikel fiel hingegen spezifisch aus und schlug sich in einer Erhöhung des Anteils positiv detektierter Zellen nieder. Der Anteil an positiven Zellen stieg von anfänglich  $10,51 \pm 5,13$  % (0,1 µg/ml) auf  $34,76 \pm 18,13$  % (20 µg/ml) an. Bereits ab einer

eingesetzten Konzentration von 5 µg/ml konnte nur noch eine schwache Steigerung der Bindung, trotz steigender Antikörper-Konzentration, beobachtet werden (Abb. 45; Tab. 10). Durch die Bindung des spezifischen Antikörpers Cetuximab an HSA-Nanopartikel konnte die zelluläre Bindung von HSA-Nanopartikeln gegenüber unspezifischen HSA-Nanopartikeln gesteigert werden.

Weiterhin wurde die zelluläre Bindung der entwickelten Nanopartikel an DiFi-Zellen getestet. Diese wiesen eine hohe EGFR-Expression auf ihrer Zelloberfläche auf (siehe Abb. 44) und sollten somit eine gute Interaktion mit Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln zeigen. Mit der anschließenden Analyse konnte diese Hypothese verifiziert werden. Durch Steigerung der eingesetzten Antikörperkonzentration konnte die Anzahl an positiv detektierten Zellen konzentrationsabhängig erhöht werden (Abb. 45). Die unspezifischen IgG-Kontrollpartikel zeigten eine leichte Bindungstendenz, die sich trotz Erhöhung der eingesetzten Antikörperkonzentration jedoch nicht weiter verstärken ließ (Abb. 45). Die spezifische Bindung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln fiel um ein Vielfaches stärker aus als eine Vergleichbare mit HSA-IgG Nanopartikeln. Die Zellen erfuhren eine konzentrationsabhängige Steigerung an positiv detektierten Zellen.



**Abb. 45: Spezifische zelluläre Bindung Cetuximab-modifizierter HSA-Nanopartikel.**

HT29- und DiFi-Zellen wurden mit ansteigenden Nanopartikelkonzentrationen (HSA-IgG und HSA-Cetuximab Nanopartikel entsprechend einer Antikörper-Konzentration: 0-20 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die zelluläre Bindung der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Daten als Histogramm des korrespondierenden Fluoreszenzkanals (Autofluoreszenz der Nanopartikel).

Zur besseren Erfassung der Ergebnisse wurden die erhaltenen Daten tabellarisch zusammengefasst (Tab. 10). Die spezifische Bindung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln an DiFi erfuhren eine Steigerung von anfänglich  $18,22 \pm 0,46$  % (0,1 µg/ml Cetuximab) auf  $89,17 \pm 5,90$  % (20 µg/ml Cetuximab). Bereits ab einer eingesetzten Antikörperkonzentration von 5 µg/ml konnte dieser Bindungsanteil an positiven Zellen ermittelt werden, jedoch erfuhren die Zellen eine weitere Steigerung in der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität. Trotz eines relativ gleichbleibenden prozentualen Anteils

stieg die Fluoreszenz (MFI) von  $98,37 \pm 18,67$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ) über  $166,72 \pm 47,56$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ) auf  $197,07 \pm 41,19$  (20  $\mu\text{g/ml}$ ) an. Dieser Anstieg zeigt, dass eine Vielzahl an Zellen eine Steigerung der Anzahl an gebundenen HSA-Nanopartikel erfahren hat.

**Tab. 10: Bestimmung der spezifischen zellulären Bindung von Cetuximab- und IgG-modifizierten HSA-Nanopartikel (n=4).**

	Antikörper-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	HSA-IgG-Nanopartikel		HSA-Cetuximab-Nanopartikel	
		% positive Zellen	MFI	% positive Zellen	MFI
HT29	0,1	$2,65 \pm 0,82$	$8,27 \pm 2,24$	$10,51 \pm 5,13$	$10,07 \pm 2,44$
	1	$2,57 \pm 1,02$	$8,76 \pm 2,19$	$19,84 \pm 11,21$	$13,28 \pm 5,95$
	5	$4,82 \pm 2,29$	$9,61 \pm 2,68$	$32,17 \pm 20,51$	$16,76 \pm 9,47$
	10	$6,52 \pm 3,23$	$10,40 \pm 3,54$	$32,91 \pm 15,55$	$16,75 \pm 8,56$
	20	$5,41 \pm 2,12$	$11,17 \pm 3,48$	$34,76 \pm 18,13$	$19,52 \pm 11,96$
DiFi	0,1	$10,05 \pm 13,03$	$15,07 \pm 3,66$	$18,22 \pm 10,46$	$16,46 \pm 1,83$
	1	$32,74 \pm 27,46$	$16,76 \pm 2,82$	$67,33 \pm 8,08$	$37,35 \pm 3,77$
	5	$39,51 \pm 33,32$	$22,67 \pm 9,06$	$87,20 \pm 7,05$	$98,37 \pm 18,67$
	10	$42,71 \pm 37,82$	$27,18 \pm 16,52$	$87,33 \pm 5,52$	$166,72 \pm 47,56$
	20	$45,60 \pm 37,47$	$32,71 \pm 19,77$	$89,17 \pm 5,90$	$197,07 \pm 41,19$

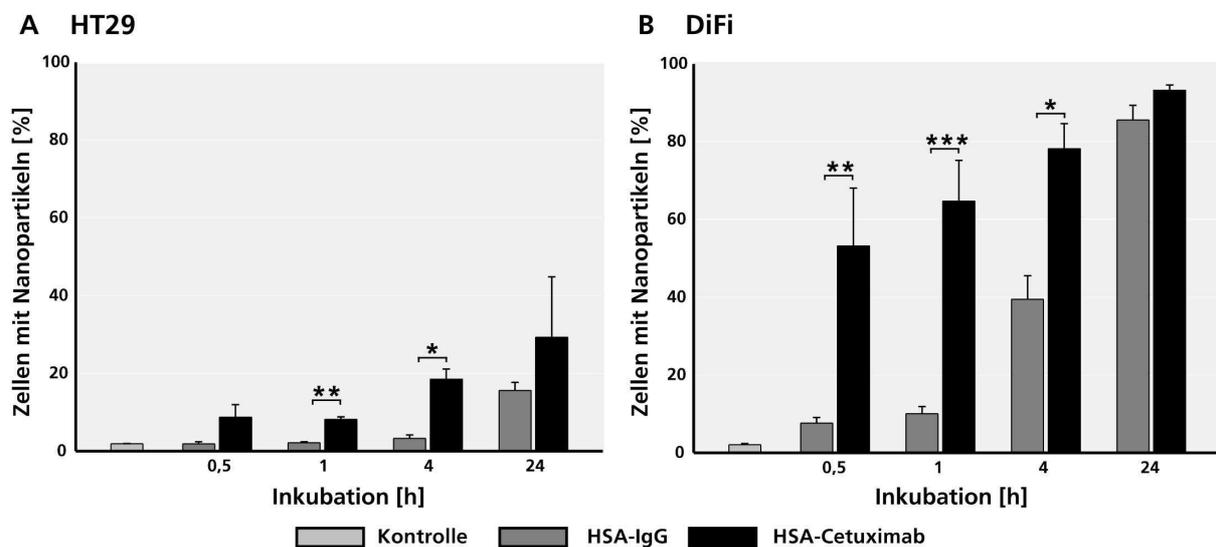
Unbehandelte HT29-Zellen dienen als Kontrolle mit einem mittleren Anteil von  $1,73 \pm 0,14$  % positiven Zellen und einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von  $8,30 \pm 2,46$ . Ebenfalls unbehandelte DiFi-Zellen wurden als Kontrolle mit einem mittleren Anteil von  $1,88 \pm 0,10$  % positiven Zellen und einer mittleren Fluoreszenzintensität von  $11,36 \pm 1,72$  verwendet.

Zusammenfassend zeigten sowohl HT29- als auch DiFi-Zellen eine konzentrationsabhängige Bindung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln. Dabei zeigten DiFi-Zellen, als Vertreter einer stark EGFR-exprimierenden Zelllinie, gegenüber den schwach EGFR-exprimierenden HT29 eine erhöhte zelluläre Bindung. Die Bindung der Kontrollpartikel fiel in beiden Zelllinien gering aus und verdeutlichte die Spezifität des entwickelten Systems.

### **Zeitabhängige spezifische Bindung**

Zur genaueren Charakterisierung der zellulären Bindung wurde im Anschluss die Zeitabhängigkeit dieser differenziert untersucht. Hierzu wurden HT29- und DiFi-Zellen mit einer konstanten Nanopartikelkonzentration (0,1 mg/ml) für maximal 24 h (sowie 30 min, 1 und 4 h) inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch evaluiert. Die zelluläre Bindung von Cetuximab-spezifisierten Nanopartikeln konnte in beiden Fällen erhöht werden (Abb. 46). HT29-Zellen zeigten hierbei eine Steigerung an positiv detektierten Zellen von 10 % (0,5 h) auf eine maximale Bindung von 29 % (24 h; Abb. 46A). Der Anteil an unspezifisch gebundenen Nanopartikeln stieg ebenfalls, erreichte jedoch lediglich eine Bindungseffizienz von 16 % (24 h). Die Unterschiede in der zellulären Bindung zwischen spezifischen HSA-Cetuximab- und unspezifischen HSA-IgG-Nanopartikeln waren vor allem für die mittleren Inkubationszeiten (1 und 4 h) signifikant verschieden. Mit Erhöhung der Inkubationsdauer nahm der Anteil an unspezifisch

gebunden Nanopartikeln zu und die zuvor signifikant unterschiedliche Bindungsdifferenz ging verloren. DiFi-Zellen wiesen bereits nach 30 min Inkubation eine signifikant erhöhte zelluläre Bindung von Cetuximab-modifizierten Nanopartikeln (53 %) gegenüber den Kontrollpartikeln (8 %) auf (Abb. 46B). Durch Verlängerung der Inkubationszeit konnte der Anteil an positiv detektierten Zellen auf 93 % (24 h) angehoben werden. Die Unterschiede in der zellulären Bindung zwischen HSA-Cetuximab und HSA-IgG Nanopartikeln waren für die kürzeren Inkubationszeiten (0,5-4 h) signifikant. Zu diesen Zeiten lag die unspezifische HSA-IgG Bindung bei maximal 39 % (4 h). Der signifikante Bindungsunterschied ging, wie zuvor für HT29 beschrieben, mit Erhöhung der Nanopartikelexposition verloren.



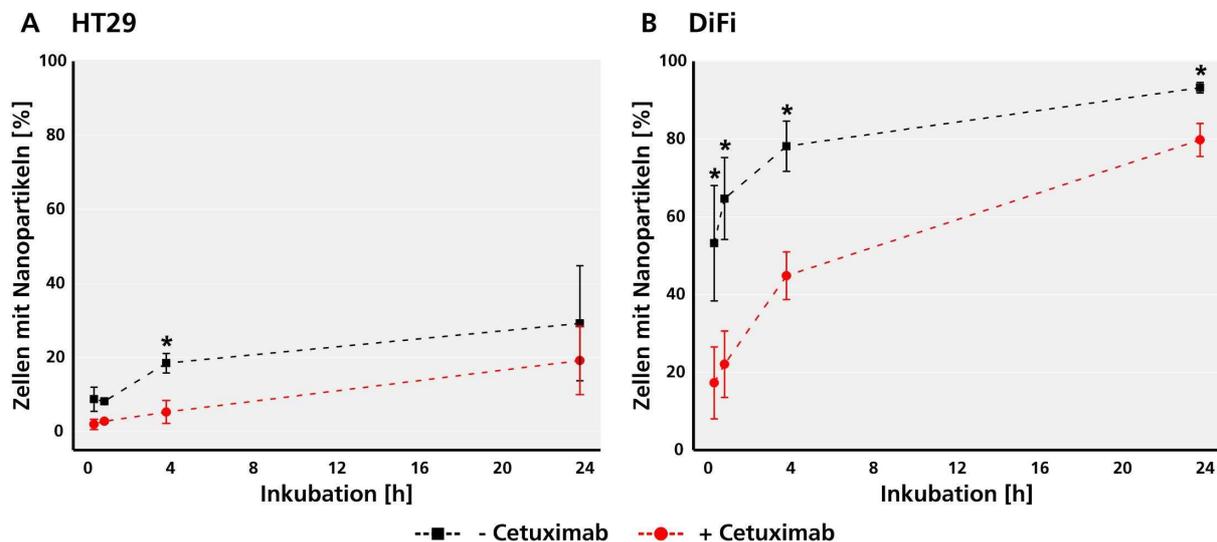
**Abb. 46: Spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln.**

Schwach EGFR-exprimierende HT29-Zellen (A) und stark EGFR-exprimierende DiFi-Zellen (B) wurden mit unterschiedlichen nanopartikelulären Formulierungen (0,1 mg/ml) für 0,5-24 h bei 37 °C inkubiert. Eine zelluläre Bindung konnte im Anschluss durchflusszytometrisch bestimmt werden. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Die Unterschiede in der zellulären Bindung zwischen HSA-Cetuximab und HSA-IgG Nanopartikeln sind signifikant ( $p < 0,05$ ; \*, Students T-Test), sehr signifikant ( $p < 0,01$ ; \*\*, Students T-Test) und extrem signifikant ( $p < 0,001$ ; \*\*\*, Students T-Test). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

### **Hemmung der spezifischen Bindung**

In den vorangegangenen Experimenten konnte die Spezifität der Cetuximab-modifizierten Nanopartikel für die unterschiedlichen Zelllinien demonstriert werden. Infolgedessen sollte der Einfluss von freiem Cetuximab auf diese Bindung untersucht und quantifiziert werden. Die Zellen wurden entsprechend mit einer konstanten HSA-Cetuximab Konzentration (0,1 mg/ml) für 0,5-24 h inkubiert. Zusätzlich wurde einem Teil der Proben freies Cetuximab (5  $\mu$ g/ml) zugesetzt und die Bindung ermittelt. Die schwach EGFR-exprimierenden HT29 zeigten, wie zuvor beschrieben, einen zeitabhängigen Anstieg der zellulären Bindung (Abb. 47A). Durch Zugabe von freiem Cetuximab konnte

diese in allen Untersuchungen reduziert werden. Die Verringerung der Bindung war jedoch nur nach einer Inkubationszeit von 4 h signifikant. Die stärkste Reduktion konnte bei DiFi-Zellen beobachtet werden (Abb. 47B). Zu allen untersuchten Zeitpunkten waren die Unterschiede in der spezifischen Bindung von HSA-Cetuximab-Nanopartikeln in der An- und Abwesenheit von freiem Cetuximab signifikant reduziert. Die Bindung fiel besonders nach kürzeren Inkubationszeiten gering aus. Ohne die Zugabe von Cetuximab betrug die zelluläre Bindung an DiFi-Zellen nach 1 h Inkubation in etwa 65 %, nach Zugabe von freiem Cetuximab jedoch nur noch 22 %. Das freie Cetuximab konnte somit die spezifische Bindung der Nanopartikel signifikant inhibieren. Die kompetitive Hemmung, durch den freien Antikörper, führte letztendlich zu einer reduzierten zellulären Bindung der oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikel.



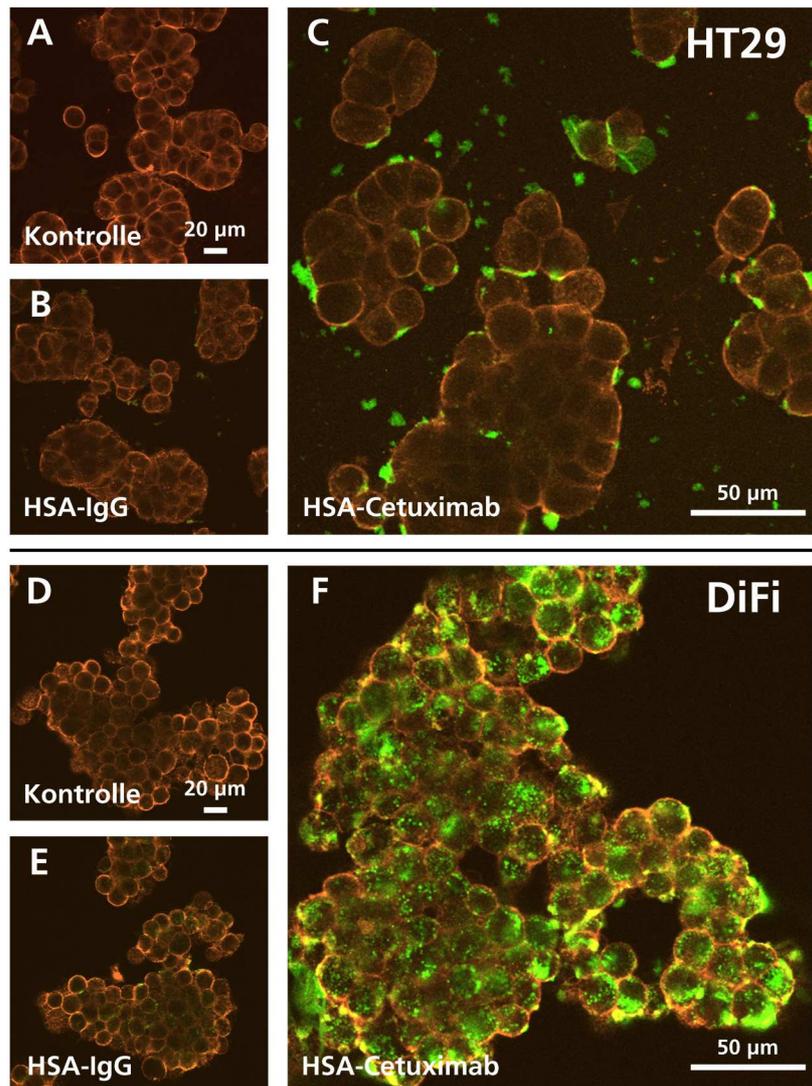
**Abb. 47: Spezifische zelluläre Bindung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln in der An- und Abwesenheit von freiem Cetuximab.**

Schwach EGFR-exprimierende HT29-Zellen (A) und stark EGFR-exprimierende DiFi-Zellen (B) wurden mit Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln (0,1 mg/ml) für 0,5-24 h bei 37 °C in der An- (+) und Abwesenheit (-) von freiem Cetuximab (5 µg/ml) inkubiert. Eine zelluläre Bindung konnte im Anschluss durchflusszytometrisch bestimmt werden. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Die Unterschiede in der spezifischen Bindung von HSA-Cetuximab-Nanopartikeln in der An- und Abwesenheit von freiem Cetuximab sind signifikant, wenn  $p < 0,05$  (\*, Students T-Test). Unbehandelte Zellen dienten zur Einstellung der Messungen.

### ***Intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung***

Die intrazelluläre Aufnahme und die subzelluläre Verteilung der nanopartikulären Formulierungen wurden mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie untersucht. HT29 (Abb. 48A-C) und DiFi (Abb. 48D-F) Zellen wurden sowohl mit Cetuximab-spezifischen Nanopartikeln (HSA-Cetuximab) als auch mit unspezifischen IgG-modifizierten Kontrollpartikeln (HSA-IgG) inkubiert (Abb. 48). HT29 wiesen keine unspezifische Nanopartikel im Zellinnern auf (Abb. 48B). Die spezifischen Nanopartikel zeigten eine

stärkere Bindung und befanden sich überwiegend in oder an der Zellmembran (Abb. 48C). DiFi-Zellen wiesen sich dagegen durch eine starke intrazelluläre Akkumulation von spezifischen HSA-Nanopartikel aus (Abb. 48F). Die grüne Autofluoreszenz der spezifisch aufgenommenen HSA-Cetuximab-Nanopartikel war deutlich im Zellinneren zu erkennen. Die unspezifischen Kontrollpartikel konnten dagegen nur im geringen Masse in bzw. an den Zellen detektiert werden (Abb. 48E). Mittels der erhaltenen Ergebnisse konnten die zuvor erlangten Beobachtungen bestätigt werden.



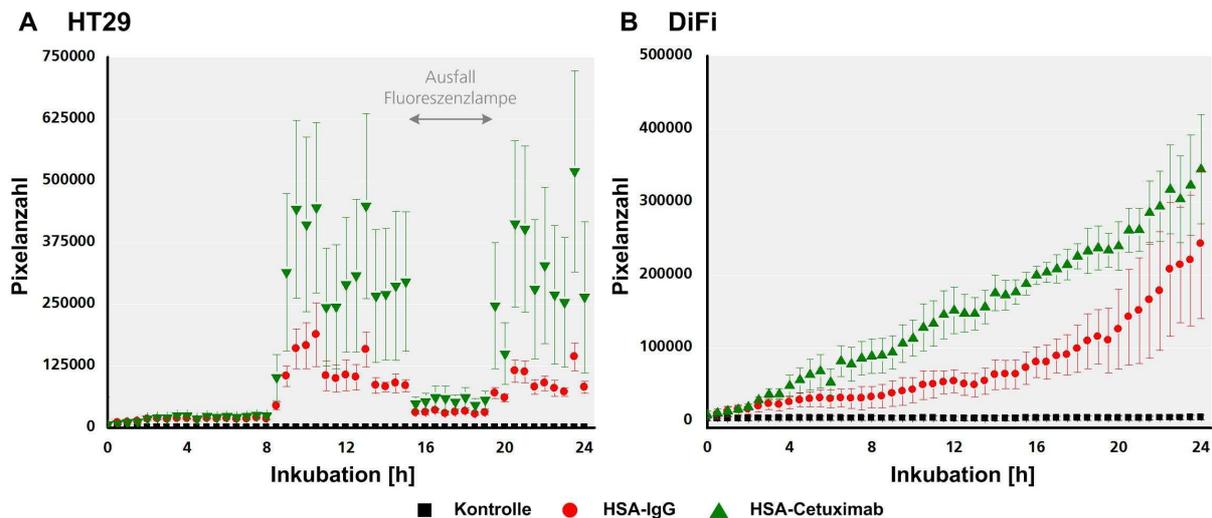
**Abb. 48: Untersuchung der zelluläre Akkumulation von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.**

HT29- (A-C) und DiFi- (D-F) Zellen wurden auf Glasobjektträgern kultiviert und mit unterschiedlichen nanopartikelären Formulierungen (0,1 mg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel sowie eine Membranfärbung (Concanavalin A Alexa Fluor Tetramethylrhodamin, orange\_H/K: 65) wurden zur Detektion verwendet. (A, D) unbehandelte Kontrollzellen; (B, E) mit HSA-IgG-Nanopartikeln inkubierte Zellen; (C, F) mit HSA-Cetuximab-Nanopartikeln inkubierte Zellen.

### **Automatisierte Analyse der zeitabhängigen Anreicherung (Time-Laps-Analyse)**

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte die Spezifität der entwickelten nanopartikulären Systeme evaluiert und verifiziert werden. Zur weiteren Charakterisierung der spezifischen zellulären Akkumulation in die untersuchten Zelllinien wurde ein automatisiertes Bildgebungsverfahren (Time-Laps-Analysen) verwendet. Die Zellen wurden in entsprechenden Kammern mit den unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen (0,1 mg/ml) für 24 h kultiviert und in 15-minütigen Intervallen wurden Aufnahmen (Phasenkontrast und Fluoreszenz) von zuvor markierten Bereichen aufgenommen (Biostation M). Anschließend wurden unter Verwendung der Software *GIMP* die Pixelwerte der einzelnen Bereiche in Hinblick auf die verwendeten Nanopartikel bestimmt. Hierzu konnte die grüne Autofluoreszenz der HSA-Nanopartikel herangezogen und die entsprechenden Werte bestimmt werden. Die folgende Auswertung ermöglichte somit die Untersuchung der noch nicht ausreichend charakterisierten Zeiträume zwischen 4 und 24 h. Die Analyse ergab für HT29 ein differenziertes Ergebnis (Abb. 49A). Innerhalb der ersten acht Stunden konnte eine gleichbleibend geringe zelluläre Akkumulation beider Systeme beobachtet werden. Im weiteren Verlauf nahm der ermittelte Pixelwert für die spezifisch-modifizierten Nanopartikel zu und verlief auf einem erhöhten Plateau. Die unspezifischen Nanopartikel zeigten ebenfalls einen Anstieg, der jedoch deutlich geringer ausfiel. Sowohl die spezifischen als auch die unspezifischen Proben wiesen über einen Zeitraum von 4 h (15,5-19,5 h) eine erniedrigte Fluoreszenz auf, der durch einen kurzzeitigen Ausfall der Fluoreszenzlampe begründet ist. Im Anschluss nahmen beide Proben den gleichen Wert ein und verblieben auf diesem Niveau. DiFi-Zellen zeigten einen zeitabhängigen Anstieg der ermittelten Pixelwerte für beide nanopartikulären Systeme (Abb. 49B). Hierbei lag die ermittelte Pixelnummer der spezifischen HSA-Cetuximab Nanopartikel deutlich über den Werten der IgG-modifizierten Nanopartikel. Ab einer Inkubationszeit von vier Stunden nahm die Differenz zwischen den Proben zu und verblieb bis zum Ende der Messung auf einem unterschiedlich hohen Niveau.

Die spezifische Anreicherung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikel gegenüber unspezifischen IgG-Partikeln konnte in unterschiedlichen Ansätzen demonstriert und bestätigt werden. Hoch EGFR-exprimierende DiFi-Zellen zeigten hierbei die stärkste Interaktion mit dem neu entwickelten System.



**Abb. 49: Automatische Bildgebung der zeitabhängigen Anreicherung von spezifischen HSA-Nanopartikeln (BioStation M).**

HT29- (A) und DiFi- (B) Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlich oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln (0,1 mg/ml; HSA-Cetuximab: Cetuximab-modifizierter HSA-Nanopartikel; HSA-IgG: IgG-modifizierter HSA-Nanopartikel) bei 37 °C inkubiert. Alle 15 min wurde von den Zellen sowohl eine Phasenkontrast- als auch eine Fluoreszenz-Aufnahme (grüner Kanal; Verwendung der herstellungsbedingten HSA-Autofluoreszenz) angefertigt. Die Fluoreszenzintensität wurde ermittelt und als Pixelanzahl gegen die jeweilige Inkubationsdauer aufgetragen. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von vier Meßpunkten dar. Pfeil markiert in (A) den Ausfall der Fluoreszenzlampe.

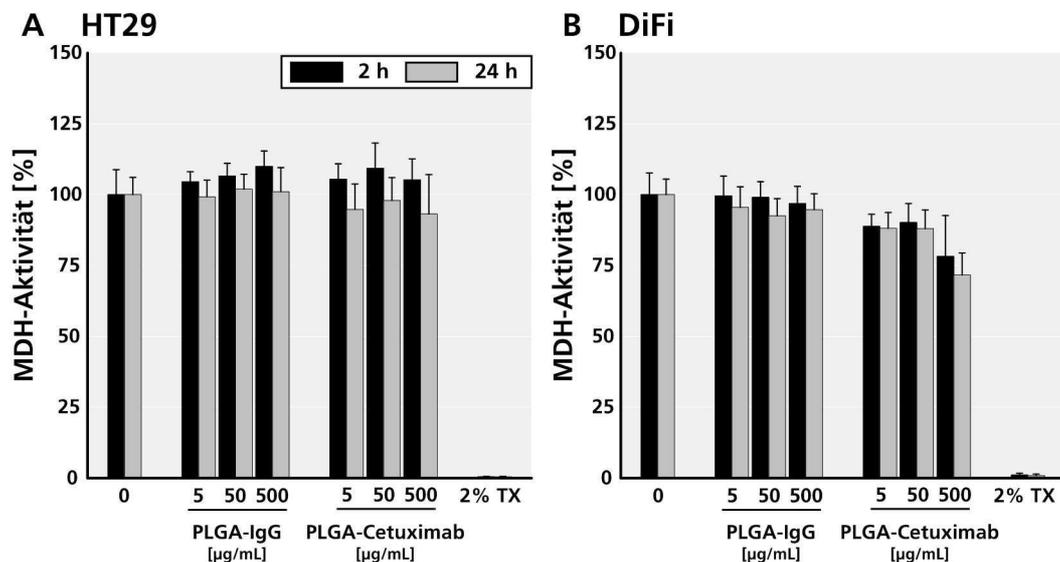
### 3.7.3 Spezifische PLGA-Nanopartikel

Im Anschluss erfolgte die Überprüfung der Spezifität von Cetuximab-modifizierten PLGA-Nanopartikel. Hierzu wurden die zuvor beschriebenen Methoden verwendet und die zelluläre Interaktion bestimmt.

#### 3.7.3.1 Zytotoxizität

Die Überprüfung einer toxischen Wirkung des nanopartikulären Systems erfolgte über die Bestimmung der MDH-Aktivität (WST-1-Assay) in Folge einer Inkubation mit den beiden Formulierungen. HT29- und DiFi-Zellen wurden hierzu mit ansteigenden Nanopartikel-Konzentrationen (5-500  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikel  $\triangleq$  0,05-5  $\mu\text{g/ml}$  Cetuximab) für 2 und 24 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität bestimmt (Abb. 50). HT29-Zellen wiesen nach einer 2-stündigen Inkubation für beide untersuchten Formulierungen eine leicht gesteigerte Aktivität auf. Diese nahm im weiteren Verlauf der Inkubation jedoch ab und lag in etwa auf der Höhe der Kontrolle. Es konnte für keine Inkubationszeit bzw. untersuchte Konzentration eine toxische Wirkung auf die Zellen beobachtet werden. DiFi-Zellen zeigten sowohl eine zeit- als auch konzentrationsabhängige schwache Reduktion. IgG-modifizierte PLGA-Nanopartikel bewirkten lediglich eine geringe Reduktion der gemessenen MDH-Aktivität, wohingegen diese bei Cetuximab-modifizierten

Nanopartikeln weiter abnahm. Hierbei zeigte die höchste Konzentration die stärkste Reduktion (24 h, 500 µg/ml: ca. 72 %).



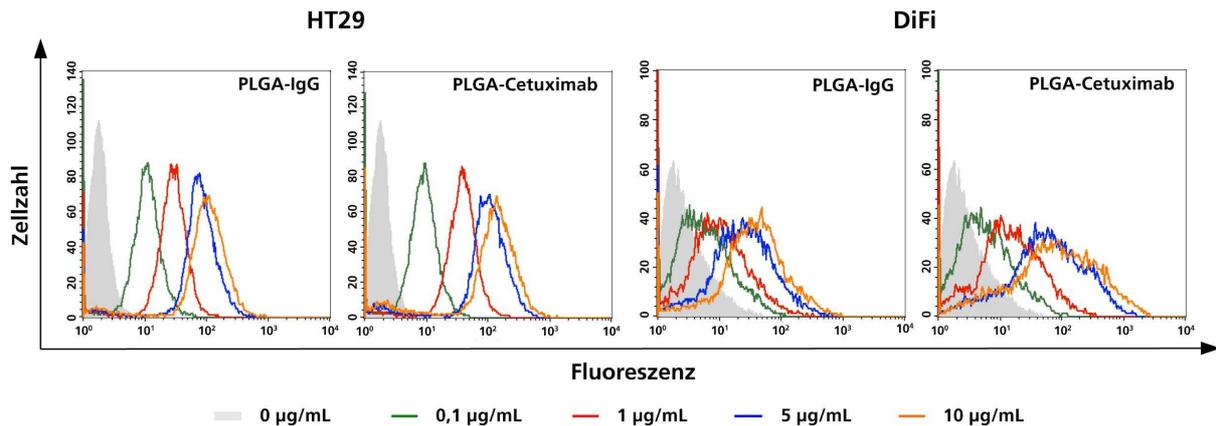
**Abb. 50: Toxizität von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln.**

HT29- und DiFi-Zellen wurden mit ansteigenden PLGA-Nanopartikel-Konzentrationen (PLGA-IgG- & PLGA-Cetuximab-Nanopartikeln; 5-500 µg/ml) für 2 und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellviabilität (WST-1 Assay) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (0) sowie mit 2 % Triton X-100 behandelte Zellen (2 % TX) mituntersucht.

### 3.7.3.2 Zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln

#### **Konzentrationsabhängige zelluläre Bindung**

Die Analyse der Ergebnisse ergab, dass die untersuchten PLGA-Nanopartikel erst bei sehr hohen Konzentrationen einen toxischen Einfluss auf die untersuchten Zellen besaßen (siehe Abb. 50). Da eine später applizierte Konzentration geringer ausfallen würde, konnten die Proben hinsichtlich ihrer Bindung untersucht werden. Im Folgenden wurde daher die zelluläre Bindung der beiden Formulierungen mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Die Bestimmung der zellulären Bindung an HT29- und DiFi-Zellen erfolgte nach 2 h Inkubation bei 37 °C. HT29-Zellen zeigten nach einer Kultivierung mit den zu untersuchenden Nanopartikeln einen konzentrationsabhängigen Bindungsanstieg der spezifischen als auch unspezifischen Formulierungen (Abb. 51; Tab. 11). Die Betrachtung der dazugehörigen MFI-Daten (Tab 11) wies leicht erhöhte Werte der Cetuximab-modifizierten Nanopartikel gegenüber den unspezifischen Partikeln auf. Mit Anstieg der eingesetzten Antikörperkonzentration nahm die Differenz zwischen den untersuchten Proben stetig zu.



**Abb. 51: Spezifische zelluläre Bindung Cetuximab-modifizierter PLGA-Nanopartikel.**

HT29- und DiFi-Zellen wurden mit ansteigenden Nanopartikelkonzentrationen (PLGA-IgG und PLGA-Cetuximab Nanopartikel entsprechend einer Antikörper-Konzentration: 0-10 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die zelluläre Bindung der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Daten als Histogramm des korrespondierenden Fluoreszenzkanals (Fluoreszenz von Lumogen Yellow®).

Neben HT29-Zellen wurden DiFi-Zellen untersucht (Abb.51, Tab. 11). Diese zeigten ebenfalls eine konzentrationsabhängige Bindung der untersuchten Formulierungen. Im Gegensatz zu HT29 konnte bei DiFi-Zellen bereits bei Betrachtung der Histogrammverläufe eine stärkere Bindung der Cetuximab-modifizierten Nanopartikel gegenüber der unspezifischen Kontrollpartikel beobachtet werden. Diese konnten auch in den gemessenen MFI-Werten ermittelt werden und war für die höchste eingesetzte Konzentration am Deutlichsten (Tab. 12; 10 µg/ml Antikörper; PLGA-IgG:  $46,84 \pm 11,65$ ; PLGA-Cetuximab:  $75,87 \pm 18,55$ ).

**Tab. 11: Quantifizierung der spezifischen zellulären Bindung von Cetuximab- und IgG-modifizierten PLGA-Nanopartikel (n=2).**

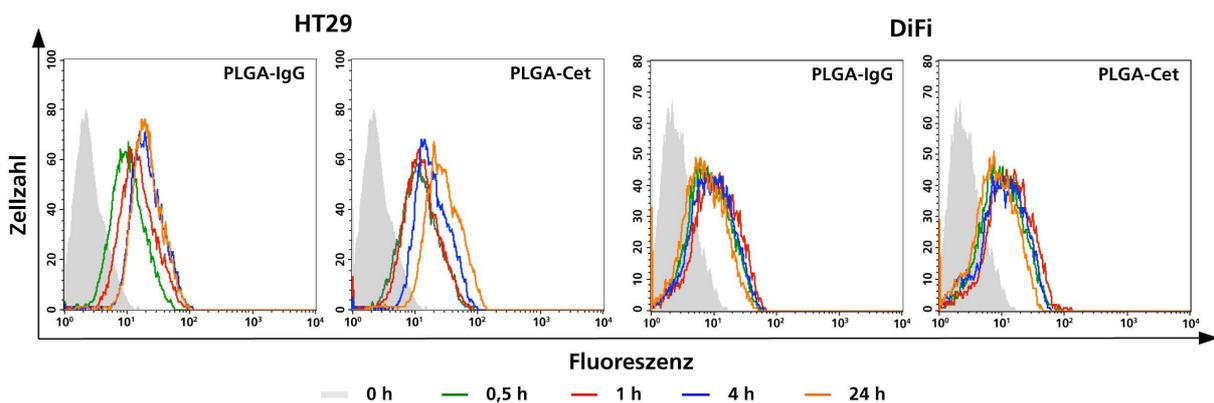
	Antikörper-Konzentration [µg/ml]	PLGA-IgG-Nanopartikel		PLGA-Cetuximab-Nanopartikel	
		% positive Zellen	MFI	% positive Zellen	MFI
HT29	0,1	$75,12 \pm 30,97$	$12,62 \pm 2,26$	$75,22 \pm 26,95$	$11,72 \pm 3,29$
	1	$97,99 \pm 1,79$	$25,94 \pm 3,17$	$98,37 \pm 1,01$	$34,33 \pm 4,09$
	5	$99,33 \pm 0,03$	$66,75 \pm 20,24$	$99,01 \pm 0,35$	$88,57 \pm 23,09$
	10	$99,18 \pm 0,04$	$85,84 \pm 29,58$	$99,03 \pm 0,29$	$110,69 \pm 32,46$
DiFi	0,1	$30,94 \pm 14,28$	$14,82 \pm 2,18$	$30,47 \pm 10,81$	$14,74 \pm 1,69$
	1	$57,58 \pm 13,33$	$19,07 \pm 1,92$	$69,08 \pm 8,09$	$21,88 \pm 1,05$
	5	$87,92 \pm 7,57$	$33,03 \pm 7,51$	$92,93 \pm 2,36$	$54,33 \pm 6,97$
	10	$94,49 \pm 2,91$	$46,84 \pm 11,65$	$94,13 \pm 3,44$	$75,87 \pm 18,55$

Unbehandelte HT29-Zellen dienten als Kontrolle mit einem mittleren Anteil von  $1,88 \pm 0,01$  positiver Zellen, und einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von  $7,57 \pm 2,93$ . Ebenfalls unbehandelte DiFi-Zellen wurden als Kontrolle mit einem mittleren Anteil von  $2,40 \pm 0,37$  positiver Zellen und einer mittleren Fluoreszenzintensität von  $11,42 \pm 0,44$  verwendet.

Die Unterschiede in der spezifischen Bindung von Cetuximab-modifizierten PLGA-Nanopartikeln gegenüber den unspezifischen IgG-Nanopartikeln fielen zum Teil sehr gering aus. Die unspezifischen Nanopartikel zeichneten sich ihrerseits durch eine erhöhte zelluläre Bindung aus. Diese konnte für beide untersuchten Zelllinien ermittelt werden.

### **Zeitabhängige spezifische Bindung**

Für die Bestimmung der zeitabhängigen spezifischen Bindung wurden die Zellen (HT29 und DiFi) für 0,5-24 h mit den zu untersuchenden Formulierungen (0,1 mg/ml) bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die zelluläre Bindung durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 52; Tab. 12). HT29-Zellen zeichneten sich hierbei durch eine erhöhte Bindung der zu testenden Formulierungen gegenüber DiFi-Zellen aus. Die Bindung betrug für beide Formulierungen nach 30 min Inkubation bereits über 65 % (PLGA-IgG:  $67,23 \pm 9,80$  %; PLGA-Cet:  $69,84 \pm 13,40$  %) und nahm stetig zu. Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den nanopartikulären Proben ermittelt werden. Die zelluläre Bindung fiel bei DiFi-Zellen deutlich geringer aus. Cetuximab-modifizierte Nanopartikel zeigten hierbei gegenüber den unspezifischen Kontrollpartikeln eine leicht gesteigerte Bindung, diese war jedoch nicht signifikant erhöht. Die maximale Bindung betrug nach 1 h Inkubation etwa 60 %. Mit Voranschreiten der Kultivierung nahm der Anteil an positiv detektierten Zellen für beide Formulierungen ab und betrug nach einer 24 h Inkubation letztendlich nur noch  $34,96 \pm 2,99$  % (PLGA-IgG) bzw.  $42,40 \pm 3,74$  % (PLGA-Cetuximab).



**Abb. 52: Zeitabhängige spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln.**

Schwach EGFR-exprimierende HT29-Zellen und stark EGFR-exprimierende DiFi-Zellen wurden mit unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen (0,1 mg/ml) für 0,5-24 h bei 37 °C inkubiert. Eine zelluläre Bindung konnte im Anschluss durchflusszytometrisch bestimmt werden. Dargestellt sind die Daten als Histogramm des korrespondierenden Fluoreszenzkanals (Fluoreszenz von Lumogen Yellow®).

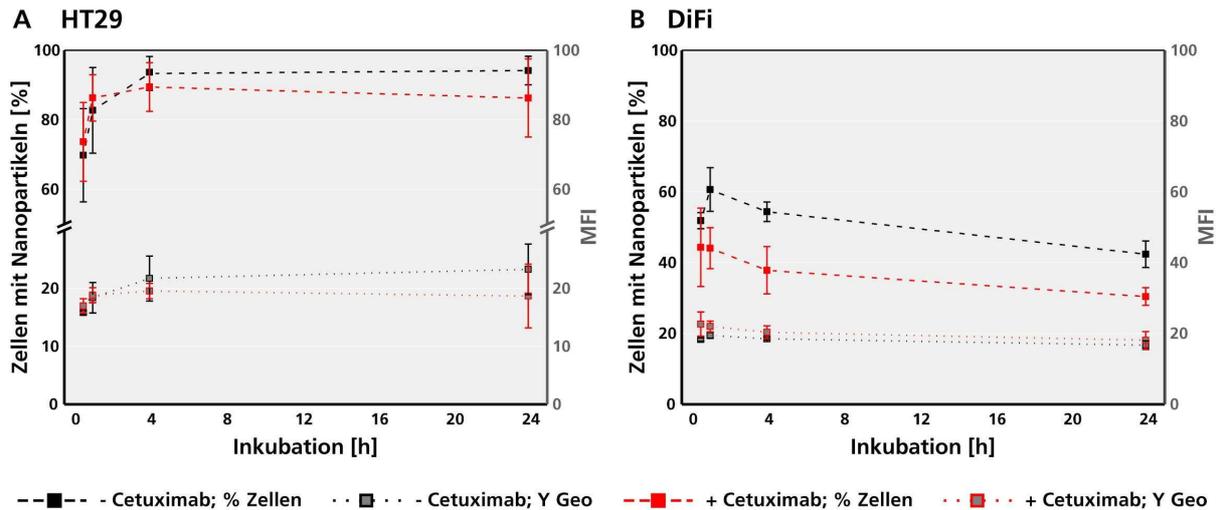
**Tab. 12: Zeitabhängige spezifische zelluläre Bindung von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln (n=3).**

	Inkubation [h]	PLGA-IgG		PLGA-Cetuximab	
		% positive Zellen	MFI	% positive Zellen	MFI
HT29	0,5	67,23 ± 9,80	15,57 ± 1,32	69,84 ± 13,40	15,81 ± 0,335
	1	85,81 ± 8,23	18,42 ± 1,58	82,76 ± 12,30	18,38 ± 2,63
	4	91,84 ± 6,71	19,82 ± 1,07	93,31 ± 4,88	21,70 ± 3,88
	24	90,31 ± 8,22	18,85 ± 1,84	94,18 ± 4,10	23,27 ± 4,35
DiFi	0,5	44,71 ± 4,66	17,04 ± 0,44	51,88 ± 2,28	18,29 ± 0,51
	1	48,89 ± 8,36	17,80 ± 1,28	60,66 ± 6,18	19,50 ± 0,81
	4	46,09 ± 5,00	16,91 ± 0,16	54,39 ± 2,72	18,48 ± 0,32
	24	34,96 ± 2,99	15,70 ± 0,29	42,40 ± 3,74	16,71 ± 1,19

Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle mit einem mittleren Anteil von 1,86 ± 0,17 % (HT29) / 1,78 ± 0,26 % (DiFi) positiver Zellen, und einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 7,15 ± 4,73 (HT29) / 12,08 ± 0,08 (DiFi).

### ***Hemmung der spezifischen Bindung***

Für die verwendeten Zelllinien konnte in den vorangegangenen Versuchen eine geringfügig verbesserte zelluläre Bindung über das Cetuximab-modifizierte System demonstriert werden. Diese war vor allem in den zugrunde liegenden MFI-Werten abzulesen. Um die Interaktion genauer bestimmen zu können, sollte auch hier der Einfluss von freiem Cetuximab auf die zelluläre Bindung evaluiert werden. Zur Erfassung einer eventuellen Hemmung der spezifischen Nanopartikel-Bindung (0,1 mg/ml PLGA-Cetuximab) wurden den jeweiligen Ansätzen 5 µg/ml freier Antikörper zugesetzt und die Bindung durchflusszytometrisch erfasst. HT29 zeichneten sich wiederum durch eine erhöhte zelluläre Bindung der Partikel aus (Abb. 53A). Die Zugabe des Antikörpers bedingte nur bei den längeren Inkubationen (4 und 24 h) eine geringe Reduktion der zellulären Bindung (4 h: ca. 4 %; 24 h: ca. 8 %). Die ermittelte mittlere Fluoreszenzintensität erfuhr in allen untersuchten Proben nur eine minimale Reduktion. Die spezifische Bindung an DiFi-Zellen konnte durch die Zugabe von Cetuximab zu allen Zeitpunkten reduziert werden (Abb. 53B). Die inhibierten Zellen wiesen einen ähnlich, jedoch verringerten Anteil an positiven Zellen auf. Die MFI verlief für alle untersuchten Proben auf einem annähernd hohen Niveau. Der freie Antikörper konnte somit die zelluläre Bindung bei hoch EGFR-exprimierenden DiFi-Zellen reduzieren. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Messungen waren jedoch nicht signifikant.

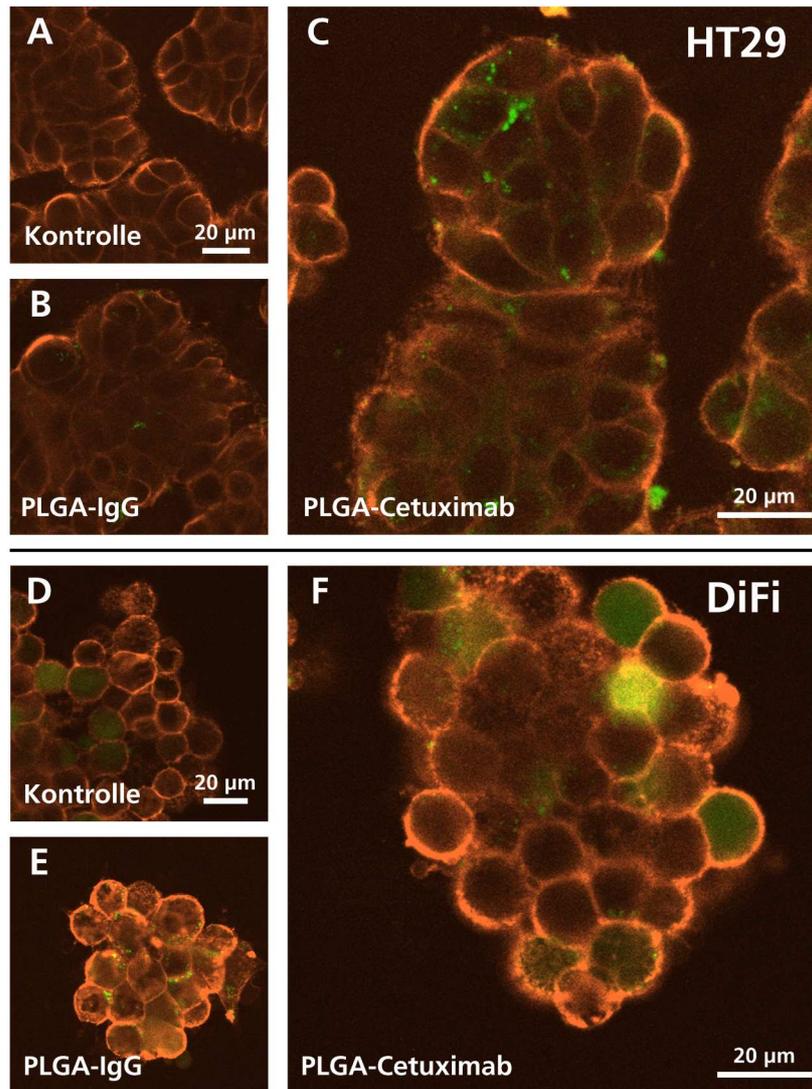


**Abb. 53: Spezifische zelluläre Bindung von Cetuximab-modifizierten PLGA-Nanopartikeln in der An- und Abwesenheit von freiem Cetuximab.**

Schwach EGFR-exprimierende HT29-Zellen (A) und stark EGFR-exprimierende DiFi-Zellen (B) wurden mit Cetuximab-modifizierten PLGA-Nanopartikeln (0,1 mg/ml) für 0,5-24 h bei 37 °C in der An- (+) und Abwesenheit (-) von freiem Cetuximab (5 µg/ml) inkubiert. Eine zelluläre Bindung konnte im Anschluss durchflusszytometrisch bestimmt werden. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Unbehandelte Zellen dienen zur Einstellung der Messungen.

### ***Intrazelluläre Akkumulation und subzelluläre Verteilung***

Zur Evaluierung der intrazellulären Akkumulation und subzellulären Verteilung der Formulierungen wurde eine CLSM-Analyse durchgeführt. Die Zellen (HT29 und DiFi) wurden für diesen Zweck mit den spezifischen zuzüglich den unspezifischen PLGA-Nanopartikeln (0,1 mg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert und analysiert (Abb. 54). Sowohl für HT29 (Abb. 54A-C) als auch für DiFi-Zellen (Abb. 54D-F) konnte eine intrazelluläre Akkumulation nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der Aufnahme zwischen spezifischen (Abb. 54C, F) und unspezifischen (Abb. 54B, E) Partikeln fielen für beide untersuchten Zelllinien gering aus. Sowohl die spezifischen als auch die unspezifischen PLGA-Nanopartikel konnten im Zellinnern nachgewiesen werden. Die Aufnahme von Nanopartikeln war bei HT29 im Vergleich mit DiFi-Zellen erhöht und bestätigte somit die zuvor erhaltenen Daten.



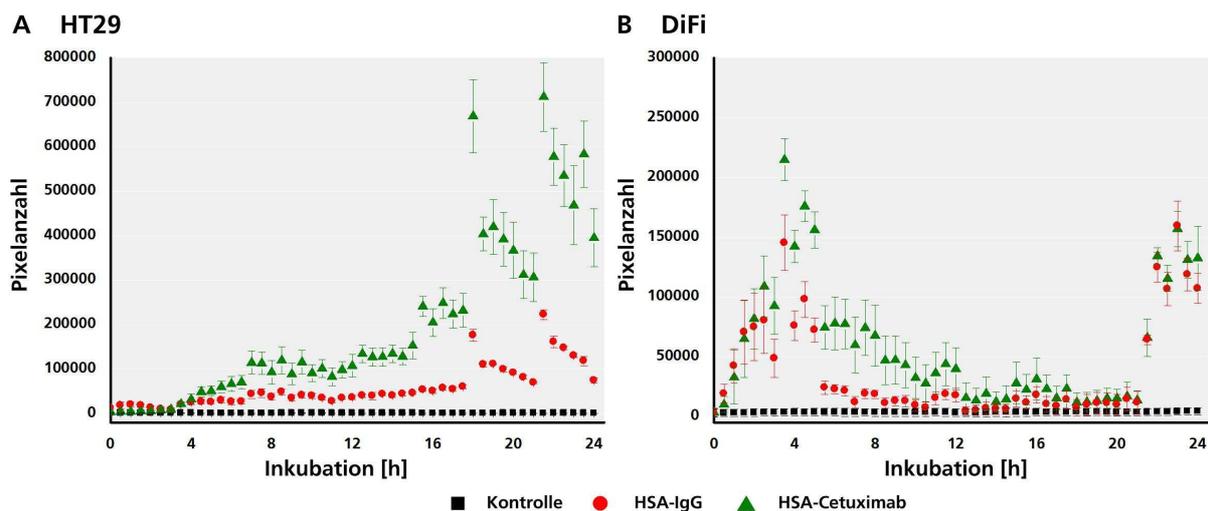
**Abb. 54: Untersuchung der zellulären Akkumulation von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.**

HT29- (A-C) und DiFi- (D-F) Zellen wurden auf Glasobjektträgern kultiviert und mit unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen (0,1 mg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Fluoreszenz des inkorporierten Lumogen Yellow® (H/K: 40) sowie eine Membranfärbung (Concanavalin A Alexa Fluor Tetramethylrhodamin, orange-H/K: 60) wurden zur Detektion verwendet. (A, D) unbehandelte Kontrollzellen; (B, E) mit PLGA-IgG-Nanopartikeln inkubierte Zellen; (C, F) mit PLGA-Cetuximab-Nanopartikeln inkubierte Zellen.

### ***Automatisierte Analyse der zeitabhängigen Anreicherung (Time-laps-Analyse)***

Zur Verifizierung der zuvor erhaltenen Ergebnisse wurden Time-Laps-Aufnahmen einer 24 h andauernden Inkubation mit oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln angefertigt. Die Zellen wurden, wie zuvor für HSA-Nanopartikel beschrieben, in spezielle Kammern überführt und mit den entsprechenden Formulierungen versetzt und analysiert. Die Auswertung ergab für die untersuchten Zelllinien ein differenziertes Ergebnis und es konnten Unterschiede in der zellulären Bindung beobachtet werden (Abb. 55). Hierbei wiesen HT29-Zellen wiederum die stärkste Interaktion mit Cetuximab-modifizierten Nanopartikeln auf (Abb. 55A). 4 h nach Versuchsbeginn konnten erste

Unterschiede zwischen spezifischen und unspezifischen Nanopartikeln detektiert werden. Ab einer Kultivierungsdauer von etwa 5 h zeichnete sich eine verstärkte Akkumulation der spezifischen Partikel ab, wogegen sich die Bindung der unspezifischen Formulierung nur in einem geringen Maße verstärkte. Die größten Sprünge und Unterschiede in dem detektierten Nanopartikelwert/Fluoreszenz ereigneten sich nach 18 h. Ab diesem Zeitpunkt erfuhren beide untersuchten Proben Schwankungen. Die Auswertung der Untersuchungen von DiFi-Zellen wies einen anfänglich ansteigenden Verlauf sowohl der Cetuximab- als auch IgG-modifizierten Nanopartikel auf (Abb. 55B). Die stärksten Fluoreszenzsignale (und somit Pixelwerte) wurden nach 4 h Inkubation ermittelt. Ab diesem Zeitpunkt fielen die Werte nicht nur für die spezifischen Nanopartikel, sondern auch für die unspezifische Formulierung. Bis einschließlich 12 h nach Beginn der Inkubation konnte ein geringfügig stärkere Bindung von PLGA-Cetuximab beobachtet werden, diese nahm jedoch ab, bis ab > 21 h wieder ein Anstieg beider Fluoreszenzen ermittelt werden konnte.



**Abb. 55: Automatische Bildgebung der zeitabhängigen Anreicherung von spezifischen PLGA-Nanopartikeln (BioStation M).**

HT29- und DiFi-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlich oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln (0,1 mg/ml; PLGA-Cetuximab: Cetuximab-modifizierter PLGA-Nanopartikel; PLGA-IgG: IgG-modifizierter PLGA-Nanopartikel) bei 37 °C inkubiert. Alle 30 min wurde von den Zellen eine Phasenkontrast- als auch eine Fluoreszenz-Aufnahme (grüner Kanal; Verwendung der Lumogen Yellow® Fluoreszenz) angefertigt. Die Fluoreszenzintensität wurde ermittelt und als Pixelnummer gegen die jeweilige Inkubationsdauer aufgetragen. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von vier Meßpunkten dar.

Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse für Nanopartikel auf Basis von HSA als auch PLGA bekräftigte die Spezifität der synthetisierten HSA-Nanopartikel. Diese wurden in Abhängigkeit der EGFR-Expression verstärkt in die Zellen aufgenommen und eignen sich als spezifische Arzneistoffträgersysteme. PLGA-Nanopartikel reicherten sich nur zu einem gewissen Anteil spezifisch über den kovalent gebundenem Antikörper in den Zellen an. Die unspezifische Anreicherung von PLGA-Nanopartikeln war stets vorhanden.

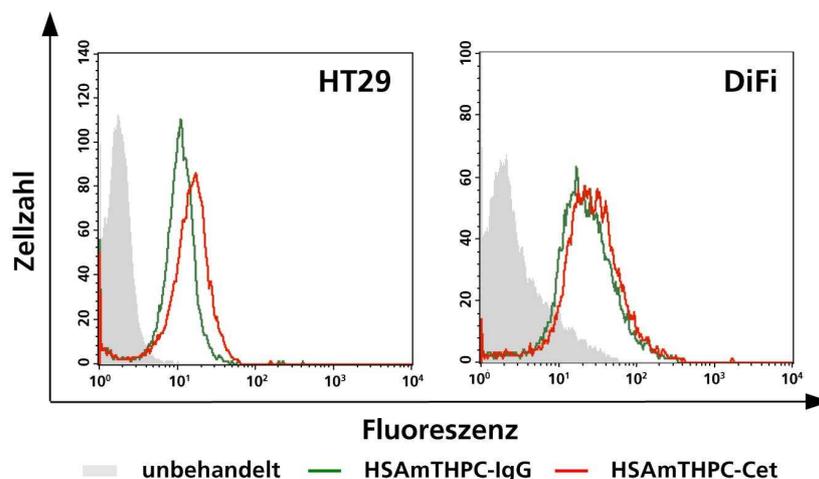
Aus diesem Grund wurde mit dem sehr spezifischen HSA-basierten System weitergearbeitet.

### 3.8 Cetuximab-modifizierte und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel

Schließlich wurden HSA-Nanopartikel untersucht, die zum einen mit dem spezifischen Antikörper Cetuximab, als auch mit dem Photosensibilisator mTHPC modifiziert waren. Die Nanopartikel wurden im Folgenden auf ihre Wirksamkeit an HT29- und DiFi-Zellen untersucht.

#### 3.8.1 Zelluläre Bindung

Für die Analyse der spezifischen Bindung wurden die Zellen mit den spezifischen und unspezifischen Formulierungen (eingesetzte mTHPC-Konzentration: 1 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Bindung des Photosensibilisators durchflusszytometrisch evaluiert (Abb. 56). Beide untersuchten Zelllinien zeigten hierbei eine verstärkte Anreicherung des transportierten mTHPC. Die Anreicherung über das Cetuximab-modifizierte System fiel in beiden Fällen gegenüber dem unspezifischen System geringfügig verstärkt aus.



**Abb. 56: Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Bindung von oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln.**

Zur Bestimmung der zellulären Bindung von nanopartikulär-gebundenem mTHPC (Cetuximab bzw. IgG-modifizierte HSA-Nanopartikel) wurden HT29- und DiFi-Zellen den zu untersuchenden Formulierungen (1 µg/ml eingesetzte Phs-Konzentration) für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Dargestellt sind die Daten als Histogramme des FL3-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich des Photosensibilisators; ein Experiment aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen).

Die Auswertung der dazugehörigen Histogrammdaten konnte eine erhöhte Anreicherung der Cetuximab-modifizierten Albuminpartikel bestätigen (Tab. 13). Diese fiel für HT29 jedoch nicht sehr deutlich aus, da hier der Anteil an positiven Zellen besonders groß für die unspezifischen Nanopartikel ausfiel. Jedoch war bei den

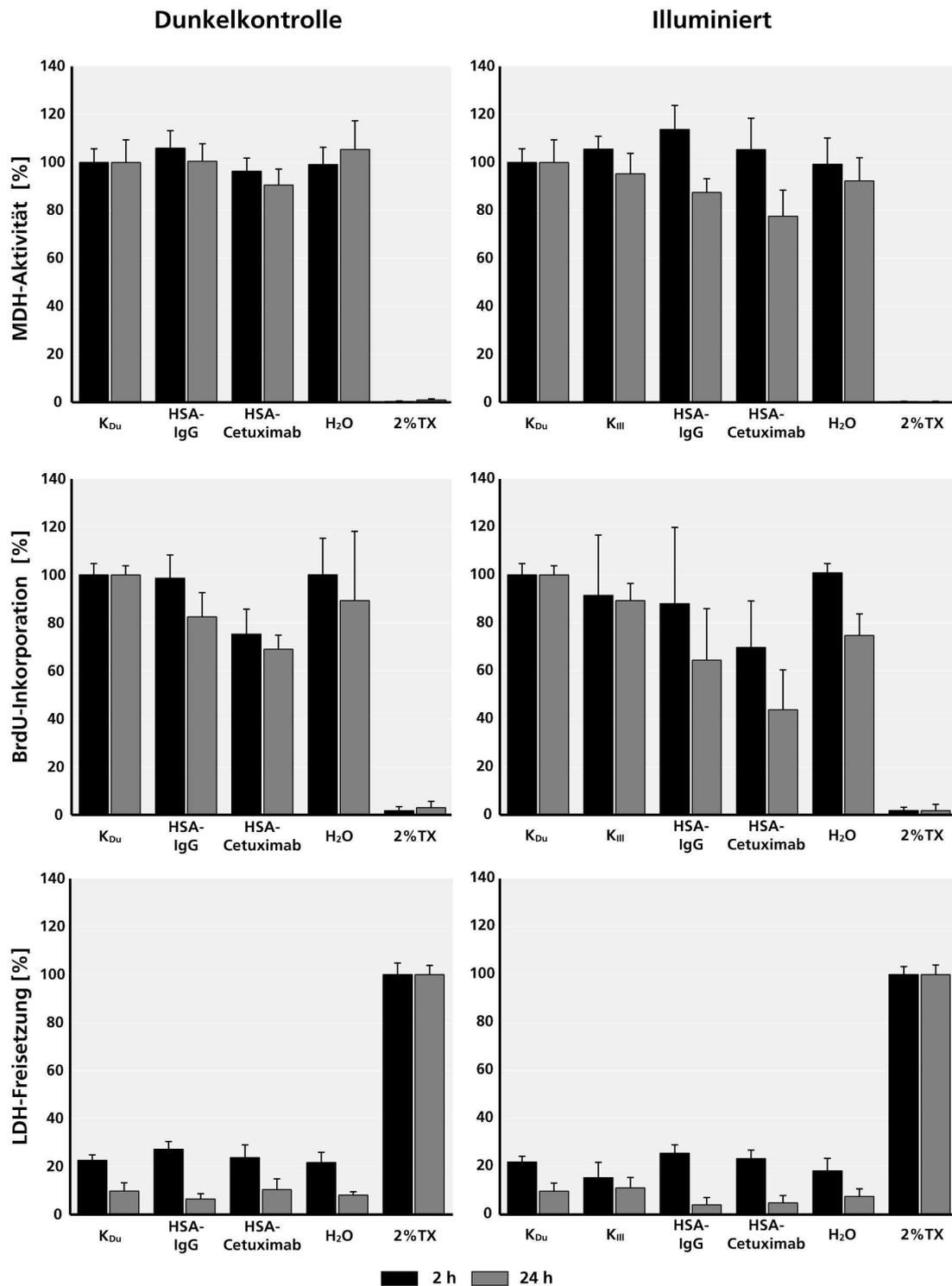
spezifischen HSA-Partikeln der ermittelte MFI-Wert größer als bei dem unspezifischen System (MFI HSA-IgG:  $9,99 \pm 0,68$ ; MFI HSA-Cet:  $12,13 \pm 2,70$ ). Für DiFi-Zellen konnten sowohl in der Anzahl an positiv ermittelten Zellen als auch im korrespondierenden MFI eine erhöhte Bindung der spezifischen HSA-Partikel ermittelt werden. Die Unterschiede betragen jedoch nur wenige Prozent. Somit konnten die bereits beschriebenen Daten verifiziert werden.

**Tab. 13: Bestimmung der spezifischen zellulären Anreicherung von mTHPC über oberflächenmodifizierte mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel (n=3).**

	HT29		DiFi	
	% positive Zellen	MFI	% positive Zellen	MFI
<b>Unbehandelt</b>	$1,90 \pm 0,23$	$5,17 \pm 0,91$	$6,54 \pm 2,01$	$15,72 \pm 0,56$
<b>HSAmTHPC-IgG</b>	$93,05 \pm 8,66$	$9,99 \pm 0,68$	$77,61 \pm 9,96$	$19,94 \pm 2,37$
<b>HSAmTHPC-Cet</b>	$91,35 \pm 11,27$	$12,13 \pm 2,70$	$81,21 \pm 11,66$	$21,78 \pm 3,75$

### 3.8.2 Bestimmung der Photozytotoxizität

Obwohl nur geringfügige Unterschiede in der Bindung des Photosensibilisators über das spezifische System ermittelt werden konnte, wurde die induzierte Photozytotoxizität der entwickelten Formulierungen untersucht. Die Zellen wurde hierbei mit den Formulierungen (eingesetzte mTHPC-Konzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) für 2 und 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und im Anschluss beleuchtet ( $652 \text{ nm}$ ;  $5 \text{ J/cm}^2$ ) bzw. als Dunkelkontrolle verwahrt. Im Anschluss wurde die MDH-Aktivität (WST-1-Assay), die BrdU-Inkorporation (BrdU-Assay) sowie die LDH-Freisetzung (LDH-Assay) untersucht. Die Untersuchung von HT29-Zellen (Abb. 57) dokumentierte eine gleichbleibende MDH-Aktivität der Dunkelkontrolle für alle untersuchten Proben und Inkubationen. Nach der Belichtung und somit der Aktivierung von mTHPC erfolgte eine Verminderung der ermittelten Aktivität, insbesondere bei HSAmTHPC-Cetuximab (24 h: 78 %) inkubierten Zellen. Eine 2 h andauernde Inkubation (inkl. Belichtung) hatte keinen Einfluss auf die gemessene MDH-Aktivität. Die ermittelte BrdU-Inkorporation und somit die Zellproliferation ergab eine Reduktion der Proliferation in Folge einer 2 und 24 h HSAmTHPC-Cetuximab Inkubation, jedoch ohne vorherige Bestrahlung. Die weiteren Proben verhielten sich im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen unauffällig. Eine weitere Reduktion im Nachweis von inkorporierten BrdU erfolgte im Anschluss an die Bestrahlung. Hierbei nahm die Proliferation von HSAmTHPC-Cetuximab inkubierten Zellen bis auf 48 % ab (24 h). Eine weitere Reduktion konnte auch bei HSAmTHPC-IgG in Folge einer 24 h Inkubation (65 %) festgestellt werden. Zuletzt wurde die Membranintegrität vor und nach einer Bestrahlung untersucht.



**Abb. 57: Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität von oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in HT29-Zellen.**

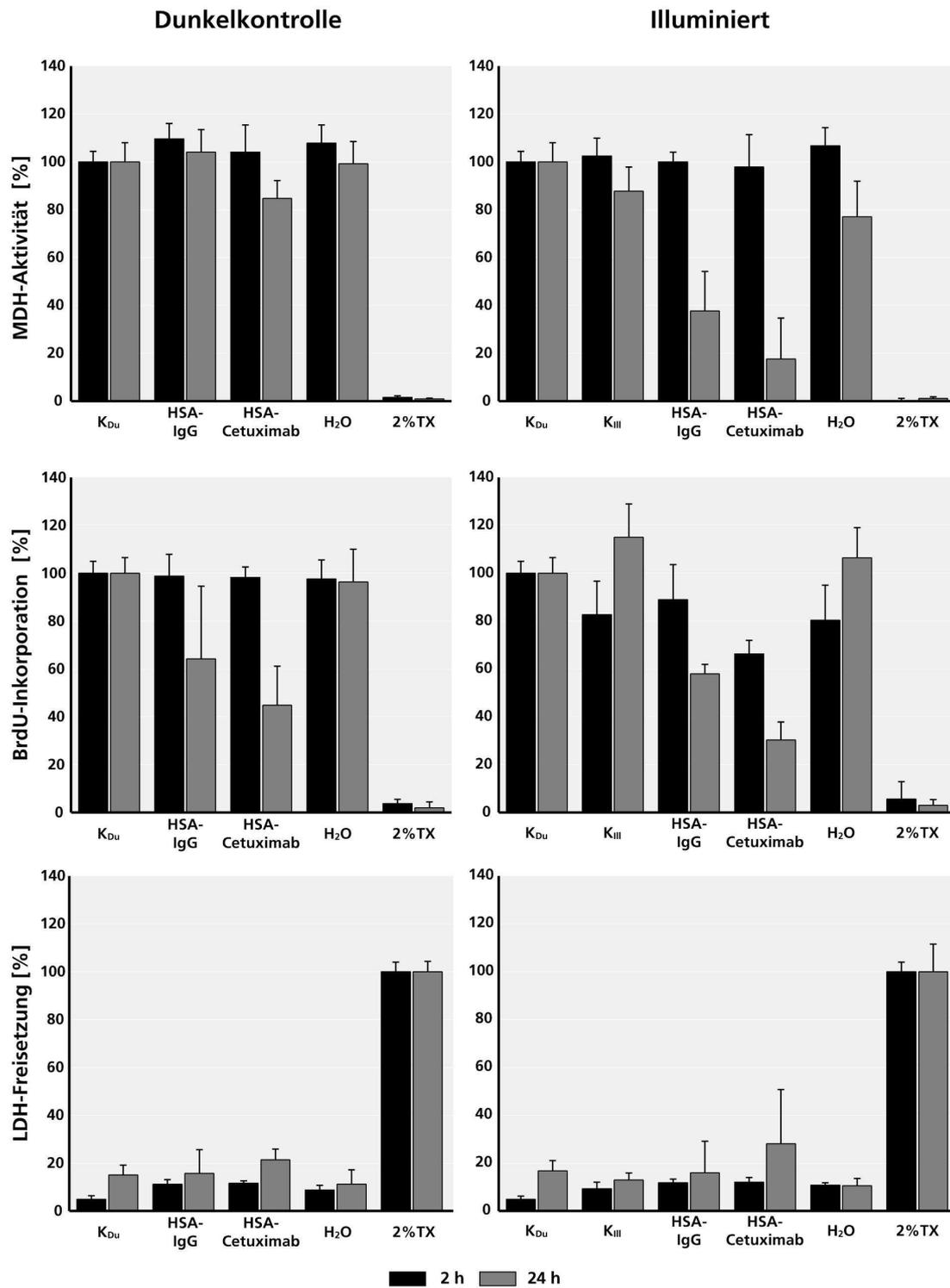
HT29-Zellen wurden mit freiem sowie nanopartikulär-gebundenem mTHPC (entsprechend einer mTHPC-Konzentration von 1 µg/ml) für 2 und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und die Zellviabilität (WST-1-Assay), die Zellproliferation (BrdU-Assay) sowie die Membranintegrität (LDH-Assay) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte (Dunkelkontrolle: K<sub>Du</sub>; illuminiert: K<sub>Ill</sub>), Lösungsmittel-behandelte (H<sub>2</sub>O) sowie 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

Es konnten keine Unterschiede zwischen der Dunkelkontrolle und den illuminierten Proben gemessen werden. In beiden Fällen lagen die ermittelten 2 h-Inkubationswerte über denen der 24 h-Werte. Zusammenfassend induzierten Cetuximab-modifizierte HSAmTHPC-Nanopartikel etwas stärkere Effekte in HT29-Zellen nach Bestrahlung als die vergleichbaren Kontrollpartikel (HSAmTHPC-IgG).

Neben HT29-Zellen wurden ebenfalls DiFi-Zellen hinsichtlich einer induzierten Photozytotoxizität untersucht (Abb. 58). Diese zeichneten sich durch verstärkte Reaktionen gegenüber HT29 aus. Die zuerst untersuchte MDH-Aktivität verblieb für alle untersuchten Proben der Dunkelkontrolle auf einem relativ konstanten Niveau. Nach Belichtung erfolgte die Reduktion der ermittelten Werte bei HSAmTHPC-IgG (38 %) und –Cetuximab (17 %), allerdings nur in Folge einer 24 h Dauerkultivierung. Eine 2 h anhaltende Exposition hatte keinen Einfluss auf die MDH-Aktivität. Die Proliferation von DiFi-Zellen konnte durch die alleinige Zugabe (24 h, Dunkelkontrolle) der zu testenden Substanzen auf 44 % (HSAmTHPC-Cetuximab) bzw. 64 % (HSAmTHPC-IgG) reduziert werden. Eine kürzere Inkubation (2 h) hatte keinerlei Effekt auf die Zellen.

Nach der Beleuchtung erfuhren die Nanopartikel-behandelten Zellen einen weiteren Rückgang der Zellproliferation. HSAmTHPC-IgG Nanopartikel bedingten nach einer 2 h andauernden Inkubation einen ersten Rückgang (2 h: 89 %) der Proliferation. Dieser setzte sich nach 24 h Inkubation weiter fort (24 h: 58 %). Zellen, die mit der spezifischen Formulierung (HSAmTHPC-Cet) inkubiert wurden, zeigten eine weitere Reduktion der Proliferation. Diese fiel nach einer 2 h Inkubation von 98 % (Dunkelkontrolle) auf 66 % (Illuminiert). Nach einer 24 h andauernden Inkubation und Belichtung konnten noch 30 % lebende Zellen detektiert werden. Eine Membranschädigung in Folge einer Inkubation (2 und 24 h) mit modifizierten und beladenen HSA-Nanopartikeln konnte nicht ermittelt werden. Die Bestrahlung bedingte einen Anstieg der LDH-Freisetzung nach einer Inkubation mit HSAmTHPC-Cetuximab (24 h: 38 %). Jedoch wies diese Probe auch eine erhöhte Standardabweichung auf. Die Kontrollen verhielten sich für die untersuchten Proben unauffällig. Allerdings wies die Wasserkontrolle nach Belichtung sowohl in der ermittelten MDH-Aktivität (24 h: 77 %) als auch in der gemessenen Proliferation (2 h: 80 %) reduzierte Werte auf.

Zusammenfassend bewirkten Cetuximab-modifizierte HSAmTHPC-Nanopartikel in DiFi-Zellen nach einer Bestrahlung stärkere Effekte als die vergleichbaren Kontrollpartikel (HSAmTHPC-IgG). Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in den Proben ermittelt werden.



**Abb. 58: Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität von oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in DiFi-Zellen.**

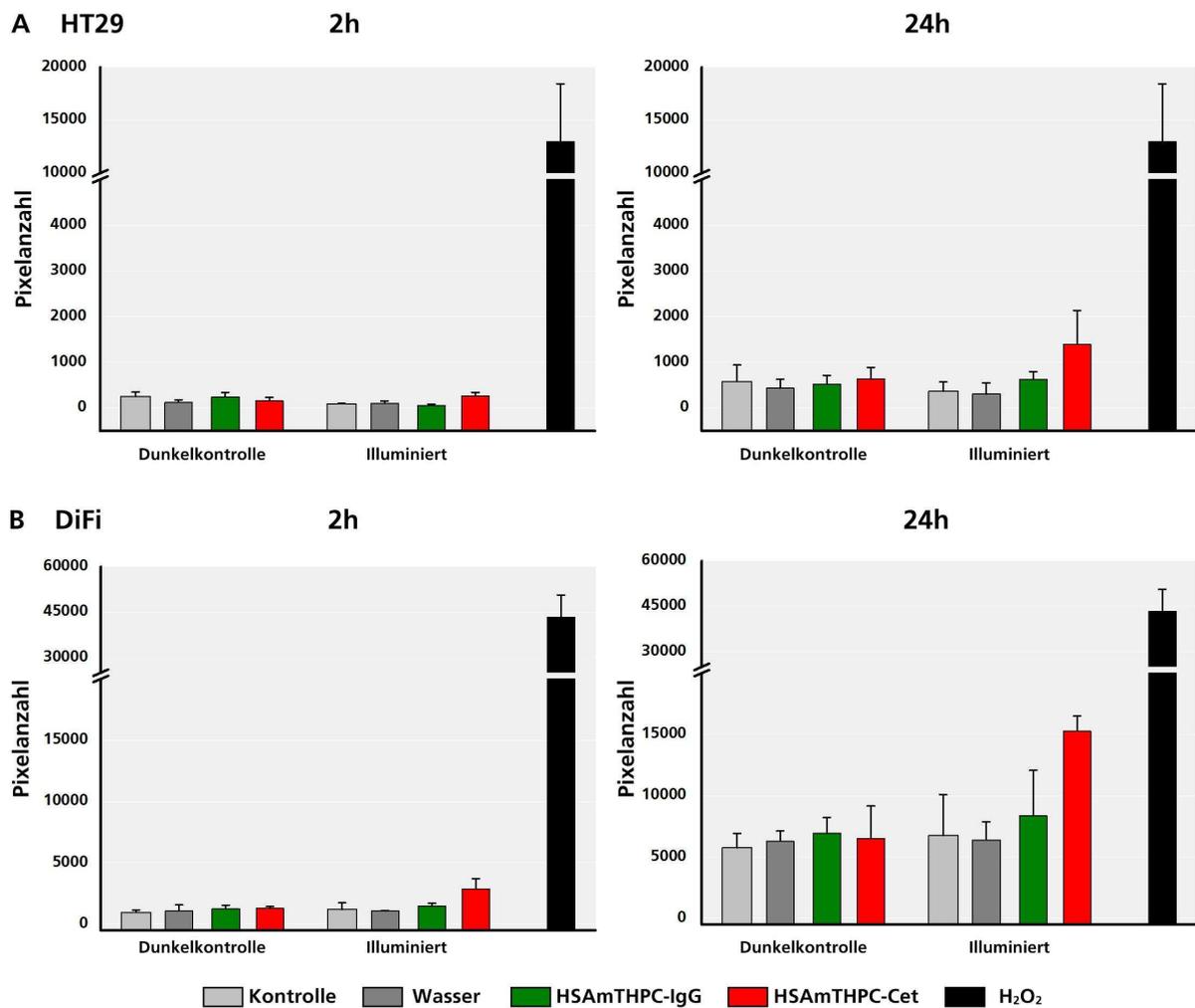
DiFi-Zellen wurden mit freiem sowie nanopartikulär-gebundenem mTHPC (entsprechend einer mTHPC-Konzentration von 1 µg/ml) für 2 und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und die Zellviabilität (WST-1-Assay), die Zellproliferation (BrdU-Assay) sowie die Membranintegrität (LDH-Assay) ermittelt. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Als Kontrollen wurden unbehandelte (Dunkelkontrolle: K<sub>Du</sub>; illuminiert: K<sub>Ill</sub>), Lösungsmittel-behandelte (H<sub>2</sub>O) sowie 2 % Triton X-100 (2 %TX) behandelte Zellen mituntersucht.

Zuletzt wurde die Induktion von apoptotischen Ereignissen mittels des APOPercentage Apoptose Assay vor und nach Bestrahlung bestimmt. Die Inkubation der Proben erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Zytotoxizitätsstudien. Die Auswertung ergab eine erhöhte Apoptoseinduktion in DiFi-Zellen gegenüber HT29 (Abb. 59). In allen untersuchten Proben blieben die Dunkelkontrollen unauffällig. Weder nach einer 2 h andauernden Inkubation noch nach einer Dauerexposition (24 h) mit den zu untersuchenden Substanzen konnte ein Anstieg an apoptotischen Zellen ermittelt werden. Daneben fiel ein Unterschied in der Intensität bzw. Pixelnummer zwischen 2 und 24 h auf. Die 24 h Pixelwerte lagen vor allem bei der Zelllinie DiFi deutlich über den 2 h Werten (Abb. 59B). Bei HT29-Zellen lagen die Werte ebenfalls, wenn auch nur leicht, erhöht vor (Abb. 59A). Nach Beleuchtung nahm die Pixelanzahl für die mTHPC-behandelten Proben zu. HT29-Zellen wiesen eine erhöhte Induktion nach Inkubation mit den spezifischen Nanopartikeln (HSA<sub>m</sub>THPC-Cet) auf. Nach 2 h Inkubation konnte ein Unterschied in der Aufnahme der Reagenz zwischen den unspezifischen (HSA<sub>m</sub>THPC-IgG: 57) und den spezifischen (HSA<sub>m</sub>THPC-Cet: 267) Proben ermittelt werden. Dieser nahm nach 24 h Inkubation weiter zu und betrug für die Kontrollpartikel 626 sowie 1395 für die spezifischen Albuminpartikel.

DiFi-Zellen wiesen bereits nach einer 2 h Inkubation eine gesteigerte Apoptoserate in einer Probe (2875) auf (Abb. 59B). Es handelte sich hierbei um die Probe, welche mit den spezifisch-modifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln inkubiert worden war. Die Kontrollpartikel bedingten keinen Anstieg. Mit ansteigender Inkubationszeit (24 h) nahm der Anteil an apoptotischen Zellen zu. Die Inkubation mit IgG-modifizierten HSA-Nanopartikel bedingte nach der Beleuchtung eine leicht erhöhte Apoptoseinduktion (8358) in Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Inkubation mit der spezifischen Formulierung bedingte eine weitere Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen (24 h: 15272).

Die Induktion von apoptotischen Ereignissen konnte also durch die Zugabe von Cetuximab-modifizierten HSA<sub>m</sub>THPC-Nanopartikeln gegenüber unspezifischen Kontrollpartikeln (HSA<sub>m</sub>THPC-IgG) gesteigert werden.

Die Unterschiede in den Formulierungen waren zwar nicht signifikant, es konnte aber ein Trend aus den erhaltenen Ergebnissen abgelesen werden. Diese wies auf eine spezifische Wirksamkeit der oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikel hin.



**Abb. 59: Quantifizierung der Apoptoseinduktion durch oberflächenmodifizierte und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel mittels APOPercentage Apoptosis Assay und Pixelwertbestimmung.**

Zum Nachweis einer Apoptoseinduktion sind HT29- (A) und DiFi- (B) Zellen mit 1 µg/ml freiem mTHPC, sowie mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln (IgG- und Cetuximab-modifiziert; 1 µg/ml mTHPC-Konzentration) für 2 und 24 h inkubiert. Ein Teil der Platten wurde illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und anschließend für 30 min mit der APOPercentage Reagenz behandelt. Helfeldaufnahmen von den Zellen vor und nach einer PDT-Behandlung wurden aufgenommen und der Anteil an inkorporierten APOPercentage Reagenz (Pixelanzahl) bestimmt. Unbehandelte Zellen dienen als Negativkontrolle und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte Zellen (2,5 mM) als Positivkontrolle. Jeder Messwert stellt den jeweiligen Mittelwert ± Standardabweichung (SD) von drei Experimenten dar.

## 4 Diskussion

Die Verwendung von Nanopartikeln als Arzneistoffträgersysteme hat in den letzten Jahrzehnten mehr und mehr an Bedeutung gewonnen <sup>(62, 156-158)</sup>. Heutzutage existiert eine Vielzahl an bereits zugelassenen Produkten und kurz vor der Zulassung stehende Formulierungen. Ein Hauptaugenmerk in der Verwendung kolloidaler Systeme liegt unter anderem in der Reduktion von unerwünschten Arzneistoffwirkungen begründet. Eine Vielzahl von Arzneistoffen ist durch Nebenwirkungen gekennzeichnet, da sie sich zum einen unvorteilhaft im Körper verteilen, zum anderen ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften besitzen. Die Verwendung von Nanopartikeln kann helfen dies zu umgehen. Somit kann zum einen die Applikation vereinfacht und der Patient geschont werden. Zum anderen können anfallende Folgekosten in Millionenhöhe reduziert werden.

Drei Partikelsysteme zum Transport des Photosensibilisators mTHPC wurden synthetisiert und *in vitro* hinsichtlich des Wirkstofftransports, ihrer Freisetzung und Wirksamkeit charakterisiert. Es handelte sich neben Gold-Nanopartikeln (AuNP), um Systeme, die auf humanen Serumalbumin (HSA) und Polymilch-co-glykolsäure (PLGA) basieren. Schließlich wurde ausgehend aus dem erhaltenen Datensatz eine Formulierung, die sowohl den Antikörper als auch den Photosensibilisator trug (Vollpräparation), zum Zelltyp-spezifischen Transport untersucht und dessen Effektivität bestimmt.

### 4.1 Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel

Zu Beginn der Arbeit wurden die synthetisierten Nanopartikel (unbeladen, mTHPC-beladen als auch oberflächenmodifiziert) im Hinblick auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht. Daneben wurden die unbeladenen Grundformulierungen in Bezug auf eine eventuelle Zytotoxizität, ihre zelluläre Bindung und subzelluläre Akkumulation untersucht.

Gold-Nanopartikel wurden hierbei in Anlehnung an Frens und Turkevich <sup>(142, 143)</sup> synthetisiert und über eine modifizierte Layer-by-Layer-Technik <sup>(144, 145)</sup> mit Polyelektrolyd (PE)-Schichten modifiziert. Als äußere Hülle und somit abschließende Schicht wiesen die Partikel das negativ geladene Polystyrolsulfonat (PSS) auf. Das resultierende Zetapotential war dementsprechend negativ und die Größe der entwickelten AuNP betrug ca. 14 nm. Die Inkorporierung des Arzneistoffs mTHPC erfolgte über eine adaptierte Layer-by-Layer-Technik <sup>(146)</sup>. Hierbei wurde mTHPC an PSS gebundenen und als weiterer Layer auf bereits Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH, positiv geladen) modifizierte AuNP geschichtet. Die resultierenden Nanopartikel wiesen demzufolge eine mTHPC-Schicht zwischen den verwendeten PE-Layern auf. Abschließend wurde mit freiem PSS als äußere Hülle gearbeitet. Die so entstandenen mTHPC-beladenen AuNP

wiesen eine Größe von 14 nm und ein weiterhin negatives Zetapotential auf. Das Lösen der Nanopartikel in Zellkulturmedium, das fötales Kälberserum enthielt, schlug sich in einer Erhöhung des Zetapotentials (von -41 mV auf -10 mV) nieder. Diese Erhöhung kann auf die Anlagerung von Proteinen an die Partikeloberfläche zurückgeführt werden<sup>(159)</sup>.

Die Synthese von auf HSA basierenden Nanopartikel erfolgte gemäß einer gut beschriebenen Desolvationstechnik<sup>(147-149)</sup>. Im Anschluss an die Synthese erfolgte die Beladung und/oder Modifizierung der Nanopartikel mit dem zu transportierenden Photosensibilisator mTHPC sowie dem spezifischen Antikörper Cetuximab. Die kovalente Anbindung von mTHPC an HSA-Nanopartikel erfolgte hierbei über den bekannten Crosslinker 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid (EDC), der eine Bindung zwischen Amino- und Carboxylgruppen vermittelt<sup>(160)</sup>. Der monoklonale Antikörper Cetuximab sowie eine unspezifische IgG-Kontrolle wurden entsprechend eines für Trastuzumab etablierten Protokolls<sup>(150)</sup> an die Oberfläche konjugiert. Hierbei wurde der zuvor thiolierte Antikörper über einen heterobifunktionalen Crosslinker (NHS-PEG5000-Mal) an die Aminogruppen der Partikeloberfläche gebunden. Die synthetisierten und unterschiedlich modifizierten Albuminpartikel wiesen eine Größe zwischen 220 und 270 nm und einen Polydispersitätsindex kleiner 0,1 auf. Eine weitere Modifizierung mit Fluorochromen für eine spätere Detektion konnte vernachlässigt werden, da die Albuminpartikel im grünen Wellenlängenbereich eine entsprechende Autofluoreszenz aufwiesen<sup>(147)</sup>.

Über die Emulsions-Diffusions-Evaporations-Technik<sup>(78, 151)</sup> konnten sowohl unbeladene als auch mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel entwickelt werden. Ferner war eine zusätzliche Inkorporierung des Farbstoff Lumogen Yellow® in die Partikelmatrix möglich. Die Anbindung von Antikörpern, ob spezifisch oder unspezifisch, an die Partikeloberfläche erfolgte im Anschluss an die Einführung von Carboxylgruppen (über EDC-Reaktion) und wurde analog zu HSA-Nanopartikeln durchgeführt. Die entwickelten Partikel wiesen mit einer mittleren Größe von 260 bis 285 nm die größten Abmessungen auf. Die Polydispersität lag bei diesem System und allen Modifizierungen unter 0,1.

Die Untersuchung ergab in allen synthetisierten Formulierungen eine monodisperse Größenverteilung, welche sich in einer Polydispersität kleiner 0,1 niederschlug<sup>(31)</sup>. Ferner wurde die Größe der Nanopartikel, die mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sowie Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ermittelt wurde, kleiner 300 nm bestimmt. Die Partikel wiesen somit eine Größe auf, die ein passives Drug Targeting über den sogenannten EPR (*enhanced permeability and retention*)-Effekt ermöglichen<sup>(25-27)</sup>. Aufgrund der rasanten Hypervaskularisierung während der Angiogenese weisen Tumore ein verändertes vaskuläres System auf. Dieses ist zum einen durch eine

gesteigerte Fenestrierung und zum anderen durch eine mangelnde Lymphdrainage gekennzeichnet<sup>(29, 31)</sup>. Die resultierenden Poren innerhalb der Gefäße verfügen über eine Größe zwischen 200 und 600 nm und ermöglichen die Infiltration von Makromolekülen wie Proteinen, Polymeren und Nanopartikel in den Tumor und die intratumoralen Zwischenräume. Dort werden sie durch die vorliegenden Umgebungseigenschaften zurückgehalten und akkumulieren. Die synthetisierten Nanopartikel verfügten demnach über ausreichende physikochemische Eigenschaften und konnten im Anschluss den *in vitro* Untersuchungen unterzogen werden.

Zunächst wurde die zelluläre Verträglichkeit (Zytotoxizität) der kolloidalen Systeme untersucht, um eine Aussage treffen zu können, welche Auswirkungen die Nanopartikel auf Zellen haben, und um später die Wirksamkeit der entwickelten Formulierungen besser beurteilen zu können. Die Bestimmung einer Nanotoxizität ist in Hinblick auf eine spätere Applikation von essentieller Bedeutung. Heute ist eine Vielzahl an Arbeitsgruppen mit der Untersuchung einer durch Nanopartikel induzierten Toxizität beschäftigt<sup>(62, 161-163)</sup>. Daher wurden die Nanopartikel anfänglich einer genauen Untersuchung unterzogen. Hierzu wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Formulierungen bis zu 72 h inkubiert und im Anschluss auf verschiedene Parameter hin untersucht. Hierbei wurden Gold-Nanopartikel einer besonders intensiven Untersuchung unterzogen. Die Untersuchungen nach einer Langzeitinkubation sowie die Analyse von Folgeerscheinungen nach einer AuNP-Inkubation belegten den nicht-toxischen Charakter der synthetisierten AuNP. Die Ergebnisse in Bezug auf Zellviabilität und Membranintegrität stimmten mit vorangehenden Ergebnissen überein, in denen die Verträglichkeit von PSS modifizierten AuNP untersucht und belegt werden konnte<sup>(74)</sup>. Leonov und Kollegen konnten hierbei die detoxifizierende Wirkung von PSS demonstrieren, indem eine toxische Wirkung von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) durch eine Beschichtung mit PSS negiert werden konnte. Kurzzeitinkubationen induzierten keinerlei Änderungen in den Zellen, wohingegen längere Inkubationen einen gewissen Einfluss auf die zelluläre Proliferation ausübten, der sich in einer Reduktion der Proliferation niederschlug. Eine mögliche Erklärung könnte in der Arbeit von Li et al. gefunden werden<sup>(164)</sup>. Diese untersuchten den Einfluss von FKS-stabilisierten AuNP (20 nm) auf die Proliferation von humanen Lungenfibroblasten und berichteten über eine Herunter-Regulierung von Zellzyklusproteinen sowie einer Schädigung von DNA-Reparatur und Genomstabilität assoziierter Gene nach einer 72 h andauernden AuNP-Exposition. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten AuNP auch Einfluss auf die besagten Gene hatten. Dies müsste aber in weiteren Studien genau untersucht werden, bevor eine Aussage getroffen werden kann.

Albuminpartikel übten auf die Zellen keinerlei toxischen Effekt aus. In zurückliegenden Arbeiten konnte die Biokompatibilität sowie die Biodegradierbarkeit hervorgehoben

werden <sup>(75)</sup>. Die gewonnenen Ergebnisse bestätigten dies und die Untersuchungen konnten weiter fortgesetzt werden.

Die Untersuchung von PLGA-Nanopartikeln implizierte eine gewisse erklärbare und somit akzeptable Toxizität der Partikel in Folge von Langzeitinkubationen (> 48 h). Eine Ursache könnte in der passiven Hydrolyse oder dem enzymatischen Verdau der PLGA-Partikel zu Milch- und Glykolsäure liegen <sup>(165)</sup>. Die entstehenden Abbauprodukte würden anfänglich eine pH-Wert-Erniedrigung hervorrufen, bevor sie gänzlich über den Citratzyklus zu CO<sub>2</sub> bzw. durch Enzyme zu Glycin metabolisiert werden. Da es sich bei den Abbauprodukten um zelluläre Komponenten handelt, die durch die Zelle abgebaut werden können, können die induzierten Effekte als Randerscheinungen betrachtet und die Partikel weiter untersucht werden.

Nachdem die zelluläre Akzeptanz für die unterschiedlichen Formulierungen demonstriert werden konnte, erfolgte die Überprüfung der zellulären Bindung. Aufgrund der vorliegenden Fluoreszenz für die polymerbasierten Partikel (Autofluoreszenz bei HSA, Lumogen Yellow® Inkorporation in PLGA-Matrix) konnten fluoreszenzabhängige Analysemethoden zur Quantifizierung der nanopartikulären Bindung herangezogen werden. Die Untersuchungen ergaben eine Bindung beider Formulierungen an HT29-Zellen, die sich im weiteren Verlauf als intrazelluläre Akkumulation genauer bestimmen ließ. Die Akkumulation von PLGA-Partikeln fiel gegenüber Albuminpartikeln um ein Vielfaches verstärkt aus. Die zelluläre Akkumulation von HSA- und PLGA-Nanopartikeln in Tumorzellen konnte bestätigt werden. Sie korrelierte mit früheren Arbeiten <sup>(75, 166)</sup>.

Da AuNP weder ein inkorporiertes Fluorochrom noch eine Autofluoreszenz innehatten, mussten andere Methoden zur Untersuchung der zellulären Bindung herangezogen werden. Es handelte sich neben Hellfeld- und Rasterelektronenmikroskopie (REM) um Multiphotonen-basierte Raster-Lastermikroskopie (MP-LSM). Hellfelduntersuchungen ergaben eine clusterförmige Anreicherung der Nanopartikel (Rotfärbung) an den Zellen. Eine Agglomeration konnte ausgeschlossen werden, da dies zu einem Farbumschlag der Partikel ins Schwarze geführt hätte. Da mittels dieser Methode jedoch keine Aussage über die genaue Position getroffen werden konnte, erfolgten REM-Analysen. Aufgrund der hohen Elektronenanzahl im Goldatom war diese Untersuchung möglich. Die Detektion von Sekundärelektronen (SE) gab hierbei Aufschluss über die Morphologie der Zelle, da diese oberflächennah generiert werden. Auf den untersuchten Zellen konnten hellere Bereiche abgebildet werden, bei denen es sich wohlmöglich um eine Ansammlung von AuNP handelte. Eine weitere Kontrastierung der Proben konnte durch die Detektion von Rückstreuelektronen (RE) erfolgen. Ein Großteil der erzeugten REs weist annähernd die Energie der eingestrahnten Primärelektronen (PE) auf und kann in tieferen Probenregionen (in Abhängigkeit der vorliegenden Beschleunigungsspannung) entstehen. Bei senkrecht einfallenden PE treten die resultierenden RE auch senkrecht aus der

Oberfläche aus und liefern optimale Materialkontraste. Der Austritt ist hierbei abhängig von dem involvierten Element. Schwere Elemente (z. B. Gold) erzeugen eine stärkere Rückstreuung als leichte und tragen so zur Kontrastierung bei. Die zuvor schwach erkennbaren Bereiche zeichneten sich durch Wechseln des Detektors und der damit verbundenen Elektronen als helle weiße Bereiche von der umliegenden Zelle ab. Wiederum schienen die Cluster auf der Zellmembran zu liegen. Durch Variation der anliegenden Elektronenvoltzahl wurden die Proben untersucht, die Lage der Nanopartikel konnte jedoch nicht genauer geklärt werden. Daher wurde eine MP-LSM gestützte Untersuchung in Kombination mit CLSM durchgeführt. Die Untersuchung beruht auf der Fähigkeit von kolloidalen Gold durch Multiphotonenanregung visualisiert zu werden <sup>(152, 153)</sup>. Die Analyse ergab eine zelluläre Anreicherung der AuNP sowohl an als auch in den Zellen. Somit konnte schließlich der Beweis für eine zelluläre Aufnahme von PSS-modifizierten AuNP in HT29-Zellen erbracht werden.

Alle untersuchten unbeladenen nanopartikulären Formulierungen zeigten eine zelluläre Verträglichkeit und intrazelluläre Aufnahme. Die erzielten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass mit den Formulierungen weiter gearbeitet werden konnte und diese mit dem zu untersuchenden Photosensibilisator mTHPC beladen werden konnte.

#### **4.2 Nanopartikel zum Transport des Photosensibilisators mTHPC**

Bevor die mTHPC-beladenen Nanopartikel im Hinblick auf ihre zelluläre Bindung und Effektivität untersucht werden konnten, wurde die freie Substanz und deren zelluläre Bindung analysiert, um die Parameter für die folgenden Messungen festzulegen. Für die Detektion konnte die charakteristische Autofluoreszenz von mTHPC herangezogen und verwendet werden. Die Untersuchung bestätigte die subzelluläre Verteilung von mTHPC innerhalb des Zytoplasmas <sup>(167)</sup>. Die Verteilung ist hierbei diffus, ohne in den Nukleus einzudringen <sup>(128, 131, 168)</sup>. Vorwiegend konnte mTHPC intrazellulär in Lysosomen, Mitochondrien, Golgi-Apparat sowie dem endoplasmatischen Retikulum <sup>(111, 131-133)</sup> nachgewiesen werden. Die Zerstörung dieser speziellen Organellen durch eine PDT-Behandlung konnte zuvor mit der Initiation von Apoptose in Verbindung gebracht werden <sup>(114)</sup>. Ferner konnte eine rasante Bindung evaluiert werden, die durch Änderung der äußeren Inkubationstemperatur zu reduzieren war. Übereinstimmend mit früheren Arbeiten demonstrierten diese Beobachtungen, dass der freie Photosensibilisator nicht nur über freie Diffusion in die Zelle gelangt, sondern zum Teil aktive Prozesse daran beteiligt sind <sup>(169)</sup>. Die Anwesenheit von Serum und damit assoziierter Serumproteine im Zellkulturmedium bedingt eine Verschiebung des Aufnahmewegs von passiver Diffusion hin zu rezeptorabhängiger Endozytose. Das stark hydrophobe mTHPC bindet an Serumbestandteile und wird mit diesen zusammen in die Zellen aufgenommen <sup>(170)</sup>. Nur freiem und nicht gebundenem mTHPC ist es somit möglich, über passive Diffusion, die

auch bei einer Außentemperatur von 4 °C stattfindet, die Zelle zu infiltrieren. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde für folgende Versuche eine Photosensibilisatorkonzentration von 1 µg/ml und eine ungefähre Inkubationszeit von 1 h gewählt. Diese Zeit und Konzentration reichten aus, um eine Vielzahl an Zellen ausreichend zu färben und zu untersuchen.

Im Anschluss an die Untersuchungen wurde begonnen die Photosensibilisator-beladenen Formulierungen zu charakterisieren. Prinzipiell können zu transportierende Arzneistoffe über verschiedene Strategien an die Nanopartikel gebunden werden. Neben der adsorptiven Bindung, die auf Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeloberfläche und Arzneistoff beruht, stehen noch die kovalente Bindung sowie die Inkorporation in die Partikelmatrix zur Verfügung <sup>(11, 12)</sup>. In Abhängigkeit des eingesetzten Systems lag mTHPC inkorporiert in die Partikelmatrix (PLGA), kovalent gebunden (HSA) oder komplexiert innerhalb einer Hüllschicht (AuNP) vor. Da einer der limitierenden Faktoren die Probenverfügbarkeit ist, konnten nicht alle Untersuchungen mit mTHPC-beladenen Gold-Nanopartikeln durchgeführt werden. Dementsprechend wurden die ersten Prüfungen nur an HSA- und PLGA-Nanopartikeln durchgeführt. Die erste Untersuchung befasste sich mit den Absorptionsspektren der unterschiedlichen Formulierungen. Das gelöste mTHPC wies die charakteristischen Banden sowohl im blauen (Soretbande; 417 nm) als auch roten Wellenlängenbereich auf <sup>(127, 128)</sup>. Die für eine erfolgreiche PDT benötigte letzte Q-Bande konnte bei 651 nm ermittelt werden. Für das nanopartikulär-gebundene mTHPC konnte sowohl für HSA- als auch für PLGA-Partikel das charakteristische Spektrum gemessen werden. Die Spektren unterschieden sich von dem freien Photosensibilisator jedoch in ihrer Intensität und durch eine Verschiebung in den bathochromen Bereich. Von HSA transportiertes und somit kovalent gebundenes mTHPC erfuhr hierbei die stärkste Reduktion und Verschiebung. Die kovalente Anbindung an die Partikeloberfläche führte demzufolge zu veränderten optischen Eigenschaften, die zuvor schon für den Photosensibilisator Pheophorbid A beschrieben werden konnten <sup>(171)</sup>. Eine erfolgreiche PDT-Behandlung sollte dies jedoch nicht behindern, da die nötige Q-Bande im roten Bereich noch als distinkte Bande zu erkennen war und somit zur Verfügung stand.

Nachdem die Absorption der unterschiedlichen Systeme demonstriert werden konnte, wurde die zelluläre Anreicherung von mTHPC über die Nanopartikel untersucht. PLGA-assoziiertes mTHPC zeichnete sich hierbei durch eine stärkere Anreicherung gegenüber HSA-transportiertem mTHPC aus. Für PLGA konnte eine zeitabhängige zelluläre mTHPC-Anreicherung analog zu freiem mTHPC beobachtet werden. Dieses fiel für HSA deutlich geringer aus. Die Ergebnisse deuten zum einen daraufhin, dass das inkorporierte mTHPC schneller aus der PLGA-Matrix in die Zellen entlassen wurde, als dies für das kovalent-gebundene mTHPC der Fall war. Im Falle des inkorporierten

Photosensibilisators befindet sich dieser innerhalb der porösen Partikelmatrix, die nun eine relativ schnelle Diffusion aus dem Partikel in die Zelle ermöglicht. Kovalent gebundenes mTHPC muss, bevor es in die Zelle entlassen werden kann, von dem Partikel gespalten werden. Dies geschieht durch die Hydrolyse der kovalenten Bindung. Weiterhin kann auf die gesteigerte Nanopartikel-Zell-Interaktion verwiesen werden, die entsprechend stärker für PLGA-Nanopartikel als für Albuminpartikel ausfiel.

Um eine Aussage über den Transport von mTHPC durch die verschiedenen Systeme treffen zu können, wurden die Zellen mit den entsprechenden Formulierungen inkubiert und die Bindung und die zelluläre Anreicherung untersucht. Da AuNP, wie besagt, keine Fluoreszenz aufwiesen, erfolgte ausschließlich eine mikroskopische Auswertung, in der CLSM und MP-LSM kombiniert wurden. Hierbei konnte eine zelluläre Anreicherung von mTHPC im Zytoplasma und von AuNP sowohl auf der Zellmembran als auch innerhalb der Zelle ermittelt werden. Somit konnte der erfolgreiche Transport von mTHPC über modifizierte Gold-Nanopartikel demonstriert werden. Aufgrund der verlängerten Inkubationszeit (24 h) und der vergleichbar hohen mTHPC-Konzentrationen (3 µg/ml) wurden Zellen zudem mit dem freien Wirkstoff inkubiert und kontrolliert. Diese Proben wiesen neben der starken intrazellulären mTHPC-Fluoreszenz eine veränderte Morphologie auf. Der abgerundete Phänotyp in Kombination mit einem Herauslösen aus dem Zelllayer deutete auf einen toxischen Effekt durch freies mTHPC hin <sup>(172)</sup>. Partikel-inkubierte Zellen zeigten keinerlei Veränderung und behielten ihre ursprüngliche native Gestalt bei. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die Partikel eine toxische Wirkung von mTHPC reduziert werden konnte. Die gewonnen Einblicke gehen mit früheren Erkenntnissen einher, in denen gezeigt wurde, dass durch Verpackung eines toxischen Wirkstoffs (z. B. Zytostatika) in ein kolloidales System unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden können <sup>(173)</sup>. Die zelluläre Anreicherung von mTHPC wurde auch für die Polymer-basierten Nanopartikel überprüft. Hierbei konnte sowohl für HSA als auch für PLGA der erfolgreiche Transport demonstriert werden. Aufgrund der kürzeren Inkubationszeit (1 h) konnten auch Inkubationen bei 4 °C durchgeführt werden, deren Ergebnisse einen aktiven Aufnahmeprozess der Nanopartikel durch die Zellen belegten. Die Anreicherung konnte sowohl für das HSA- als auch für das PLGA-basierte System durch Inhibierung aktiver Aufnahmeprozesse deutlich reduziert und für geringe Konzentrationen inhibiert werden. Weiterhin konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der detektierten intrazellulären mTHPC-Fluoreszenz für beide nanopartikelären Formulierungen ermittelt werden. Die Zellen erfuhren bei 37 °C einen Anstieg in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Dementsprechend erfolgte eine Anreicherung von mTHPC über die verschiedenen nanopartikelären Systeme in den untersuchten Zellen. Nachdem der Transport des Photosensibilisators in die Zelle über die verschiedenen Formulierungen demonstriert werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt deren

Effektivität und Wirksamkeit untersucht. Die Untersuchungen umfassten hierbei die Bestimmung der induzierten Photozytotoxizität, Dunkeltoxizität und den Nachweis von apoptotischen Ereignissen.

Zunächst wurde die Phototoxizität/Dunkeltoxizität des ungebundenem Wirkstoffs bestimmt. mTHPC zeichnete sich an dieser Stelle durch seine starke Wirksamkeit nach Bestrahlung bereits bei geringen Konzentrationen aus, die in früheren Arbeiten schon beschrieben wurden <sup>(174-177)</sup>. Allerdings konnte für den freien Wirkstoff eine sichtliche Dunkeltoxizität ermittelt werden, die zum einen zeit- und zum anderen konzentrationsabhängig ausfiel. Dieses Phänomen konnte bereits für Zellen eines humanen epidermoiden Karzinoms (A431) gezeigt werden <sup>(178)</sup>. Eine erhöhte Dunkeltoxizität von mTHPC in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration wurde zuvor bei Gallenblasen- und Gallengangskarzinomzellen festgestellt <sup>(141)</sup>. Ab einer Inkubationszeit von 20 h und einer eingesetzten Photosensibilisatorkonzentration > 2 µg/ml konnten dunkeltoxische Effekte gemessen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt in Bezug auf eine Photosensibilisator-assoziierte Dunkeltoxizität ist die vorliegende Inkubationszeit. Versuche mit Fibroblasten zeigten eine zeitabhängige Steigerung der Aufnahme von mTHPC in die Zellen <sup>(128)</sup>. Eine verlängerte Inkubationszeit hätte dementsprechend eine erhöhte mTHPC-Konzentration in den Zellen zur Folge. Diese würde die Wahrscheinlichkeit dunkeltoxische Effekte zu induzieren, unter der Annahme einer Konzentrationsabhängigkeit, erhöhen. Die durch mTHPC induzierte Dunkeltoxizität wies ferner Kennzeichen von Nekrose auf. Nekrose bezeichnet den pathologischen Untergang einer Zelle, in deren Endstadium normalerweise intrazellulär lokalisierte Enzyme freigesetzt werden, die das umliegende Gewebe angreifen und eine entzündliche Reaktion hervorrufen können <sup>(179)</sup>. Der Rückgang in Viabilität und Proliferation verbunden mit einem Verlust der Zellmembranintegrität verdeutlichten dies. Um diese Vermutung jedoch genauer zu untersuchen, musste in einem späteren Experiment der zugrunde liegende Mechanismus evaluiert werden. Die Illuminierung an sich hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Zellen und Parameter.

Die beobachteten dunkeltoxischen Effekte konnten nun durch Verwendung von Nanopartikeln als Arzneistoffträger in Abhängigkeit des verwendeten Systems reduziert und zum Teil eliminiert werden. Die Partikelsysteme wiesen neben einer starken konzentrations- und zeitabhängigen induzierten Photozytotoxizität nur noch eine marginale Dunkeltoxizität auf. Der transportierte Photosensibilisator verlor somit seine Aktivität nicht und konnte mit Licht geeigneter Wellenlänge (652 nm) aktiviert werden. Wie zuvor bereits für andere Photosensibilisatoren bzw. Nanopartikel beschrieben, konnten durch die Anbindung des mTHPC an die Partikelmatrix unerwünschte Nebenwirkungen (in diesem Fall dunkeltoxische Effekte) umgangen werden. Kiesslich et al. untersuchten die Effektivität von mTHPC im Vergleich zu einer wasserlöslichen

liposomalen mTHPC-Formulierung (Foslip®) an zwei Gallenblasenkrebszelllinien <sup>(141)</sup>. Sie konnten zeigen, dass das gebundene mTHPC im Gegensatz zu dem freien Wirkstoff eine reduzierte Dunkeltoxizität aufweist. Weiterhin wurde von Berlanda et al. in einer vergleichenden Studie die Effektivität verschiedener Photosensibilisatoren, darunter auch ein PEGyliertes liposomales Derivat von mTHPC (Fospeg®), im Hinblick auf die Wirksamkeit untersucht <sup>(178)</sup>. Die gebundene Formulierung war ebenfalls durch eine stark reduzierte Dunkeltoxizität und vergleichbare Phototoxizität charakterisiert. Besonders im Falle von HSA und PLGA konnte eine ausgeprägte Photozytotoxizität bei reduzierter Dunkelaktivität beobachtet werden. Ein geringer Rückgang der Proliferation konnte hierbei nach 24 h Inkubation mit hohen PLGAmTHPC-Konzentrationen beobachtet werden. Da diese Partikel bewiesenermaßen den Photosensibilisator in hohen Konzentrationen in die Zellen transportieren und dort ins Zytoplasma entlassen, handelt es sich dabei wahrscheinlich um einen konzentrationsabhängigen Effekt. Daneben konnte auch für Gold-komplexiertes mTHPC eine reduzierte Dunkeltoxizität bei vorhandener Photozytotoxizität demonstriert werden. Lediglich die 24 h Inkubation erwies sich jedoch als effektiv. Eine 4 h andauernde Inkubation mit den zu untersuchenden Nanopartikeln war nicht ausreichend, um eine ausreichend hohe intrazelluläre mTHPC-Konzentration in den Zellen zu bewirken. Dies kann zum einen in einer verlangsamten Nanopartikel-Zell-Interaktion oder verlangsamten Wirkstoff-freisetzung begründet sein und müsste noch genauer untersucht werden. Es gibt in der Literatur allerdings Hinweise auf die Möglichkeit einer Diffusion von mTHPC durch die vorliegende PSS/PAH-Schicht. De Geest et al. <sup>(180, 181)</sup> berichteten in ihren Untersuchungen von einem pH-abhängigen Verhalten von PSS/PAH-Schichten. Bei hohen pH-Werten (pH=9) war der Multilayer nicht permeabel und lag sehr kompakt vor. Eine Diffusion von eingebetteten Substanzen war demzufolge nicht möglich. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes (pH=7) wurde die Layerschicht permeabel und ermöglichte die Diffusion von Molekülen durch sie hindurch. Im Tumor liegt ein zum Normalgewebe erniedrigter pH-Wert vor. Die Multilayerschicht müsste dementsprechend permeabel für mTHPC sein und dessen Freisetzung erlauben.

Im Anschluss wurde in weiteren Untersuchungen die Induktion von Apoptose nachgewiesen. Der programmierte Zelltod ist durch verschiedene morphologische und biochemische Charakteristika gekennzeichnet <sup>(182, 183)</sup>. Zu den morphologischen Merkmalen gehören neben der Chromatinkondensation und nuklearen Fragmentierung, das „*Membrane Blebbing*“, die Reduktion der Zellgröße (Schrumpfen), der Adhäsionsverlust (Abrunden) sowie die Bildung der apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*), die im weiteren Verlauf durch Makrophagen oder benachbarte Zellen phagozytiert werden. Auf biochemischer Ebene ereignet sich die Spaltung genomischer DNA, die Externalisierung von Phosphatidylserin, die proteolytische Spaltung

intrazellulärer Substrate und somit die Aktivierung von Proteasen/Caspasen. Die genannten Faktoren ermöglichen einen kontrollierten Zelltod ohne Schädigung des umliegenden Gewebes/Zellen, wie es bei der Nekrose der Fall ist. Der bevorzugte Zelltod von PDT-behandelten Zellen liegt somit in einer geordneten Apoptose und nicht in einer „chaotischen“ Nekrose, die eine weitere Entzündung des umliegenden Gewebsareals hervorrufen könnte. Der Nachweis von Apoptose wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde der Verlust der Membranasymmetrie und die damit verbundene Externalisierung von Phosphatidylserin untersucht. Unter Normalbedingungen ist dieses ausschließlich auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert und die Asymmetrie wird durch Translokasen aufrechterhalten <sup>(184)</sup>. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin durch einen sogenannten „flip-flop“-Mechanismus auf die Außenseite befördert und dort von Makrophagen identifiziert. Dieser Transfer auf die äußere Membranseite ermöglicht nun den Eintritt von Färbelösungen in die Zelle bzw. die Detektion über spezifische Liganden (z. B. Annexin <sup>(185)</sup>). Die Induktion von Apoptose wurde neben freiem mTHPC auch für beladene Polymer-basierte Nanopartikel untersucht. Für alle Formulierungen konnte ein zeitabhängiger Anstieg an apoptotischen Zellen detektiert werden. Dieser fiel am stärksten für mTHPC sowie PLGA-mTHPC behandelte Proben aus. HSA-behandelte Zellen erfuhren ebenfalls eine Zunahme an positiv detektierten Zellen, die jedoch geringer ausfiel. Erst längere Inkubationszeiten führten zu einer ausreichenden Akkumulation des Photosensibilisators in den Zellen. Da in früheren Untersuchungen eine zeitabhängige Akkumulation von Photosensibilisatoren in Zellen gezeigt werden konnte <sup>(128)</sup>, ist anzunehmen, dass es zu einem mTHPC-Anstieg in den behandelten Zellen kam. Diese erhöhte intrazelluläre Konzentration bedingte eine stärkere Induktion von Apoptose, da sich der Photosensibilisator verstärkt an Zielstrukturen (z. B. Mitochondrien <sup>(186)</sup>) anlagern konnte. Die resultierenden reaktiven Sauerstoffspezies, wie Singulett-Sauerstoff, konnten mit diesen reagieren und zum Tod der Zelle beitragen. Da die Freisetzung von mTHPC durch HSA geringer bzw. zeitverzögert verlief, konnte die Apoptose entsprechend nur abgeschwächt induziert werden. Die so erhaltenen Ergebnisse stimmen mit zuvor gewonnenen Daten bezüglich der intrazellulären mTHPC Konzentration überein. Hier konnte ebenfalls für PLGA-transportiertes mTHPC eine stärkere Anreicherung gegenüber HSA detektiert werden. Die kovalente Anbindung von mTHPC an die Albuminpartikel sowie deren weniger ausgeprägte Nanopartikel-Zell-Interaktion führten zu einer geringeren intrazellulären mTHPC-Konzentration und so zu einer abgeschwächten Apoptoserate. Da die Dunkelkontrollen in allen Proben unauffällig waren, konnte eine entsprechende Toxizität ausgeschlossen werden. Die zuvor untersuchten dunkeltoxischen Effekte von freiem mTHPC konnten, unter der Annahme, dass mTHPC keine Apoptose induziert, somit zum Teil nekrotischen Ereignissen zugeschrieben werden.

Nachdem erste apoptotische Ereignisse demonstriert werden konnten, wurden die Proben auch auf das Vorhandensein von PARP<sub>cleaved</sub> hin untersucht. Es handelt sich bei PARP (Poly [ADP-ribose] polymerase) um ein Enzym, das in intakten Zellen an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist<sup>(187)</sup>. Die Caspase-abhängige Spaltung von PARP (116 kDa) in zwei unterschiedliche große Fragmente (25 und 85 kDa) ist ein essentieller Schritt während der Apoptose<sup>(183)</sup>. Der immunhistochemische Nachweis des 85 kDa-Fragments kann im Folgenden als Nachweis herangezogen werden. Für den freien Wirkstoff und PLGA-transportiertes mTHPC konnte ein zeitabhängiger Anstieg an PARP<sub>cleaved</sub> positiven Zellen nach einer PDT-Behandlung ermittelt werden. Die Zellen wiesen verstärkt apoptotische Zellen in dem Monolayer auf. Das erhaltene Signal war hierbei ausschließlich innerhalb des Zellkerns bzw. zwischen den bereits entstandenen Zellkernfragmenten lokalisiert. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 1 bzw. 4 h auf 24 h ging mit einer effizienteren Apoptoserate nach Bestrahlung einher. Bedingt durch die längere Inkubationszeit konnte sich der Photosensibilisator an präferierten Organellen (z. B. Golgi-Apparat, ER, Mitochondrien<sup>(111, 131-133)</sup>) anreichern und eine entsprechende Kaskade einleiten. Wiederum konnten für das PLGA-basierte System stärkere Effekte als für HSA detektiert werden. Die Induktion verlief schwächer und stimmte somit mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen überein.

Die entwickelten nanopartikulären Systeme wiesen somit alle Anforderungen an einen guten Photosensibilisator auf. Neben einem gerichteten Transport in das betroffene Gewebe wurde die Löslichkeit in Wasser gewährleistet und eine starke Phototoxizität bei reduzierter Dunkeltoxizität demonstriert.

Um die Effektivität der Formulierungen an einem realistischeren Modell zu bewerten, wurden 3D-Tumormodelle aus HT29-Zellen hergestellt und zur Untersuchung herangezogen. 3D-Modelle bieten die Möglichkeit einen Wirkstofftransport in ein multizelluläres System zu beobachten und zu untersuchen. Sie reflektieren eine *in vivo* Situation eines noch nicht vaskularisierten Tumors und weisen innerhalb ihrer Struktur unterschiedliche Zellpopulationen auf. Innerhalb dieser Struktur befinden sich die proliferierenden Zellen ausschließlich in der Randzone, gefolgt von quieszenten (ruhenden, d.h. in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus) Zellen im mittleren Abschnitt und hauptsächlich nekrotischen Zellen im Innern<sup>(28)</sup>. Die Zellen weisen somit entsprechend der Lage im Sphäroid eine unterschiedliche Verteilung an Nährstoffen und Stoffwechselprodukten auf. Ferner nimmt das Sauerstoffangebot zum Zentrum eines Sphäroids, unter der Ausbildung von hypoxischen Bereichen, hin ab. Die Sphäroide wurden anfänglich im Hinblick auf ihr Wachstums sowie eine Verteilung von lebenden und toten Zellen innerhalb des Modells untersucht. Eine Kultivierungsdauer von insgesamt sieben Tagen bot sich hierbei optimal an, da die Sphäroide vornehmlich aus lebenden Zellen bestanden und nur einen geringen Teil nekrotischer Zellen im Innern

aufwiesen. Nachdem keine Änderungen im Phänotyp in Folge der veränderten Kultivierung gezeigt werden konnte, erfolgte die Inkubation mit den zu testenden Substanzen. Die Inkubationszeit betrug aufgrund der jetzt größeren Distanz, die überwunden werden musste, 24 h und es wurde bedingt durch die größere Zellzahl eine angepasste und somit höhere mTHPC-Konzentration (3 µg/ml) untersucht. Die untersuchten Sphäroidschnitte wiesen für alle untersuchten Proben die charakteristische mTHPC-Fluoreszenz aus. Die stärkste Fluoreszenz war auf den äußeren Randbereich der Sphäroide begrenzt und nahm zum Zentrum hin ab. Diese charakteristische Verteilung konnte von Marchal et al. <sup>(188)</sup> für den freien Photosensibilisator bereits demonstriert werden. Die Verteilung fiel hierbei besonders stark für freies und PLGA-gebundenes mTHPC aus. Neben dem transportierten mTHPC konnte im Falle von PLGA auch noch die grüne Fluoreszenz von Lumogen Yellow® innerhalb des ganzen Schnittes mit lokalen Intensitätsmaxima ermittelt werden, jedoch keine Kollokalisierung von Nanopartikeln und Photosensibilisator festgestellt werden. Die unterschiedliche Verteilung kann verschiedenen Tatsachen zugeschrieben werden: Zum einen ist es möglich, dass sich das hydrophobe mTHPC aus der porösen PLGA-Matrix während der Passage der intrazellulären Zwischenräume herausgelöst hat und in die Zellen eingedrungen ist. Die unbeladenen Partikel sind zum Teil noch weiter in den Sphäroid eingedrungen und bedingten somit eine Anreicherung im gesamten Sphäroid. Zudem ist es möglich, dass die beladenen Partikel vorwiegend in die Zellen des äußeren Bereichs aufgenommen, dort in die einzelnen Bestandteile zersetzt wurden und das freigewordene Lumogen in die anderen Zellen diffundierte.

Nachdem der erfolgreiche Transport des Photosensibilisators durch die unterschiedlichen Formulierungen demonstriert werden konnte, wurde die Wirksamkeit nach einer PDT-Behandlung untersucht. Neben mTHPC-kultivierten Proben wurden Wasserstoffperoxid-behandelte Proben als Kontrollen auf die Existenz von PARP<sub>cleaved</sub> untersucht. Alle untersuchten Proben wiesen eine Färbung des Zentrums auf. Durch das rasante Sphäroidwachstum kam es zur Ausbildung von nährstoff- und sauerstoffunterversorgter Hypoxie Regionen (Zentrum) und somit zum Absterben von Zellen. Diese Bereiche setzen sich vornehmlich aus nekrotischen Zellen zusammen, können aber auch vereinzelt apoptotische Zellen enthalten, die in den wachsenden Sphäroiden im Zentrum akkumulieren <sup>(189, 190)</sup>. Dort können die apoptotischen Fragmente nicht ausreichend entfernt werden (z. B. durch Phagozyten) schwellen durch einströmende Flüssigkeit an und platzen auf (sekundäre Nekrose <sup>(183)</sup>).

In der Positivkontrolle (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) konnten keine weiteren apoptotischen Zellen ermittelt werden. Allerdings zerrissen die Proben beim Schneiden, da die Behandlung einen Verlust der Stabilität der Proben zur Folge hatte. Proben, die zuvor mit mTHPC behandelt und bestrahlt wurden, wiesen weitere Bereiche von apoptotischen Zellen auf.

Es handelte sich in allen Proben um die äußeren Randbereiche der Sphäroide. Die Wirkung war hier am größten, da in diesen Bereichen die höchste mTHPC-Konzentration vorlag, die für eine erfolgreiche Induktion nötig war. Daneben waren die äußeren Bereiche ausreichend mit Sauerstoff angereichert. Dieser ist essentiell für eine effektive Photodynamische Therapie. Zum Zentrum hin nahm die Sauerstoffkonzentration unter der Ausbildung von hypoxischen Bereichen ab<sup>(28)</sup>. Somit konnten in diesen Bereichen keine ausreichend hohen Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies generiert werden, die eine zelltötende Wirkung hätten entfalten können. Wiederum waren mTHPC und PLGAmTHPC effektiver als HSAmTHPC.

Alle untersuchten mTHPC-beladenen nanopartikulären Formulierungen zeichneten sich durch eine intrazelluläre Akkumulation sowohl im Monolayer als auch im 3D-Tumormodell aus. Die Induktion von Apoptose als auch eine gesteigerte Phototoxizität bei reduzierter Dunkeltoxizität konnten erfolgreich demonstriert werden. Die erzielten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass der Photosensibilisator erfolgreich mittels HSA- und PLGA-basierter Formulierungen in die Zellen transportiert und dort entlassen werden konnte, ohne seine Wirksamkeit zu verlieren. PLGA-Partikel erwiesen sich gegenüber Albuminpartikeln in der abschließenden Betrachtung der generierten Daten als die effektiveren Trägersysteme.

Zusammenfassend stellen die entwickelten nanopartikulären Formulierungen interessante Arzneistoffträgersysteme für den Photosensibilisator mTHPC dar. In einem nächsten Schritt müssten die entwickelten Formulierungen im Tiermodell hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Spezifität untersucht werden. Hierbei müsste in einem ersten Experiment die Stabilität der jeweiligen Formulierung unter *in vivo* Bedingungen überprüft und getestet werden. Weiterhin wäre zu untersuchen, ob der nanopartikulärgebundene Photosensibilisator die gleiche Wirkung hervorruft, wie der freie Wirkstoff. Ein besonderes Augenmerk läge hierbei auf der durch freies mTHPC induzierten Dunkeltoxizität. Diese konnte, wie bereits beschrieben, durch die nanopartikulären Trägersysteme deutlich reduziert werden. Darüber hinaus müssten weitere Parameter, die für eine erfolgreiche PDT-Behandlung nötig sind, vergleichend überprüft werden. Hierzu zählt neben der einzusetzenden Dosis auch die verwendete mTHPC-Konzentration als auch die Zeit, die zwischen Wirkstoffapplikation und Bestrahlung verstreicht.

### 4.3 Zelltyp-spezifische Nanopartikel

In den vorangegangenen Versuchen konnte die Wirksamkeit von mTHPC-beladenen Nanopartikel demonstriert werden. Die spätere Formulierung sollte neben dem Photosensibilisator noch einen Zelltyp-spezifischen monoklonalen Antikörper tragen, um das gewünschte Zielgewebe zu binden. Daher wurde in einem ersten Schritt die Spezifität von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln überprüft. Als potentielle bindende Substanzen, auch als Liganden bezeichnet, stehen eine Vielzahl von Verbindungen zur Verfügung. Neben kurzen RNA- und DNA-Sequenzen<sup>(32)</sup>, Peptiden<sup>(33, 34)</sup> sowie einer Gruppe von verschiedenen kleinen Molekülen (z. B. Folate<sup>(35)</sup>, Hormone<sup>(36)</sup>) erfahren vor allem monoklonale Antikörper vielfache Anwendung<sup>(37-40)</sup>. In dieser Arbeit wurde zum spezifischen Targeting der monoklonale Antikörper Cetuximab verwendet. Cetuximab, ein humanisierter monoklonaler IgG1 Antikörper, bindet spezifisch den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) und wurde 2004 für die Therapie von Patienten mit Rezeptor-positivem metastasierendem und therapierefraktären Kolorektalkarzinom zugelassen<sup>(58, 59)</sup>. Der EGFR ist Mitglied der Erb-Familie, die sich durch extrazelluläre Proteinliganden auszeichnet<sup>(45, 46)</sup>. Es handelt sich bei dem EGF-Rezeptor um ein Transmembranprotein mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität und einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne. In früheren Studien wurde die veränderte Expression von EGFR in malignen Erkrankungen vielfach erörtert. EGFR wird in verschiedenen Tumorarten, wie z. B. Kolorektalkarzinom, Kopf- und Nackenkrebs, Brustkrebs, Eierstockkrebs, Prostatakrebs, nicht-kleinzelliger Lungenkrebs sowie Glioblastomen überexprimiert<sup>(49-51)</sup>. Daher stellt EGFR eine interessante Zielstruktur für ein Zelltyp-spezifisches Targeting für diese Tumore dar.

Zur Testung lagen Nanopartikel basierend auf HSA und PLGA vor. Diese trugen entweder den spezifischen Antikörper Cetuximab oder einen unspezifischen humanen IgG-Antikörper als Kontrolle. Eingangs wurden die verwendeten Zelllinien hinsichtlich ihrer EGFR-Expression überprüft. Die Ergebnisse verdeutlichten einen starken Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien HT29 und DiFi. HT29 wies nur eine diffuse Immunfärbung und stagnierende Bindungskapazität auf und verdeutlichte so eine geringe EGFR-Expression<sup>(191)</sup>. Zellen der Linie DiFi waren dagegen durch eine starke Immunfärbung und eine konzentrationsabhängig ansteigende Bindung beschrieben. Der Rezeptor war demzufolge in hoher Kopienzahl auf der Oberfläche von diesen Zellen vertreten<sup>(192, 193)</sup>. Nachdem die Zellen hinsichtlich des vorliegenden EGFR-Expressionsstaus charakterisiert waren, konnte die Testung der Nanopartikel erfolgen. Zunächst wurden oberflächenmodifizierte HSA-Nanopartikel untersucht. Zunächst wurde die Zytotoxizität nach Inkubation mit ansteigenden Nanopartikel-Konzentrationen

mittels eines Viabilitätsassays (WST-1-Assay) bestimmt. Die schwach EGFR-exprimierenden HT29-Zellen zeigten nach 24 h Inkubation eine gering reduzierte MDH-Aktivität. Die Reduktion war jedoch nicht partikel- oder konzentrationsabhängig. Im Gegensatz dazu konnte eine veränderte Aktivität bei DiFi-Zellen beobachtet werden. Zunächst stieg die Viabilität für alle untersuchten Proben an. Anschließend nahm diese mit steigender Inkubationszeit und in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration ab. Die unspezifischen Kontrollpartikel führten zu einer nur geringen Abnahme innerhalb der Kontrollschwankungen, wohingegen die spezifischen Nanopartikel eine stärkere Reduktion hervorriefen. Diese Reaktion wurde mit größter Wahrscheinlichkeit durch den verwendeten Antikörper Cetuximab hervorgerufen. Die Bindung des EGFR initiiert, wie bereits beschrieben, eine Internalisierung des Rezeptors und die Hemmung von nach geschalteten Signalkaskaden und schließlich zu der Hemmung von Zellzyklus und Proliferation. Die Inhibierung der Viabilität durch Cetuximab, vor allen in Zellen mit hoher EGFR-Kopienzahl und nicht in moderat exprimierenden Zellen, konnte zuvor bestätigt werden <sup>(193-195)</sup> und wies darauf hin, dass die Reduktion durch Cetuximab und nicht durch den Partikel hervorgerufen wurde. Darüber hinaus unterstreichen die gewonnen Erkenntnisse, dass der Antikörper in gebundener Form seine Wirksamkeit nicht verliert. Da die Nanopartikel keine bzw. erklärbare Effekte induzierten, wurde begonnen die zelluläre Bindung genauer zu untersuchen. Durch durchflusszytometrische Analysen konnte eine verstärkte spezifische zelluläre Bindung der Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikel gegenüber den unspezifischen Kontrollpartikeln an die untersuchten Zellen demonstriert werden. Die unspezifischen Albuminpartikel reicherten sich nur zu einem geringen Maße an den Zellen an. Die spezifischen Partikel erfuhren dagegen einen Anstieg der zellulären Bindung durch Erhöhung der eingesetzten Antikörperkonzentration. Hoch EGFR-exprimierende DiFi-Zellen wiesen eine besonders starke Bindung auf, die sich vor allem in der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) niederschlug. Die Nanopartikel zeigten somit in Abhängigkeit der verwendeten Antikörper ein unterschiedliches Bindungsverhalten an den verwendeten Zelllinien. Nachdem eine konzentrationsabhängige spezifische Bindung ermittelt werden konnte, wurde die Bindung in Abhängigkeit der Inkubationszeit untersucht. Hierbei fiel vor allem der Unterschied in der Bindungsintensität zwischen HT29 und DiFi auf. Diese war für HT29 gegenüber DiFi um ein Vielfaches reduziert. Für beide Linien konnte ein Anstieg der Anzahl an Zellen mit Nanopartikeln mit steigender Inkubationszeit ermittelt werden. Besonders Cetuximab-modifizierte Nanopartikel zeichneten sich durch eine verstärkte und zum Teil signifikant erhöhte Bindung aus. Mit steigender Kultivierungsdauer nahm diese ab und es erfolgte ein Angleichen in der Bindung beider Formulierungen. Die spezifische Bindung konnte durch Zugabe von freiem Cetuximab blockiert werden. Der Einsatz von freiem Antikörper (entsprechend des zugrunde liegenden Targets) zur

Hemmung der Nanopartikel-Zell-Interaktion ist eine adäquate Methode zur Überprüfung einer Rezeptor-vermittelten Endozytose <sup>(150)</sup>. Der freie Antikörper konkurriert mit dem nanoskaligen System um die Bindung des Rezeptors und bedingt eine Reduktion an freien Bindungsstellen. Für alle Inkubationszeiten konnte für DiFi-Zellen in der Anwesenheit des freien Antikörpers ein signifikanter Bindungsunterschied evaluiert werden. Dieser fiel für HT29-Zellen entsprechend geringer aus. Da die zelluläre Bindung in Anwesenheit des freien Antikörpers signifikant reduziert werden konnte, konnte eine spezifische Aufnahme über Rezeptor-vermittelte Endozytose bestätigt werden. Der Antikörper blockierte die entsprechenden Bindungsstellen und verhinderte die Bindung und Internalisierung der Nanopartikel. Neben der Durchflusszytometrie wurden CLSM-Analysen durchgeführt, um die Unterschiede in der Bindung zu untersuchen und um Aussagen über den Aufenthaltsort der entsprechenden Formulierungen zu treffen. Aufgrund der unterschiedlichen EGFR-Expression war die spezifische Bindung und intrazelluläre Akkumulation von HSA-Cetuximab für DiFi-Zellen stärker als für HT29. Die große Anzahl an Rezeptoren ermöglichte eine vielfache Bindung der entsprechenden Formulierung, die im Folgenden internalisiert wurden. Die Bindung und Aufnahme von HSA-Cetuximab erfolgte hierbei schnell und im hohen Maße. HT29 wiesen dagegen nur Nanopartikelagglomerate auf der Zelloberfläche auf, die wahrscheinlich erst nach längerer Zeit internalisiert werden. Eine clusterförmige Anreicherung der Albuminpartikel konnte auf die diffuse EGFR-Expression von HT29 zurückgeführt werden. Da diese den Rezeptor nur in moderater Form exprimieren, erfolgt in den entsprechenden Bereichen der Zelloberfläche die Bindung und Anreicherung der spezifischen Albuminpartikel. In den untersuchten Proben konnten nur vereinzelte unspezifische IgG-Partikel ermittelt werden. Durch die vorhergehenden Untersuchungen konnte die Spezifität der entwickelten Albuminpartikel gegenüber den unspezifischen Kontrollpartikeln demonstriert werden. Ferner war es möglich die Rezeptor-vermittelte Endozytose zu hemmen sowie die intrazelluläre Akkumulation zu spezifizieren. In einem letzten Experiment wurde die zeitabhängige Akkumulation mittels Time-Laps-Analysen genauer untersucht und die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien konnten weiter differenziert werden. HT29-Zellen zeigten nur eine geringe Interaktion mit den entsprechenden Kontrollpartikeln. Die spezifischen Partikel wurden verstärkt durch die Zellen aufgenommen und reicherten sich bis zu dem Erreichen eines Sättigungsniveaus in den Zellen an. Trotz Erhöhung der Inkubationszeit erfolgte keine weitere Anreicherung. DiFi-Zellen wiesen eine stetige Zunahme an Albuminpartikeln über die Zeit auf. Es erfolgte eine zelluläre Anreicherung der spezifischen als auch unspezifischen Albuminpartikel, wobei sich die spezifischen durch eine verstärkte Bindung auszeichneten. Ein Sättigungseffekt konnte nicht beobachtet werden.

Nachdem die Spezifität für oberflächenmodifizierte HSA-Partikel demonstriert werden konnte, wurden die entsprechenden Versuche mit PLGA-Nanopartikeln durchgeführt. Zu Beginn konnte die zelluläre Verträglichkeit der oberflächenmodifizierten Nanopartikel mittels eines WST-1-Assays bestätigt werden. Hierbei erfolgte, analog den untersuchten HSA-Partikeln, eine minimale Reduktion der MDH-Aktivität in Folge einer 24 h Inkubation mit Cetuximab-tragenden Partikeln ausschließlich in DiFi-Zellen. Die weiteren untersuchten Proben und Zellen blieben unauffällig. Die Wirksamkeit des Antikörpers blieb somit auch in diesem System erhalten. Da unbeladene PLGA-Partikel, wie bereits beschrieben, eine verstärkte zelluläre Bindung aufwiesen, musste zur Bestimmung der zellulären Bindung vor allem der jeweilige MFI-Wert beachtet werden. Die Auswertung ergab, dass sowohl HT29- als auch DiFi-Zellen eine konzentrationsabhängige Anreicherung beider Formulierungen aufwiesen. Hierbei konnte bei HT29- und DiFi-Zellen auch ein konzentrationsabhängiger Anstieg im MFI beobachtet werden. Der MFI von Cetuximab-modifizierten PLGA-Nanopartikeln lag jedoch für alle untersuchten Proben und Zellen über dem der unspezifischen Kontrollpartikel.

Eine zeitabhängige Steigerung der zellulären Bindung konnte in einem weiteren Experiment nur für HT29 demonstriert werden. Unspezifische Kontrollpartikel erfuhren hierbei bereits ab einer Stunde Inkubation keine weitere Zunahme im MFI. Die spezifischen Partikel steigerten diesen mit fortschreitender Inkubationszeit. Für HT29-Zellen konnte somit eine spezifische Anreicherung demonstriert werden. Jedoch muss beachtet werden, dass DiFi-Zellen sowohl einen Rückgang der spezifischen als auch unspezifischen Bindung mit Erhöhung der Kultivierungsdauer zeigten. Im Anschluß wurde der Einfluss des freien Antikörpers auf die Bindung untersucht. Die Auswertung belegte für HT29 eine leicht reduzierte Bindung, die jedoch nicht signifikant ausfiel. Ferner konnten nur geringe Unterschiede in den ermittelten MFI-Werten festgestellt werden. Demgegenüber konnte die zelluläre Bindung von PLGA-Cetuximab bei DiFi-Zellen in der Anwesenheit von freiem Cetuximab stärker reduziert werden. Jedoch blieb der ermittelte MFI unverändert. Die Bindung von PLGA-Cetuximab Partikeln an DiFi-Zellen erfolgte dementsprechend vermehrt über den Rezeptor und konnte durch Zugabe von freiem Antikörper inhibiert werden. Mittels CLSM basierten Analysemethoden konnten die durchflusszytometrischen Ergebnisse bestätigt werden. Die Zellen wiesen akkumulierte spezifische und unspezifische Partikel innerhalb der gefärbten Zellen auf. Wieder konnte eine verstärkte zelluläre Bindung an HT29 gegenüber DiFi-Zellen beobachtet werden. Obwohl die Ergebnisse nur eine geringe Spezifität der entwickelten Partikel suggerierten, wurden die zelluläre Akkumulation mittels Time-Laps-Aufnahmen analysiert und ausgewertet. HT29 zeichnete sich wiederum durch eine verstärkte Anreicherung der spezifischen Formulierungen aus. Unspezifische Nanopartikel zeigten eine schwächere Interaktion mit den Zellen und erfuhren während der Kultivierung eine

leichte Zunahme. Die Interaktion der Partikel mit DiFi-Zellen entsprach den vorherigen Untersuchungen. Die größte Interaktion beider Partikel wurde nach 4 h ermittelt und nahm im Anschluss ab. Die spezifischen Partikel zeigten eine leicht erhöhte Interaktion, jedoch nahm auch dieser Anteil im Laufe der Zeit ab. Eine ausgeprägte Spezifität von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln in Abhängigkeit der EGFR-Expression konnte nicht demonstriert werden. Es konnte zwar eine Aufnahmesteigerung über das spezifische System ermittelt werden, diese war jedoch für beide Zelllinien nicht signifikant. Die gesteigerte Aufnahme der unspezifischen Nanopartikel (PLGA-IgG) kann auf die bereits beschriebene sehr hohe Aufnahmerate unmodifizierter Partikel zurückgeführt werden. Die Einführung von Polyethylenglykol (PEG)-Ketten könnte ein verändertes Verhalten hervorrufen, da die Partikel hydrophiler würden. Diese Partikel würden eventuell über eine gesteigerte Anreicherung verfügen und müsste jedoch noch genauer untersucht werden. Daher wurde eine weitere Bearbeitung dieses System ab diesem Zeitpunkt nicht weiter fortgesetzt.

#### **4.4 Zelltyp-spezifische und Photosensibilisator-beladene Nanopartikel**

Zum Schluss wurden auf HSA basierende Nanopartikel getestet, die neben den Photosensibilisator mTHPC den spezifischen monoklonalen Antikörper Cetuximab auf der Oberfläche trugen. Der spezifische Transport von Arzneistoffen durch oberflächenmodifizierte Nanopartikel stellt eine Möglichkeit dar, die Therapie und die daran assoziierte Wirkstoffapplikation zu optimieren. Durch die gezielte Verabreichung des Wirkstoffs über die Nanopartikel in das betroffene Gewebe können unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduziert werden <sup>(12)</sup>. Ausserdem ist durch den Einsatz von Nanopartikeln eine Reduktion der applizierten Wirkstoffdosis möglich <sup>(196)</sup>. In den vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits eine reduzierte Dunkeltoxizität des gebundenen Photosensibilisators sowie die spezifische Akkumulation über Cetuximab demonstriert werden. Die oberflächenmodifizierten und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikel (HSA-mTHPC-Cet) wurden in einem ersten Schritt hinsichtlich ihres Wirkstofftransports in die beiden Zelllinien untersucht. Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab nur eine leicht verbesserte Anreicherung des Wirkstoffs über das spezifische System als über die unspezifische Kontrolle. Diese konnte vor allem in den korrespondierenden MFI-Werten abgelesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte in der Struktur bzw. dem Aufbau der untersuchten Partikel liegen. Diese trugen sowohl den spezifischen Antikörper als auch den Photosensibilisator auf der Oberfläche. Die Anbindung von mTHPC an die Partikeloberfläche könnte einen Einfluss auf die Spezifität und/oder Bindungseigenschaften von Cetuximab an EGFR gehabt haben. Somit konnte Cetuximab seine volle Effektivität nicht mehr entfalten und die spezifische Bindung gegenüber der unspezifischen nahm deutlich ab.

Daneben wurde die biologische Wirksamkeit der Vollpräparation untersucht. Hierzu wurden neben der Phototoxizität auch apoptotische Ereignisse nachgewiesen. Beruhend auf der verstärkten EGFR-Expression und einer dadurch bedingten höheren Nanopartikelinternalisierung konnten die stärksten Effekte bei DiFi-Zellen bestimmt werden. Zellen der Linie DiFi wiesen die größten Veränderungen nach einer PDT-Behandlung auf. Jedoch führten die Kontrollpartikel nach längeren Inkubationszeiten (24 h) auch zu einer gewissen Reduktion in der zellulären Proliferation. In vorigen Versuchen konnte die Zunahme an unspezifisch gebundenen Partikeln mit steigender Inkubationszeit belegt werden und kann daher für diese Reaktion verantwortlich gemacht werden. Aufgrund der langen Inkubationszeit induzierten die Cetuximab-modifizierten Albuminpartikel eine Reduktion der Proliferation im Dunkeln (Dunkeltoxizität). Da bereits ein solcher Effekt beschrieben werden konnte, kann dieser auf die Aktivität des verwendeten Antikörpers zurückgeführt und als Beleg für dessen Aktivität angesehen werden. Die Einführung von mTHPC auf die Oberfläche hatte somit keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des vorliegenden Antikörpers. Schwach EGFR-exprimierende HT29-Zellen zeigten geringe Reaktionen nach Inkubation und Belichtung. Hier erwiesen sich die spezifischen Nanopartikel (HSAmTHPC-Cet) als die effektivere Formulierung gegenüber dem unspezifischen Partikelsystem. Die Reaktion war jedoch nicht so ausgeprägt, was auf das geringe Vorhandensein des Rezeptors zurückzuführen ist. Der abschließende Beweis für die spezifische Funktionalität der Formulierung erfolgte über den Nachweis von Apoptose nach einer PDT-Behandlung. In allen Proben verblieben die Dunkelkontrollen unauffällig. Es existierte nur ein Unterschied in der Intensität der jeweiligen Pixelwerte. Nach Belichtung konnte in allen Proben ein Anstieg des Pixelwerts ermittelt werden. HT29 zeichneten sich wiederum durch eine schwache Reaktion aus. Nach 2 h konnte nur eine minimal erhöhte Induktion abgelesen werden, diese stieg stetig mit anhaltender Inkubationszeit an und unterschied sich im Folgenden deutlich von den anderen Werten. Aufgrund der erhöhten Inkubationszeit kam es zu einer gesteigerten Anreicherung der Partikel in der Zelle. Dort konnte der Photosensibilisator entlassen werden und sich in einer ausreichenden Konzentration an Zielstrukturen ansammeln und nach Belichtung zum Tod der Zelle führen. DiFi-Zellen zeigten eine ähnliche, allerdings stärkere Reaktion in Folge einer PDT-Behandlung. Bereits nach 2 h konnte ein Unterschied ermittelt werden, der sich im Laufe der Zeit noch vergrößerte. Die spezifischen Partikel wirkten hierbei als die effektivsten Apoptoseinduktoren. Die gewonnenen Ergebnisse gehen mit bereits ermittelten Daten einher. Eine verstärkte Anreicherung von Albuminpartikeln über Cetuximab in DiFi-Zellen, bedingt durch eine hohe EGFR-Kopienzahl, sowie eine induzierbare phototoxische Wirkung nach länger andauernder Inkubation mit HSAmTHPC führte durch die Vollpräparation zu einer verstärkten Apoptoserate. Zwar konnten keine

statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Systemen ermittelt werden, aber die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Apoptoseinduktion durch Cetuximab-modifizierte HSAmTHPC-Nanopartikel hin, was auf die Oberflächenmodifikation zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse geben somit einen Hinweis auf eine spezifische Wirkung von oberflächenmodifizierten Albuminpartikeln gegenüber den unspezifischen Partikeln.

Die zusammenfassende Analyse der erhaltenen Daten verdeutlichte die effektive Wirksamkeit von unterschiedlichen Nanopartikeln als Wirkstofftransporter. Die Untersuchungen mit Gold-Nanopartikeln befinden sich zurzeit noch in den Anfängen und bedürfen noch einer genaueren Analyse. Jedoch bieten diese aufgrund ihrer besonderen optischen Eigenschaften sowie der geringen Größe ein großes Einsatzgebiet. Eine weitere Erhöhung der komplexierten mTHPC-Konzentration und spezifische Modifizierung der Oberfläche mit targetierenden Liganden sowie eine PEGylierung wären in Zukunft denkbar. Die Anbindung von Cetuximab auf die Oberfläche von Gold-Nanopartikeln konnte von Patra et al. <sup>(197)</sup> demonstriert werden. Diese Partikel wiesen weiterhin das Zytostatikum Gemcitabin auf. Die Applikation der Formulierung bewirkte eine drastische Reduktion der Tumorzellproliferation *in vitro* und des Tumorwachstums *in vivo*. Daneben konnte in ersten Studien der Transport von unterschiedlichen Photosensibilisatoren <sup>(198)</sup> gezeigt werden. Darüberhinaus belegen Daten von Wieder et al. <sup>(199)</sup> eine erhöhte Ausbeute an Singulett-Sauerstoff in der Anwesenheit von Gold-Nanopartikeln. Nach Aufnahme der Partikel durch die Zellen könnten sie in den Zellen als Mediator zwischen dem einkommenden Lichtsignal und dem Photosensibilisator als Akzeptor fungieren. In Zukunft wäre eine Kombination aus verschiedenen Therapien denkbar. Hierbei könnte die partikelabhängige Plasmonresonanz von kolloidalem Gold genutzt werden und zum Therapieerfolg beitragen. Gold-Nanopartikel stellen wegen den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten ein interessantes Forschungsgebiet dar, das noch weiteren Untersuchungen bedarf und viele Möglichkeiten offen hält.

Als die effektivsten Wirkstoff-Trägersysteme erwiesen sich Nanopartikel basierend auf Polymilch-co-glykolsäure (PLGA). Der Baustein PLGA erfreut sich seit vielen Jahren einer vielfältigen Anwendung im nanopartikulären Wirkstofftransport. Grund hierfür sind seine Biokompatibilität, seine Biodegradierbarkeit sowie seine Zulassung zur humanen Anwendung und Nanomedizin durch die FDA <sup>(9, 200)</sup>. In vielen Studien konnte ein breites Anwendungsspektrum demonstriert werden. So untersuchten Mu und Feng <sup>(201)</sup> ein mit Taxol (Paclitaxel) beladenes System. Die Enkapsulierungseffizienz betrug 100 % und eine verlangsamte Wirkstofffreisetzung von bis zu 20 Tagen über Diffusion in Folge einer Matrixschwellung konnte gezeigt werden. Eine verbesserte und verlängerte Applikation

sowie eine Reduktion von Nebenwirkungen konnte für eine Vielzahl weiterer Arzneistoffe erbracht werden. Hierzu zählen neben den bereits genannten Zytostatika<sup>(202)</sup>, u.a. Hormone<sup>(203)</sup> und Entzündungshemmer<sup>(204)</sup>. Die synthetisierten PLGAmTHPC-Nanopartikel zeichneten sich durch einen effizienten Wirkstofftransport in die zu untersuchenden Zellen aus und es konnten entsprechend hohe Konzentrationen an mTHPC in den Zellen detektiert werden. Das wichtigste Auszeichnungsmerkmal dieser Partikel war neben ihrer herausragenden Wirksamkeit (entsprechend dem freiem Wirkstoff) eine stark reduzierte Dunkeltoxizität. Eine Spezifizierung dieser Partikel war mit den zugrunde liegenden Antikörper Cetuximab nur von geringem Erfolg. Eine spätere applizierbare Formulierung könnte auch entsprechend ohne diese auskommen und sich über ein passives Targeting über den bereits beschriebenen EPR-Effekt in den malignen Geweben ansammeln. Diese Formulierung sollte allerdings einer weiteren Oberflächenmodifizierung mit hydrophilen Molekülen, wie z. B. PEG (Polyethylenglykol) unterzogen werden. Die Einführung von PEG oder ähnlichen Molekülen gewährleistet eine verlängerte Zirkulation von Nanopartikeln im Blutkreislauf, ohne dass diese von Bestandteilen des retikuloendothelialen Systems (RES) erkannt und beseitigt werden.

Die weiterhin untersuchten Albuminpartikelpräparate wiesen zum einen im Vergleich mit dem freien Arzneistoff eine reduzierte Dunkeltoxizität auf und zum anderen eine spezifische Anreicherung über die Einführung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab. Die Reduktion von Nebenwirkungen ist eines der Hauptziele bei der Entwicklung von neuen Formulierungen. Eines der bekanntesten Beispiele stellt Abraxane<sup>®</sup> dar. Die auf HSA basierende und Paclitaxel enthaltende nanopartikuläre Formulierung wurde 2005 von der FDA und drei Jahr später von der EMA für die Behandlung von metastasierenden und therapierefraktären Brustkrebs zugelassen. Die Nanopartikel mit einer mittleren Größe von 150 nm zeichneten sich durch eine gesteigerte Wasserlöslichkeit, reduzierte Nebenwirkungen und gesteigerte intratumoralen Arzneistoffkonzentration aus<sup>(64)</sup>. Obwohl der mTHPC-Transport in seiner Effektivität und daran gebundenen Wirksamkeit nicht mit dem von PLGA verglichen werden konnte, wurde ausgehend von diesen Partikeln eine Formulierung erstellt, die neben mTHPC auch den Antikörper Cetuximab tragen sollte (Vollpräparation). Die Freisetzung des mTHPC erfolgte zeitverzögert. Es konnten ausreichend hohe intrazelluläre Konzentrationen erreicht werden, um eine effektive Apoptose zu induzieren. Die Kombination von Oberflächenmodifizierung und Wirkstoffbeladung führte zur Generierung von spezifischen Trägersystemen, die den Arzneistoff in die ausgesuchten Zellen transportierten, dort entließen und nach Belichtung zum Tod der Zelle führten. Ausgehend von den erhaltenen Daten stellen Albuminpartikel einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Entwicklung von zielgerichteten Arzneistoffformulierungen dar. Modifizierte HSA-Nanopartikel konnten schon für den spezifischen

Transport von Doxorubicin in HER2-überexprimierende Mammakarzinomzellen entwickelt und deren Funktionalität evaluiert werden <sup>(37)</sup>. Darüber hinaus wurden Studien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke an Apolipoprotein E modifizierten Nanopartikeln durchgeführt. Hierbei konnten modifizierte Albuminpartikel *in vivo* in verschiedenen Hirnregionen detektiert werden, wobei die PEGylierten Kontrollpartikel zu dieser Überwindung nicht fähig waren und in den Endothelzellen zurückgehalten wurden <sup>(205)</sup>.

## 5           **Ausblick**

Der Einsatz von Nanopartikeln in Industrie und Forschung schreitet weiter voran. Heute werden nanopartikuläre Formulierungen in einer Vielzahl von Prozessen, aber auch in alltäglichen Produkten verwendet, um diese bzw. deren Eigenschaften zu optimieren. Der kontrovers betrachtete Einsatz von Nanotechnologie in der medizinischen Forschung umfasst vor allem die Diagnostik, aber auch die Therapie von malignen Erkrankungen. Nanopartikuläre Systeme werden hierbei unter anderem als Arzneistoff-Transporter verwendet, um eine Optimierung der Arzneistoffeigenschaften und deren gezielten Applikation in das entsprechende Gewebe zu erhalten. Dem Einsatz in der Medizin stehen jedoch eine Vielzahl von Tests und Analysen bevor. Neben den toxischen Einflüssen der Nanopartikel auf die Zellen muss die Aufnahme und Wirkstoffbereitstellung überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Verwendung von Nanopartikel als Trägersystem sowie deren spezifische Akkumulation in Zielzellen über Liganden demonstriert werden. Die einzelnen Systeme unterschieden sich hierbei in ihrer zellulären Bindung und Akkumulation, in der Wirkstoffbereitstellung und Wirksamkeit sowie einer spezifischen Akkumulation über die Bindung eines monoklonalen Antikörpers.

Für die jeweiligen Formulierungen ergaben sich hierbei Aspekte an die in weiteren Untersuchungen angeknüpft werden kann.

Gold-Nanopartikel weisen besondere einstellbare optische und elektronische Eigenschaften auf, die sie für eine breite Verwendung interessant machen. Die in dieser Arbeit getesteten Nanopartikel müssten noch in weiteren Studien in Hinblick auf Wirkstofftransport und Induktion von Apoptose untersucht werden. Hierfür müssten die Nanopartikel jedoch mit einer größeren Wirkstoffkonzentration beladen und in größeren Volumina synthetisiert werden.

Das effektivste Trägersystem wurde in mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikeln gefunden. Die Nanopartikel wiesen sich durch eine hohe intrazelluläre Wirkstofffreisetzung und Induktion von Apoptose aus. Daneben konnte das System zur Reduktion von dunkeltoxischen Effekten des freien Wirkstoffs beitragen. Eine weitere Modifizierung der Partikel mit Polyethylenglykol oder anderen hydrophilen Substanzen wäre in Zukunft denkbar. Die so entstehenden Formulierungen würden demnach über eine erhöhte Hydrophilizität verfügen, würden vermutlich lange im Blut zirkulieren und könnten über den EPR-Effekt im tumorösen Zielgewebe akkumulieren. Eine weitere Oberflächenmodifizierung könnte an diesen PEGylierten Partikeln durchgeführt werden. Es wäre denkbar, dass sich hierbei stärkere Unterschiede in der Akkumulation zeigen. Dies müsste jedoch in Folgeuntersuchungen evaluiert werden.

Das am intensivsten untersuchte System stellen Albuminpartikel dar. Für diese Formulierung konnten neben einem effektiven Wirkstofftransport auch eine Spezifizierung über Cetuximab demonstriert werden. Die finale Präparation verfügte zwar über eine spezifische Wirkung, diese könnte jedoch noch gesteigert werden. Die Ergebnisse suggerieren, dass der kovalent gebundene Photosensibilisator die Effektivität und Spezifität des verwendeten Antikörpers zum Teil blockiert. Daher wäre die Einbettung des Photosensibilisators in die Partikelmatrix denkbar. Somit würde sich nur noch der Antikörper auf der Oberfläche befinden und könnte vermehrt binden. Die Effektivität der Inkorporation und die daraus resultierende Wirkstofffreisetzung müssten in einem ersten Schritt bestimmt werden, bevor der Antikörper gebunden werden kann. Hierbei wäre zu klären, ob der Wirkstoff in ausreichender Konzentration eingebettet werden kann, ohne dass die Partikel ihre Eigenschaften verlieren.

Die erhaltenen Daten weisen auf die Funktionalität und ein breit gefächertes Einsatzgebiet der untersuchten Nanopartikel hin. Neben einem verbesserten Wirkstofftransport in die zu untersuchenden Zellen konnte eine spezifische Akkumulation über Zielproteine demonstriert werden. Die untersuchten nanopartikulären Formulierungen stellen interessante Systeme dar, deren Weiterentwicklung und *in vitro* Testung weiter vorangetrieben werden sollte. Durch jeweilige Optimierungen könnten Systeme entwickelt werden, bei denen eine *in vivo* Testung, nach entsprechend ausführlichen *in vitro* Untersuchungen, erwogen werden könnte.

## Literaturverzeichnis

1. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Sep;3(9):785-96.
2. Nano Frontiers. On the Horizon of Medicine and Healthcare. Woodrow Wilson Centre. 2007(Issue 1, May).
3. Schneeweiss S, Hasford J, Gottler M, Hoffmann A, Riethling AK, Avorn J. Admissions caused by adverse drug events to internal medicine and emergency departments in hospitals: a longitudinal population-based study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002 Jul;58(4):285-91.
4. Fahmy TM, Fong PM, Goyal A, Saltzman WM. Targeted for drug delivery. *Materials Today.* 2005 August(8):18-26.
5. Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology.* 2004 Dec 8;2(1):12.
6. Coester CJ, Langer K, van Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul.* 2000 Mar-Apr;17(2):187-93.
7. Langer K, Anhorn MG, Steinhauser I, Dreis S, Celebi D, Schrickel N, et al. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *Int J Pharm.* 2008 Jan 22;347(1-2):109-17.
8. Tiyaboonchai W. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal.* 2003;11(3):51-66.
9. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Jan 1;75(1):1-18.
10. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010 Apr 26;49(19):3280-94.
11. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1310-6.
12. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):133-49.
13. Borchard G, Kreuter J. The role of serum complement on the organ distribution of intravenously administered poly (methyl methacrylate) nanoparticles: effects of pre-coating with plasma and with serum complement. *Pharm Res.* 1996 Jul;13(7):1055-8.
14. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Sep 13;54(5):631-51.
15. Holmberg SB, Forssell-Aronsson E, Gretarsdottir J, Jacobsson L, Rippe B, Hafstrom L. Vascular clearance by the reticuloendothelial system--measurements using two different-sized albumin colloids. *Scand J Clin Lab Invest.* 1990 Dec;50(8):865-71.
16. Kaul G, Amiji M. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm Res.* 2002 Jul;19(7):1061-7.
17. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001 Jun;53(2):283-318.
18. Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Feb 24;55(3):403-19.
19. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001 Jan 29;70(1-2):1-20.
20. Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, Antropov AS, Kivman GY, Kreuter J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm Res.* 1999 Oct;16(10):1564-9.

21. Redhead HM, Davis SS, Illum L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Control Release*. 2001 Feb 23;70(3):353-63.
22. Tröster SD, Müller U, Kreuter J. Modification of the body distribution of poly (methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990;61(1-2):85-100.
23. Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci*. 1995 Apr;84(4):493-8.
24. Peracchia MT, Fattal E, Desmaele D, Besnard M, Noel JP, Gomis JM, et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release*. 1999 Jun 28;60(1):121-8.
25. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 March 18;63(3):136-51.
26. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986 Dec;46(12 Pt 1):6387-92.
27. Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000 Oct;11 Suppl 2:S81-91.
28. Mueller-Klieser W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Nov-Dec;36(2-3):123-39.
29. Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int Immunopharmacol*. 2003 Mar;3(3):319-28.
30. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007 Dec;2(12):751-60.
31. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008 May;69(1):1-9.
32. Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TN, Lavan DA, Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2004 Nov 1;64(21):7668-72.
33. Dubey PK, Mishra V, Jain S, Mahor S, Vyas SP. Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. *J Drug Target*. 2004 Jun;12(5):257-64.
34. Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(19):e149.
35. Quintana A, Raczka E, Piehler L, Lee I, Myc A, Majoros I, et al. Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm Res*. 2002 Sep;19(9):1310-6.
36. Bergey EJ, Levy L, Wang X, Krebs LJ, Lal M, Kim K-S, et al. DC Magnetic field induced magnetocytolysis of cancer cells targeted by LH-RH magnetic nanoparticles in vitro. *Biomed Microdevices*. 2002;4(4):293-99.
37. Anhorn MG, Wagner S, Kreuter J, Langer K, von Briesen H. Specific targeting of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin-loaded trastuzumab-modified human serum albumin nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2008 Dec;19(12):2321-31.
38. Dinauer N, Balthasar S, Weber C, Kreuter J, Langer K, von Briesen H. Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. *Biomaterials*. 2005 Oct;26(29):5898-906.
39. Wagner S, Rothweiler F, Anhorn MG, Sauer D, Riemann I, Weiss EC, et al. Enhanced drug targeting by attachment of an anti alpha v integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(8):2388-98.

40. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol.* 2005;23(9):1147-57.
41. Cirstoiu-Hapca A, Bossy-Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Delie F. Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin) and anti-CD20 (Mabthera) coupled nanoparticles. *Int J Pharm.* 2007 Mar 1;331(2):190-6.
42. Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Lange N, Bossy L, Gurny R, Delie F. Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles in the treatment of disseminated ovarian cancer: Therapeutic efficacy and biodistribution in mice. *J Control Release.* 2010 Jun 15;144(3):324-31.
43. Bhattacharyya S, Bhattacharya R, Curley S, McNiven MA, Mukherjee P. Nanoconjugation modulates the trafficking and mechanism of antibody induced receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 17;107(33):14541-6.
44. Cho YS, Yoon TJ, Jang ES, Soo Hong K, Young Lee S, Ran Kim O, et al. Cetuximab-conjugated magneto-fluorescent silica nanoparticles for in vivo colon cancer targeting and imaging. *Cancer Lett.* 2010 Dec 18;299(1):63-71.
45. Fuller SJ, Sivarajah K, Sugden PH. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 May;44(5):831-54.
46. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-6.
47. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jul;9(7):463-75.
48. Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull.* 1991 Jan;47(1):87-98.
49. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2001 Mar;8(1):3-9.
50. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2001 Sep;37 Suppl 4:S9-15.
51. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995 Jul;19(3):183-232.
52. Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, Stewart M, Katsaros D, Sismondi P, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *Br J Cancer.* 1996 Feb;73(3):301-6.
53. Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004 Jan;15(1):28-32.
54. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol.* 2005 Jan;16(1):102-8.
55. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control.* 2007 Jul;14(3):295-304.
56. Giuliani F, De Vita F, Colucci G, Pisconti S. Maintenance therapy in colon cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010 Nov;36 Suppl 3:S42-5.
57. O'Neil BH, Goldberg RM. Innovations in chemotherapy for metastatic colorectal cancer: an update of recent clinical trials. *Oncologist.* 2008 Oct;13(10):1074-83.
58. Wong SF. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clin Ther.* 2005 Jun;27(6):684-94.
59. Wu G, Yang W, Barth RF, Kawabata S, Swindall M, Bandyopadhyaya AK, et al. Molecular targeting and treatment of an epidermal growth factor receptor-positive glioma using boronated cetuximab. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1260-8.
60. Ng M, Cunningham D. Cetuximab (Erbix)--an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Int J Clin Pract.* 2004 Oct;58(10):970-6.

61. Perez-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5235-46.
62. Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog Neurobiol*. 2009 Feb;87(3):133-70.
63. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. 2008 [updated 2008; cited]; Available from.
64. Desai N, Trieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A, et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15;12(4):1317-24.
65. Haruta M. Gold as a Novel Catalyst in the 21st Century: Preparation, Working Mechanism and Applications. *Gold Bulletin*. 2004;37(1-2):27-36.
66. Edwards PP, Thomas JM. Gold in a metallic divided state--from Faraday to present-day nanoscience. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(29):5480-6.
67. Kim CK, Ghosh P, Pagliuca C, Zhu ZJ, Menichetti S, Rotello VM. Entrapment of hydrophobic drugs in nanoparticle monolayers with efficient release into cancer cells. *J Am Chem Soc*. 2009 Feb 4;131(4):1360-1.
68. Lee SH, Bae KH, Kim SH, Lee KR, Park TG. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *Int J Pharm*. 2008 Nov 19;364(1):94-101.
69. Cherukuri P, Glazer ES, Curley SA. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Mar 8;62(3):339-45.
70. Li J-J, Gu M. Gold-Nanoparticle-Enhanced Cancer Photothermal Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum electronics*. 2010 JULY/AUGUST;16(4):989-96.
71. Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett*. 2005 Apr;5(4):709-11.
72. Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*. 2009 Aug 17;5(16):1897-910.
73. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 2007 Nov;3(11):1941-9.
74. Leonov AP, Zheng J, Clogston JD, Stern ST, Patri AK, Wei A. Detoxification of gold nanorods by treatment with polystyrenesulfonate. *ACS Nano*. 2008 Dec 23;2(12):2481-8.
75. Wartlick H, Spankuch-Schmitt B, Strebhardt K, Kreuter J, Langer K. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J Control Release*. 2004 May 18;96(3):483-95.
76. Sinha VR, Khosla L. Bioabsorbable polymers for implantable therapeutic systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998 Dec;24(12):1129-38.
77. Muthu M. Nanoparticles based on PLGA and its copolymer: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2009 Octobre-December:266-73.
78. Ravi Kumar MNV, Bakowsky U, Lehr C-M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*. 2004;25:1771-7.
79. Visscher GE, Pearson JE, Fong JW, Argentieri GJ, Robison RL, Maulding HV. Effect of particle size on the in vitro and in vivo degradation rates of poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Mater Res*. 1988 Aug;22(8):733-46.
80. Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*. 1972 Dec 2;2(7788):1175-7.
81. Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguín N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology*, 2005. *J Am Acad Dermatol*. 2007 Jan;56(1):125-43.

82. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004 Aug;5(8):497-508.
83. D'Cruz AK, Robinson MH, Biel MA. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck.* 2004 Mar;26(3):232-40.
84. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist.* 2006 Oct;11(9):1034-44.
85. Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Oct;3(10):907-17.
86. O'Riordan K, Akilov O, Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2005;2:247-62.
87. Tang HM, Hamblin MR, Yow CM. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother.* 2007 Apr;13(2):87-91.
88. Augustin AJ, Scholl S, Kirchhof J. Treatment of neovascular age-related macular degeneration: Current therapies. *Clin Ophthalmol.* 2009;3:175-82.
89. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2010 Jun;26(3):118-32.
90. Qiao J, Li R, Ding Y, Fang H. Photodynamic therapy in the treatment of superficial mycoses: an evidence-based evaluation. *Mycopathologia.* 2010 Nov;170(5):339-43.
91. Funke B, Jungel A, Schastak S, Wiedemeyer K, Emmrich F, Sack U. Transdermal photodynamic therapy--a treatment option for rheumatic destruction of small joints? *Lasers Surg Med.* 2006 Oct;38(9):866-74.
92. Wolf P. Photodynamische Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 1999 4. Juni;96(22):1493-8.
93. Kick G, Messer G, Plewig G. Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie. *Hautarzt.* 1996;47:644-9.
94. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Mar 17;85(6):443-56.
95. Dougherty TJ, Marcus SL. Photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 1992;28A(10):1734-42.
96. Lou PJ, Jager HR, Jones L, Theodossy T, Bown SG, Hopper C. Interstitial photodynamic therapy as salvage treatment for recurrent head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2004 Aug 2;91(3):441-6.
97. Maberley D. Photodynamic therapy and intravitreal triamcinolone for neovascular age-related macular degeneration: a randomized clinical trial. *Ophthalmology.* 2009 Nov;116(11):2149-57 e1.
98. [http://litepharm.co.kr/default/eng/teck\\_03/teck\\_03.php](http://litepharm.co.kr/default/eng/teck_03/teck_03.php). [cited]; Available from.
99. Mahmood U, Weissleder R. Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003 May;2(5):489-96.
100. Ris HB, Altermatt HJ, Inderbitzi R, Hess R, Nachbur B, Stewart JC, et al. Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results. *Br J Cancer.* 1991 Dec;64(6):1116-20.
101. Maisch T. Photodynamische Inaktivierung von Bakterien. *BIOspektrum.* 2007;13:751-3.
102. Sobolev AS, Jans DA, Rosenkranz AA. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Prog Biophys Mol Biol.* 2000;73(1):51-90.
103. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jun 17;90(12):889-905.
104. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.* 1990;6:343-7.

105. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20313-6.
106. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997 May 15;324 ( Pt 1):1-18.
107. Sakharov DV, Bunschoten A, van Weelden H, Wirtz KW. Photodynamic treatment and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress result in different patterns of cellular protein oxidation. *Eur J Biochem.* 2003 Dec;270(24):4859-65.
108. Sies H, Menck CF. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res.* 1992 Sep;275(3-6):367-75.
109. Macdonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles on photodynamic therapy. *J Porphyrins and Phthalocyanines.* 2001;5:105-29.
110. Roberts WG, Liaw LH, Berns MW. In vitro photosensitization II. An electron microscopy study of cellular destruction with mono-L-aspartyl chlorin e6 and photofrin II. *Lasers Surg Med.* 1989;9(2):102-8.
111. Teiten MH, Bezdetnaya L, Morliere P, Santus R, Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer.* 2003 Jan 13;88(1):146-52.
112. Yan YJ, Zheng MZ, Chen ZL, Yu XH, Yang XX, Ding ZL, et al. Studies on preparation and photodynamic mechanism of chlorin P6-13,15-N-(cyclohexyl)cycloimide (Chlorin-H) and its antitumor effect for photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem.* 2010 Sep 1;18(17):6282-91.
113. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Aug;3(8):721-9.
114. Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B.* 1998 Feb;42(2):89-95.
115. Geze M, Morliere P, Maziere JC, Smith KM, Santus R. Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. *J Photochem Photobiol B.* 1993 Sep;20(1):23-35.
116. Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Feb;39(1):85-9.
117. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002 Jan;1(1):1-21.
118. Dougherty TJ. Photosensitization of malignant tumors. *Semin Surg Oncol.* 1986;2(1):24-37.
119. Harada M, Woodhams J, MacRobert AJ, Feneley MR, Kato H, Bown SG. The vascular response to photodynamic therapy with ATX-S10Na(II) in the normal rat colon. *J Photochem Photobiol B.* 2005 Jun 1;79(3):223-30.
120. Saito A, Nagaot T, Minamitanit H, T. I, Yamamoto T, Aizawatt K. Vascular shut down effect on the microcirculation in photodynamic therapy using zinc coproporphyrin. *Proceedings - 19th International Conference - IEEE/EMBS Oct 30 - Nov 2, 1997 Chicago, IL USA.* 1997:2294-5.
121. Arits AH, van de Weert MM, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. Pain during topical photodynamic therapy: uncomfortable and unpredictable. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010 Dec;24(12):1452-7.
122. Hunger RE, Kernland Lang K, Braathen LR. *Photodynamische Therapie (PDT). Tumoren der Haut Georg Thieme Verlag KG;* 2010. p. 159-64.
123. Triesscheijn M, Ruevekamp M, Out R, Van Berkel TJ, Schellens J, Baas P, et al. The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin in mice and men. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007 Jun;60(1):113-22.
124. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004;1:27-42.

125. Berenbaum MC, Akande SL, Bonnett R, Kaur H, Ioannou S, White RD, et al. meso-Tetra(hydroxyphenyl)porphyrins, a new class of potent tumour photosensitisers with favourable selectivity. *Br J Cancer*. 1986 Nov;54(5):717-25.
126. Hopper C, Niziol C, Sidhu M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol*. 2004 Apr;40(4):372-82.
127. Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J*. 1989 Jul 1;261(1):277-80.
128. Ma L, Moan J, Berg K. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: a comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. *Int J Cancer*. 1994 Jun 15;57(6):883-8.
129. Yan F, Kopelman R. The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties. *Photochem Photobiol*. 2003 Dec;78(6):587-91.
130. Kostron H, Fiegele T, Akatuna E. Combination of FOSCANs mediated fluorescence guided resection and photodynamic treatment as new therapeutic concept for malignant brain tumors. *Medical Laser Application*. 2006 Nov 15;21(4):285-90.
131. Marchal S, Francois A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetnaya L. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer*. 2007 Mar 26;96(6):944-51.
132. Melnikova VO, Bezdetnaya LN, Bour C, Festor E, Gramain MP, Merlin JL, et al. Subcellular localization of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Apr;49(2-3):96-103.
133. Teiten MH, Marchal S, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem Photobiol*. 2003 Jul;78(1):9-14.
134. Andrejevic-Blant S, Hadjur C, Ballini JP, Wagnieres G, Fontollet C, van den Bergh H, et al. Photodynamic therapy of early squamous cell carcinoma with tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin: optimal drug-light interval. *Br J Cancer*. 1997;76(8):1021-8.
135. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Dec 14;60(15):1627-37.
136. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002 Mar;66(2):89-106.
137. Jori G, Reddi E, Cozzani I, Tomio L. Controlled targeting of different subcellular sites by porphyrins in tumour-bearing mice. *Br J Cancer*. 1986 May;53(5):615-21.
138. Konan YN, Berton M, Gurny R, Allemann E. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*. 2003 Mar;18(3-4):241-9.
139. Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, Ishikawa M, Baba Y. Quantum dots as photosensitizers? *Nat Biotechnol*. 2004 Nov;22(11):1360-1.
140. Zhang P, Steelant W, Kumar M, Scholfield M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J Am Chem Soc*. 2007 Apr 18;129(15):4526-7.
141. Kiesslich T, Berlanda J, Plaetzer K, Krammer B, Berr F. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan- and Foslip-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. *Photochem Photobiol Sci*. 2007 Jun;6(6):619-27.
142. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particles size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*. 1973;241:20-2.

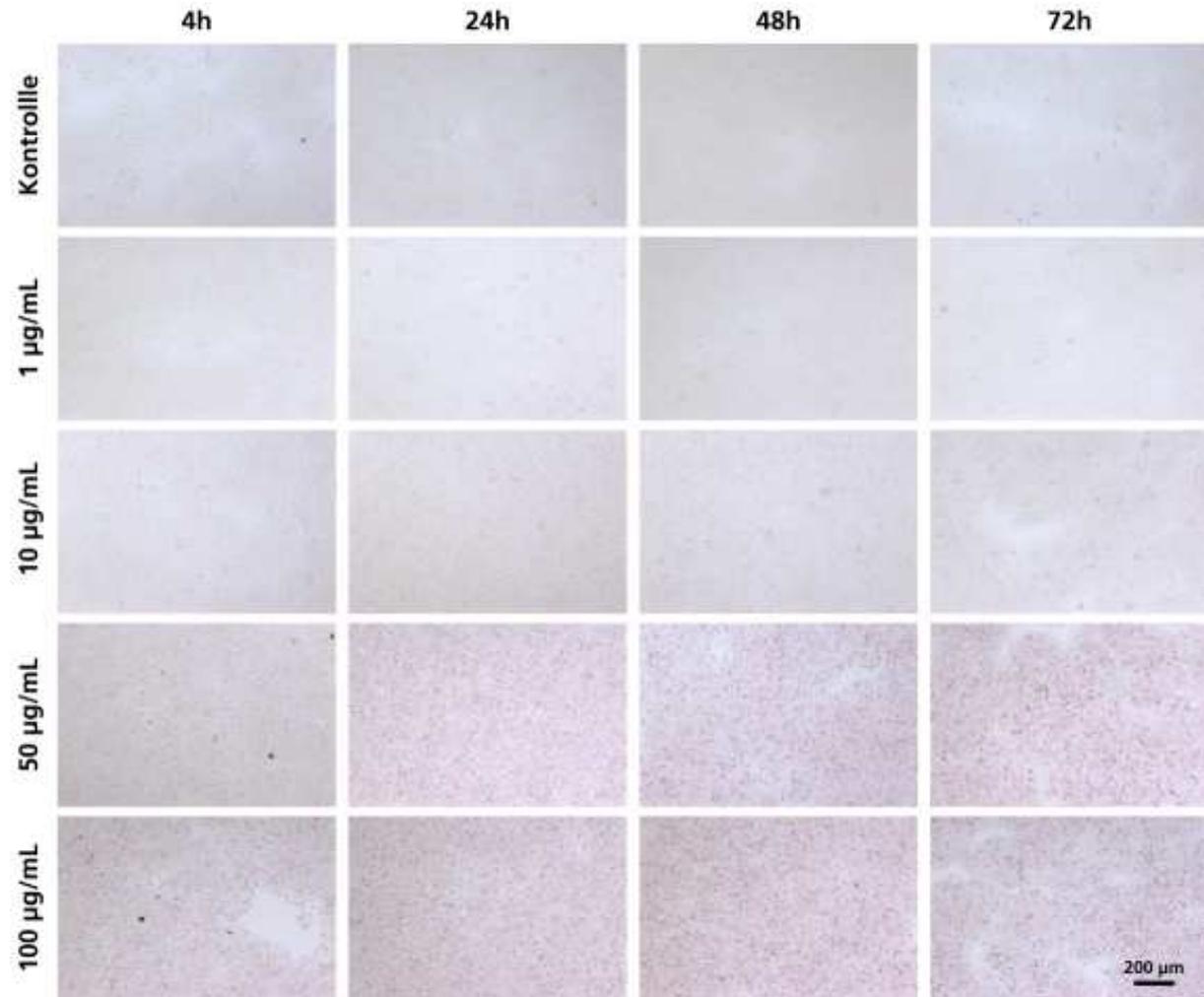
143. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. 1951(11):55-75.
144. Schneider G, Decher G. From Functional Core/Shell Nanoparticles Prepared via Layer-by-Layer Deposition to Empty Nanospheres. *NANO LETTERS*. 2004;4(10):1833-9.
145. Chanana M, Gliozzi A, Diaspro A, Chodnevskaja I, Huewel S, Moskalenko V, et al. Interaction of polyelectrolytes and their composites with living cells. *Nano Lett*. 2005 Dec;5(12):2605-12.
146. Reum N, Fink-Straube C, Klein T, Hartmann RW, Lehr CM, Schneider M. Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates. *Langmuir*. 2010 Nov 16;26(22):16901-8.
147. Langer K, Balthasar S, Vogel V, Dinauer N, von Briesen H, Schubert D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*. 2003 May 12;257(1-2):169-80.
148. Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm*. 2000 Jan 20;194(1):91-102.
149. Weber C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *Int J Pharm*. 2000 Mar 10;196(2):197-200.
150. Steinhäuser I, Spankuch B, Strebhardt K, Langer K. Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(28):4975-83.
151. Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MN. Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharm Res*. 2006 Jan;23(1):184-95.
152. Farrer RA, Butterfield FL, Chen VW, Fourkas JT. Highly efficient multiphoton-absorption-induced luminescence from gold nanoparticles. *Nano Lett*. 2005 Jun;5(6):1139-42.
153. Schneider M, Reum N, Lehr C-M. Modular nanoscale systems for drug delivery and the investigation of cellular uptake mechanism - Characterisation of nanoparticles. *Bulletin Technique Gattefossé* 2008;101:25-30.
154. LSM 510 NLO and LS 510 Meta NLO. Fa Zeiss.Handbuch.
155. APOPercentage™ Apoptosis Assay. Fa Biocolor.Handbuch.
156. De M, Ghosh PS, Rotello VM. Applications of Nanoparticles in Biology. *Advanced Materials*. 2008;20(22):4225-41.
157. Leary JF. Nanotechnology: what is it and why is small so big? *Can J Ophthalmol*. 2010 Oct;45(5):449-56.
158. Raffa V, Vittorio O, Riggio C, Cuschieri A. Progress in nanotechnology for healthcare. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2010 Jun;19(3):127-35.
159. Schulze C, Kroll A, Lehr CM, Schäfer U, Becker K, Schnekenburger J, et al. Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*. 2008 June 2(2):51-61.
160. Lee JM, Edwards HHL, Pereira CA, Samii SI. Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). *Journal of material science: materials in medicine* 1996;7:531-41.
161. Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Dec;18(6):565-71.
162. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005 Jul;113(7):823-39.
163. Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*. 2007 March;1(1):2-25.
164. Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Yung LY. Gold Nanoparticles Induce Oxidative Damage in Lung Fibroblasts In Vitro. *Adv Mater* 2008;20(1):138-42.

165. Ignatius AA, Claes LE. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 1996 Apr;17(8):831-9.
166. Xu P, Gullotti E, Tong L, Highley CB, Errabelli DR, Hasan T, et al. Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited. *Mol Pharm*. 2009 Jan-Feb;6(1):190-201.
167. Teiten MH, Bezdetnaya L, Merlin JL, Bour-Dill C, Pauly ME, Dicato M, et al. Effect of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-mediated photodynamic therapy on sensitive and multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Photochem Photobiol B*. 2001 Sep 15;62(3):146-52.
168. Sasnouski S, Pic E, Dumas D, Zorin V, D'Hallewin MA, Guillemin F, et al. Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells. *Radiat Res*. 2007 Aug;168(2):209-17.
169. Friberg EG, Cunderlikova B, Pettersen EO, Moan J. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett*. 2003 May 30;195(1):73-80.
170. Sasnouski S, Zorin V, Khludeyev I, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Oct 10;1725(3):394-402.
171. Hackbarth S, Ermilov EA, Röder B. Interaction of Pheophorbide a molecules covalently linked to DAB dendrimers. *Optics Communications*. 2005;248:295-306.
172. Rello S, Stockert JC, Moreno V, Gamez A, Pacheco M, Juarranz A, et al. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis*. 2005 Jan;10(1):201-8.
173. Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A Comparison of Liposomal Formulations of Doxorubicin with Drug Administered in Free Form. *Drug Safety*. 2001;24(12):903-20.
174. Bourdon O, Laville I, Carrez D, Croisy A, Fedel P, Kasselouri A, et al. Biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin incorporated into surface-modified nanocapsules in tumor-bearing mice. *Photochem Photobiol Sci*. 2002 Sep;1(9):709-14.
175. Bourre L, Rousset N, Thibaut S, Eleouet S, Lajat Y, Patrice T. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. *Apoptosis*. 2002 Jun;7(3):221-30.
176. Leung WN, Sun X, Mak NK, Yow CM. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem Photobiol*. 2002 Apr;75(4):406-11.
177. Yow CM, Chen JY, Mak NK, Cheung NH, Leung AW. Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett*. 2000 Sep 1;157(2):123-31.
178. Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2010 Sep 2;100(3):173-80.
179. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*. 1997 Jan-Feb;25(1):82-8.
180. De Geest BG, Déjugnat C, Sukhorukov GB, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J. Self-Rupturing Microcapsules. *Advanced Materials*. 2005;17:2357-61.
181. De Geest BG, Dejugnat C, Verhoeven E, Sukhorukov GB, Jonas AM, Plain J, et al. Layer-by-layer coating of degradable microgels for pulsed drug delivery. *J Control Release*. 2006 Nov 28;116(2):159-69.
182. Kliche K-O, Clement JH, Höffken K. Apoptose. *Onkologe: Springer-Verlag*; 1999. p. 891-7.
183. Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jul 9;236(1):1-9.

184. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Frasch SC, Nakamura T, et al. Polyamine regulation of plasma membrane phospholipid flip-flop during apoptosis. *J Biol Chem*. 1999 Oct 1;274(40):28113-20.
185. Leist M, Kohnle S, Single B, Nicotera P. Differentiation Between Apoptotic and Necrotic Cell Death by Means of the BM Cell Death Detection ELISA or Annexin V Staining. *Biochemica*. 1998;2:25-8.
186. Kessel D, Luo Y, Deng Y, Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1997 Mar;65(3):422-6.
187. Jeggo PA. DNA repair: PARP - another guardian angel? *Curr Biol*. 1998 Jan 15;8(2):R49-51.
188. Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol*. 2005 Apr 15;69(8):1167-76.
189. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):C1109-23.
190. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology*. 1999 May-Jun;67(3):148-57.
191. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol*. 2004 Dec 1;22(23):4772-8.
192. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2005 May;6(5):279-86.
193. Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1897-905.
194. Bonner JA, Buchsbaum DJ, Russo SM, Fiveash JB, Trummell HQ, Curiel DT, et al. Anti-EGFR-mediated radiosensitization as a result of augmented EGFR expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(2 Suppl):2-10.
195. Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene*. 1998 Aug 27;17(8):999-1007.
196. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schafer U, Takeuchi H, Maincent P, et al. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Nov;299(2):775-81.
197. Patra CR, Bhattacharya R, Wang E, Katarya A, Lau JS, Dutta S, et al. Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. *Cancer Res*. 2008 Mar 15;68(6):1970-8.
198. Cheng Y, A CS, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B, Burda C. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *J Am Chem Soc*. 2008 Aug 13;130(32):10643-7.
199. Wieder ME, Hone DC, Cook MJ, Handsley MM, Gavrilovic J, Russell DA. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a 'Trojan horse'. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Aug;5(8):727-34.
200. Di Toro R, Betti V, Spampinato S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers. *Eur J Pharm Sci*. 2004 Feb;21(2-3):161-9.
201. Mu L, Feng SS. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J Control Release*. 2003 Jan 9;86(1):33-48.

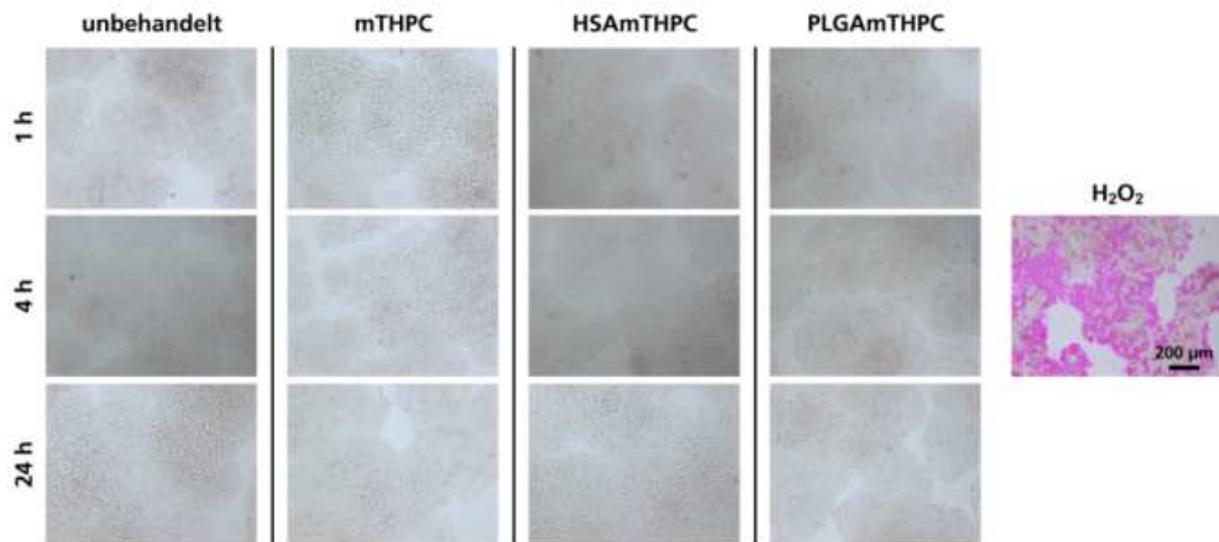
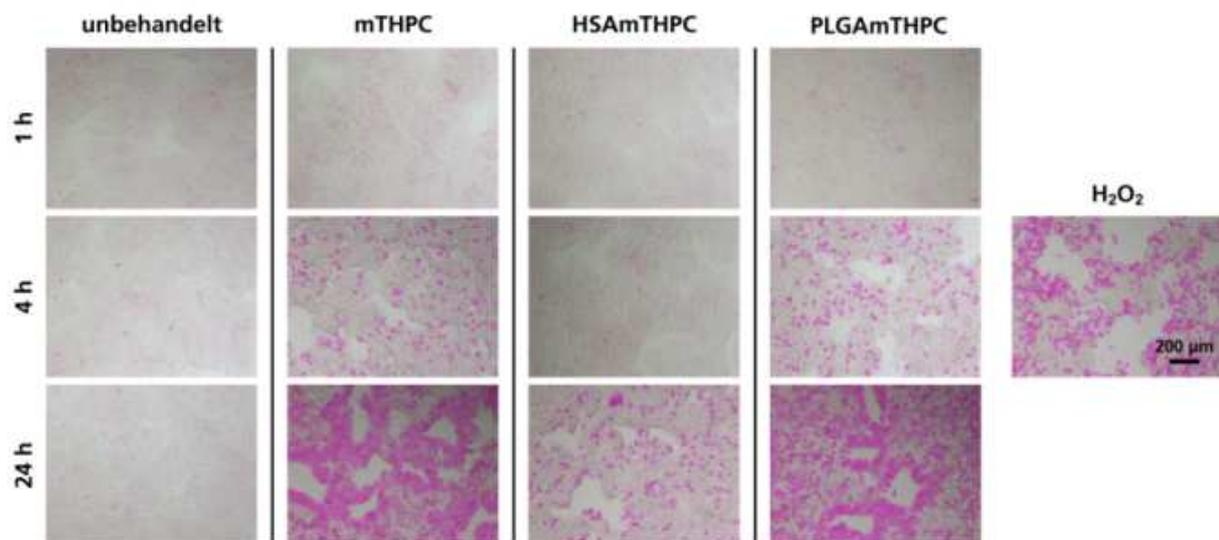
202. Esmaeili F, Ghahremani MH, Ostad SN, Atyabi F, Seyedabadi M, Malekshahi MR, et al. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J Drug Target*. 2008 Jun;16(5):415-23.
203. Sahana DK, Mittal G, Bhardwaj V, Kumar MN. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *J Pharm Sci*. 2008 Apr;97(4):1530-42.
204. Gomez-Gaete C, Fattal E, Silva L, Besnard M, Tsapis N. Dexamethasone acetate encapsulation into Trojan particles. *J Control Release*. 2008 May 22;128(1):41-9.
205. Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Wagner S, et al. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J Control Release*. 2009 Jul 1;137(1):78-86.

## Anhang



**Abb. A 1: Zeit- und Konzentrations-abhängige zelluläre Anreicherung von Gold-Nanopartikeln in HT29-Zellen.**

HT29-Zellen wurden mit ansteigenden Gold-Nanopartikel-Konzentrationen (AuNP; 1-100 µg/ml) für 4 bis 72 h inkubiert. Anschließend wurde von den Zellen Hellfeld-Aufnahmen aufgenommen. Akkumulierte Gold-Nanopartikel erscheinen rot. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle.

**A. Dunkelkontrolle****B. Illuminiert**

**Abb. A 2: Nachweis von Apoptoseinduktion durch freies und nanopartikelgebundenes mTHPC mit und ohne Illuminierung.**

Zum Nachweis von Apoptoseinduktion sind HT29-Zellen mit 1 µg/ml freiem mTHPC, sowie mTHPC-beladenen Nanopartikeln (HSA und PLGA, 1 µg/ml mTHPC-Konzentration) für 1, 4 und 24 h inkubiert, ein Teil der Platten illuminiert (652 nm, 5 J/cm<sup>2</sup>) und anschließend für 30 min mit der APOPercentage Reagenz (rot) behandelt worden. Hellfeldaufnahmen von HT29 Zellen nach PDT-Behandlung. Unbehandelte Zellen dienen als Negativkontrolle und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte Zellen (2,5 mM) als Positivkontrolle. (A) Dunkelkontrolle: Behandelte Zellen ohne Beleuchtung. (B) Behandelte und illuminierte Zellen.

## Publikationen

**Löw, K.**, Wacker, M., Wagner, S., Langer, K., von Briesen, H., Targeted human serum albumin nanoparticles for specific uptake in EGFR expressing colon carcinoma cells. Nanomedicine (2010) accepted.

**Löw, K.**, Knobloch, T., Wagner, S., Wiehe, A., Engel, A., Langer, K., von Briesen, H., Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free mTHPC and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells. Nanotechnology (2011) accepted.

**Löw, K.**, Reum, N., Wagner, S., von Briesen, H., Schneider M., Gold nanoparticles as drug delivery systems for photodynamic therapy: Preparation, characterisation and cellular investigations (2011) in Vorbereitung.

Zheng, S., **Löw, K.**, Wagner, S., Yang, X., von Briesen, H., Zou, S., Cytotoxicity of Triptolide and Triptolide loaded polymeric micelles in Vitro (2010) in Vorbereitung.

Zheng, S.-Z., **Löw, K.**, Wacker, M., Wiehe, A., Wagner, S., Langer, K., von Briesen, H., Zou, S.-Q., Interaction and cytotoxicity of mTHPC and mTHPC complexes in Jurkat cells. Chin. J. Exp. Surg. 27 (2010) 84-87.

## Poster

**Löw, K.**, Reum, N., Wagner, S., Schneider, M., von Briesen, H., Cytotoxicity and cellular accumulation of gold nanoparticles in human colon carcinoma cells. GOLD 2009 the 5th international conference on gold science, technology and its applications, Heidelberg (Germany), July 2009.

**Löw, K.**, Wacker, M., Wagner, S., Langer, K., von Briesen, H., Accumulation of targeted HSA-nanoparticles in different colon carcinoma cell lines using EGFR-expression. 7th PBP World Meeting, Valetta (Malta), März 2010.

**Löw, K.**, Knobloch, T., Wagner, S., Wiehe, A., Langer, K., von Briesen, H., Cytotoxicity and intracellular accumulation of mTHPC and mTHPC-loaded PLGA-nanoparticles in colon carcinoma cells. 8th International Symposium on PDT and PDD in Clinical Practice, Brixen (Italien), Oktober 2010.

Reum, N., **Löw, K.**, von Briesen, H., Lehr, C.-M., Schneider, M., From gold nanoparticles to drug delivery systems of modular architecture. 7th Conference and workshop on Biological barriers and Nanomedicine-Advanced Drug Delivery and Predictive non vivo Testing Technologies, University of Saarland (Germany), Februar 2008.

Reum, N., **Löw, K.**, von Briesen, H., Wiehe, A., Lehr, C.-M., Schneider, M., Nanocarrier based on Polyelectrolyte Multilayers for Photodynamic Therapy. 35th Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition, Hilton New York (USA), Juli 2008.

Reum, N., **Löw, K.**, von Briesen, H., Wiehe, A., Lehr, C.-M., Schneider, M., Nanocarrier based on Polyelectrolyte Multilayers for Photodynamic Therapy. 7th Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN), University of Leuven (Belgium), September 2008.

Reum, N., **Löw, K.**, von Briesen, H., Wiehe, A., Lehr, C.-M., Schneider, M., Nanocarrier based on Polyelectrolyte Multilayers for Photodynamic Therapy. 8th Conference and workshop on Biological barriers and Nanomedicine-Advanced Drug Delivery and Predictive non vivo Testing Technologies, University of Saarland (Germany), Februar 2010.

Reum, N., Fink-Straube, C., **Löw, K.**, von Briesen, H., Lehr, C.-M., Schneider, M., Multilayer Coating of Gold Nanoparticle with Drug-Polymer Coadsorbate. 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Convention Center, Portland, Oregon, (USA), July 2010.

### **Patente**

Patent BJA485A: Langer, K., Wacker, M., Röder, B., Preuss, A., Albrecht, V., Gräfe, S., Wiehe, A., von Briesen, H., **Löw, K.**, and Wagner, S. "Nanoparticle Carrier Systems based on Human Serum Albumin for Photodynamic Therapy (Provisional Application)

Patent BJA486A: Langer, K., Knobloch, T., Röder, B., Preuß, A., Albrecht, V., Gräfe, S., Wiehe, A., von Briesen, H., **Löw, K.**, and Wagner, S. "Nanoparticle Carrier Systems based on Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) for Photodynamic Therapy (PDT) (Provisional Application)

## Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. G. Fuhr, für die Möglichkeit diese Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. C.-M. Lehr, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Koreferat zu übernehmen und diese Arbeit zu begutachten.

Herrn Prof. Dr. H. von Briesen, für die Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Projektpartnern des BMBF-Projektes Nanocancer: Herrn Prof. Dr. K. Langer (Westfälische Wilhelms Universität Münster), Herrn Dr. M. Wacker und Herrn T. Knobloch (Goethe-Universität Frankfurt) für die Bereitstellung der polymerbasierten Nanopartikel und die regen Diskussionen. Herrn Prof. Dr. M. Schneider und Herrn N. Reum (Universität des Saarlandes) für die Bereitstellung der Gold-Nanopartikeln und die interessanten Untersuchungen. Herrn Dr. A. Wiehe (Biolitec AG, Jena) für die Synthese und Bereitstellung des Photosensibilisators mTHPC. Frau PD Dr. K. David (Indivumed, Hamburg) für die Bereitstellung der HT29-Zellen. All den genannten Personen möchte ich für die gute Kooperation danken.

Allen Mitgliedern der Abteilung Zellbiologie & Angewandte Virologie für die freundliche Aufnahme, das gute Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank gilt Frau J. Bungert für die Anfertigung der Kryoschnitte.

Zudem bei allen, die diese Arbeit gegengelesen haben: Frau M. Löw, Frau Dr. S. Wagner, Herr Dr. D. Lermen, Herr S. Wien und Herr M. Schnubel.

Herrn R. Lilischkis (Fachhochschule Kaiserslautern, Standort Zweibrücken) und Frau Dr. A. Katsen-Globa für die Unterstützung und die Anfertigung der Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen.

Daneben auch bei Herrn M. Gepp für die Unterstützung bei der Durchführung der Time-Laps-Aufnahmen.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich herzlich für die ständige Unterstützung während meines Studiums. Und Herrn M. Kiefer danke ich für den liebevollen Beistand und die tatkräftige Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Erklärung

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, Mai 2011

.....

(Karin Löw)