

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Entwicklung neuer präklinischer Testsysteme für das Dünndarmkarzinom

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der
Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2021

vorgelegt von: Linda Elberskirch

geboren am: 08.09.1987 in Ludwigshafen am Rhein

Tag des Kolloquiums: 02. Dezember 2021
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Dissertationsgutachter: Prof. Dr. phil. nat. Hagen von Briesen
Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT in der Abteilung Bioprozesse & Bioanalytik durchgeführt.

*Es ist besser, ein einziges kleines Licht anzuzünden,
als die Dunkelheit zu verfluchen.*

Konfuzius, 551 v. Chr. bis 479 v. Chr.

Chinesischer Philosoph

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung neuer Arzneistoffe	1
1.2 Der Aufbau des Dünndarms und Dünndarmkarzinome	3
1.3 Die photodynamische Therapie	10
1.4 Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme	16
1.5 Präklinische Testsysteme	21
2 Ziele der Arbeit	28
3 Material und Methoden	30
3.1 Materialien	30
3.1.1 Geräte	30
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Gebrauchsgegenstände	32
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	33
3.1.4 Analysesoftware	35
3.1.5 Zelllinien	35
3.1.6 Zellkulturmedien	36
3.1.7 Lösungen	36
3.2 Methoden	37
3.2.1 Analytische Methode: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	37
3.2.2 Zellkultur	47
3.2.3 Generierung und Charakterisierung von 3D-Tumorsphäroiden	48
3.2.4 Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme	49
3.2.5 Untersuchung der biologischen Wirksamkeit	54
3.2.6 Spezifische biologische Testsysteme	58
3.2.7 Statistische Auswertung der Untersuchungen	70
4 Ergebnisse	73
4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	73
4.1.1 Beurteilung der Messwertreihe	74
4.1.2 Richtigkeit (Accuracy)	75
4.1.3 Präzision (Precision)	76

4.1.4	Detektions- und Quantifizierungslimit (Detection and Quantitation Limit)	77
4.1.5	Linearität (Linearity)	78
4.1.6	Robustheit (Robustness)	79
4.1.7	Spezifität (Specificity)	79
4.2	Entwicklung mukoadhäsiver und mukopermeabler Nanopartikel	81
4.2.1	Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel	86
4.2.2	Untersuchung der Verkapselungseffizienz und Ladungskapazität	87
4.3	Untersuchung der biologischen Wirksamkeit	88
4.3.1	Untersuchung des Photosensibilisators mTHPC	90
4.3.2	Untersuchung neu synthetisierter Photosensibilisatoren	99
4.3.3	Untersuchung von nanopartikulären Formulierungen	101
4.3.4	Finale Formulierungen	108
4.4	Untersuchungen mit spezifischen präklinischen Testsystemen	115
4.4.1	Mikrofluidisches Mukusbarriere-Modell	116
4.4.2	Mikrofluidisches Darmtumor-Modell	128
4.4.3	Vaskularisiertes Tumorsphäroid-Modell	137
5	Diskussion	149
5.1	Validierung analytischer Methoden	149
5.2	Oberflächenmodifizierung und physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel	151
5.3	Screening-Modelle	156
5.4	Spezifische präklinische Testsysteme	162
5.4.1	Mikrofluidisches Mukusbarriere-Modell	163
5.4.2	Mikrofluidisches Darmtumor-Modell	167
5.4.3	Vaskularisiertes Tumorsphäroid-Modell	169
6	Ausblick	174
7	Anhang	176
7.1	Abbildungsverzeichnis	176
7.2	Tabellenverzeichnis	179
7.3	Formelverzeichnis	180
7.4	Statistische Tabellen	181
7.5	Literaturverzeichnis	183

Zusammenfassung

Die Diagnose Dünndarmkarzinom wird meist von einer schlechten Prognose begleitet, da bereits etwa 59 % der Patienten Metastasen im Körper gebildet haben. Die Behandlung erfolgt in diesen Fällen meist nur palliativ, durch den Einsatz von chirurgischer Resektion in Kombination mit einer Chemotherapie. Zur Erhöhung der Heilungschancen des Patienten, werden dringend neue Therapieformen benötigt. Eine Möglichkeit ist der Einsatz der photodynamischen Therapie bei der ein photoaktivierbarer Arzneistoff (Photosensibilisator) in Kombination mit Licht einer spezifischen Wellenlänge zur Behandlung von Krebszellen eingesetzt wird. Photosensibilisatoren haben im allgemeinen meist stark hydrophobe Eigenschaften, die zu einer schlechten Bioverfügbarkeit führen. Zum Transport des Photosensibilisators zum Wirkort wurden daher unterschiedliche nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme auf Basis von Polymilch-co-glykolsäure (PLGA) und Liposomen entwickelt. Diese wurden zunächst mit standardisierten In-vitro-Testsystemen unter Verwendung von 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden auf ihre Wirksamkeit und auf unerwünschte toxische Effekte untersucht. Zudem ist die Akkumulation des Photosensibilisators in den Zellen ein wichtiger Faktor, da diese ausschlaggebend für eine effektive anti-tumorale Wirksamkeit ist. Um diese zu quantifizieren, wurde eine analytische HPLC-Methode entwickelt und nach den Angaben der ICH-Guideline validiert. Im nächsten Schritt lag der Fokus der Untersuchungen darauf, die mukoadhäsiven und mukopermeablen Eigenschaften der zu entwickelnden Arzneistoffträgersysteme zu testen. Diese sind nötig, um ein gezieltes Tumor-Targeting zu erreichen. Zur Untersuchung dieser spezifischen Eigenschaften wurden neue präklinische Testmodelle entwickelt: (i) Ein mikrofluidischer Mukus-Chip zur Untersuchung der Mukopermeation; (ii) ein mikrofluidisches Darmtumor-Modell zur Erforschung der mukoadhäsiven Eigenschaften in einem peristaltischen Fluss und (iii) ein vaskularisiertes Darmtumor-Modell zur Überprüfung der Arzneistoff-Akkumulation und der biologischen Wirksamkeit. Anhand dieser Testsysteme war es möglich, wirksame Photosensibilisatoren und deren nanopartikuläre Formulierungen zu identifizieren, die ein hohes Potential zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen aufweisen. Zudem stellen die entwickelten spezifischen präklinischen Testmodelle ein hilfreiches Werkzeug zur Untersuchung der Eigenschaften von Nanopartikeln in dynamischen fluidischen Systemen dar.

Summary

The diagnosis of small intestine carcinoma is usually followed by a poor prognosis as about 59 % of patients have already developed metastases in the body. In these cases, treatment is usually palliative, using surgical resection in combination with chemotherapy. To increase the patient's chances of recovery, new therapies are needed. One option is the use of photodynamic therapy in which a photoactivatable drug (photosensitizer) is used in combination with light of a specific wavelength to treat cancer cells. In general, photosensitizers have highly hydrophobic properties which lead to poor bioavailability. Therefore different nanoparticulate drug delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and liposomes were developed to transport the photosensitizer to the site of action. The efficacy and undesired toxic effects of these were first investigated with standardized in vitro test systems using 2D monolayer cell cultures and 3D tumor spheroids. In addition, the accumulation of the photosensitizer in the cells is an important factor, as it is decisive for effective anti-tumoral efficacy. To quantify this an analytical HPLC method was developed and validated according to the ICH guideline. In the next step the focus of the investigations was on testing the mucoadhesive and mucopermeable properties of the drug delivery systems to be developed. These are necessary to achieve targeted tumor targeting. New preclinical test models were developed to investigate these specific properties: (i) a microfluidic mucus chip to study mucopermeation; (ii) a microfluidic intestinal tumor model to study mucoadhesive properties in a peristaltic flow; and (iii) a vascularized intestinal tumor model to test drug accumulation and biological efficacy. With these test systems it was possible to identify effective photosensitizers and their nanoparticulate formulations with a high potential for the treatment of small intestine carcinoma. In addition, the specific preclinical test models developed represent a useful tool for investigating the properties of nanoparticles in dynamic fluidic systems.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
O ₂	Molekularer Sauerstoff
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
³ O ₂	Triplett-Sauerstoff
AUC	Fläche unter der Kurve (Area Under the Curve)
bar	Druck
BLC	Biolitec
bzw.	Beziehungsweise
cm ²	Quadratcentimeter
CNC	Rechnergestützte numerische Steuerung (Computerized Numerical Control)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Carbopol
d	Kultivierungstag
DAD-Detektor	Diodenarray-Detektor
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
dyn / cm ²	Dyn pro Quadratcentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EN	Europäische Norm
EPR-Effect	Erhöhter Permeabilitäts- und Retentions-Effekt (Enhanced Permeability and Retention Effect)
F127	Pluronic® F127
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FDa	Fluoresceindiacetat
FDA	Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Food and Drug Administration)
FKS	Fötale Kälberserum
Freier PS	Freier Photosensibilisator
g	Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)

HSA	Humanes Serum Albumin
HTS	Hochdurchsatz-Screening (High-Throughput-Screening)
ICH	Internationaler Rat für Harmonisierung (International Council for Harmonisation)
ISO	Internationale Organisation für Normung (International Organization for Standardization)
J / cm ²	Joule pro Quadratcentimeter
k	Anzahl der technischen Replikate
kDa	Kilodalton
LC	Flüssigchromatographie (Liquid chromatography)
LOD	Nachweisgrenze der Detektion (Limit of Detection)
LOQ	Nachweisgrenze der Quantifizierung (Limit of Quantitation)
LP	Liposomale Nanopartikel
LrP	Lichtresponsives Polymer
mol / L	Mol pro Liter (Molarität)
mbar	Millibar
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM / L	Millimol pro Liter
mm ²	Quadratmillimeter
mTHPC	Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin
mTHPP	Meta-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin
mW	Milliwatt
n	Anzahl der unabhängigen Versuche
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
NP-PS	Nanopartikulärer Photosensibilisator
Pa·s	Pascalsekunde
PAA	Polyacrylsäure
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
PDI	Polydispersitätsindex
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDT	photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglykol
PG	Prüfgröße
PGA	Polyglycolsäure
PI	Propidiumiodid
PLA	Polymilchsäure
PLGA	Poly(milchsäure-co-glykolsäure)

PPO	Poly(propylenoxid)
PS	Photosensibilisator
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RZ	Retentionszeit
S ₀	Grundzustand
S ₁	Singulett-Zustand
ST	Kalibrierstandards
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TWEEN® 80	Polysorbat 80
U / min	Umdrehungen pro Minute
U / mL	Units pro Milliliter
UpM	Umdrehungen pro Minute
W	Watt
W/O	Wasser / Öl
W/O/W	Wasser / Öl / Wasser
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
ZP	Zetapotential
α	Signifikanzniveau
µg / mL	Mikrogramm pro Milliliter
µm	Mikrometer
µmol / L	Mikromol pro Liter

1 Einleitung

1.1 Die Entwicklung neuer Arzneistoffe

Tagtäglich werden eine Vielzahl potenzieller neuer Arzneistoffe durch die Verwendung neuer chemischer Synthesemethoden, kombinatorischer Chemie oder die Optimierung von bereits existierenden Arzneistoffen entwickelt [1–3]. Als Arzneistoff wird eine Substanz bezeichnet, die von einem Patienten zur Therapie von Krankheiten und zum Erhalt der Gesundheit eingenommen wird [4]. Die Entwicklung neuer Arzneistoffe gliedert sich nach den Angaben der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) in fünf Schritte (Abbildung 1). Der erste Schritt beginnt auf der Ebene der chemischen Grundlagenforschung neuer Substanzen. Hierzu werden rund 5000 bis 10000 potentielle Substanzen generiert [5]. Im zweiten Schritt werden diese Substanzen in der präklinischen Forschung auf ihre biologische Effektivität, aber auch auf mögliche unerwünschte toxische Effekte untersucht. Hierzu werden standardmäßige In-vitro-Zell- und Tiermodelle verwendet, die die zu behandelnde Krankheit abbilden. Bevor die Substanzen in Schritt 3 in klinischen Studien untersucht werden, müssen diese die präklinischen Untersuchungen bestehen. Die präklinischen Untersuchungen bilden daher die Grenze zwischen der chemischen Grundlagenforschung und den klinischen Studien. Klinische Studien werden eingesetzt, um Arzneistoffe an Patienten und gesunden Probanden zu testen. Diese bilden die Voraussetzung für die behördliche Zulassung des Arzneistoffes. Nach den erfolgreich durchgeführten klinischen Studien können die Daten aus allen drei Schritten bei einer Zulassungsbehörde zur Freigabe des Medikaments eingereicht werden. Dieser in Schritt 4 durchgeführte Prozess führt zu einer Zulassung oder Ablehnung des neuen Arzneistoffes. Nach der Zulassung eines Arzneistoffes und dessen therapeutischen Einsatzes, ist der Entwicklungsprozess und die behördlichen Kontrollen noch nicht abgeschlossen. Aufgrund der breiten Anwendung eines Arzneistoffes und der Erfahrungen, die daraus gesammelt werden, findet in Schritt 5 die Überwachung der Arzneimittelsicherheit nach dem Inverkehrbringen statt [6]. Der gesamte Prozess zur Entwicklung eines neuen Arzneistoffes dauert durchschnittlich 13 bis 15 Jahre [5,7]. Die Kosten zur Entwicklung eines neuen Medikaments unterliegen hohen Schwankungen. Aus einer Umfrage bei 10 biopharmazeutischen Unternehmen von DiMasi et al. im Jahre 2016 zu den Kosten eines neu entwickelten Arzneimittels, das zur Therapie von Patienten zugelassen wurde, geht hervor, dass hierbei Kosten von rund 2,6 Milliarden US\$ entstanden sind [8]. Hingegen liegen die Entwicklungskosten bei etwa 1,8 Milliarden US\$ bei der Entwicklung eines Medikaments, dessen aktive Substanz bisher noch nicht für den Markt zugelassen wurde [9]. Aus einem weiteren systematischen Review zur Entwicklung eines neuen Medikaments ergibt sich eine Kostenspanne von 92 Millionen US\$ bis 1,8 Milliarden US\$ [10]. Als Gründe für die hohen Schwankungen werden zum einen die fehlende Transparenz der entstehenden Kosten sowie die gestiegene Komplexität und die hohen

Kosten für die Durchführung von klinischen Studien genannt [8,10]. Zusätzlich steigen die Hürden für die Sicherheits- und Wirksamkeits-Prüfungen für ein neues Medikament kontinuierlich [3,11]. Als weiterer hoher Kostenpunkt wird die Rate an Fehlversuchen mit eingerechnet. Trotz der vorangegangenen präklinischen Untersuchungen, wurden durchschnittlich 52 % der in klinischen Studien getesteten potentiellen Arzneistoffen aufgrund von unzureichender Effektivität und etwa 24 % aufgrund von unerwünschten toxischen Effekten in den Jahren 2013-2015 als erfolglos getestete Arzneistoffe deklariert [12].

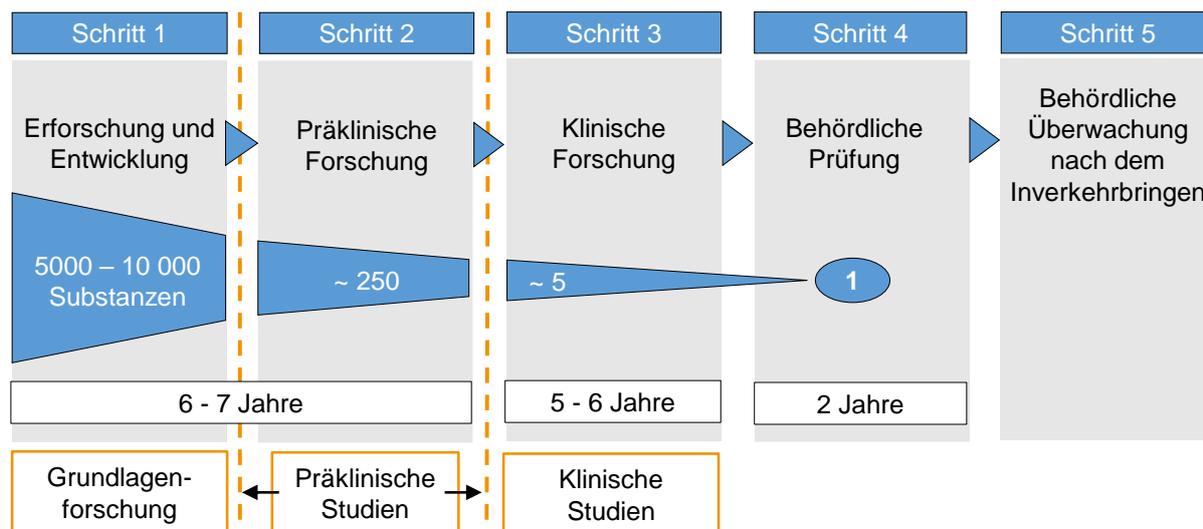


Abbildung 1: Darstellung der einzelnen Schritte zur Zulassung eines Medikaments

Gemäß regulatorischen Vorgaben besteht die Zulassung eines neuen Medikaments zur therapeutischen Behandlung eines Patienten aus 5 Schritten. Des Weiteren ist die Anzahl der potentiellen Substanzen und die Zeit der einzelnen Schritte angegeben [5,6].

Im Jahre 2018 wurden von der FDA 59 neue Medikamente zugelassen. Dabei enthielten 17 Medikamente neuartige pharmazeutische Wirkstoffe und 42 bereits lizenzierte bzw. zugelassene Arzneistoffe [13]. Der 5-Jahresdurchschnitt, der durch die FDA zugelassenen Arzneimittel, liegt bei 43 Medikamenten pro Jahr. Die Zulassungen im Jahre 2018 lassen sich in 14 therapeutische Gebiete und die prozentuale Anzahl der Medikamente wie folgt einteilen: Onkologie 16 %, ansteckende Krankheiten 12 %, Neurologie 8 %, Hämatologie 5 % und jeweils 3 % für angeborene Defekte, die Lunge betreffende und gastroenterologische Erkrankungen. Des Weiteren entfallen jeweils 2 % der zugelassenen Medikamente auf die Rheumatologie und Reproduktionsmedizin sowie jeweils 1 % auf die Ophthalmologie, Suchterkrankungen, Transplantationsmedizin, Dermatologie und Kardiologie [14] (Abbildung 2). Betrachtet man die prozentuale Anzahl der zugelassenen Medikamente wird deutlich, dass die Erforschung von neuen Krebs-Medikamenten eine große Rolle spielt. In den Jahren 2014-2018 wurden durchschnittlich pro Jahr 9 neue Medikamente für die Onkologie zugelassen, was einem prozentualen Anteil von rund 23 % entspricht [14–18]. Im Jahre 2018 gab es laut

Weltgesundheitsorganisation (WHO) rund 18,1 Millionen neue Krebspatienten und 9,6 Millionen Todesfälle. Daraus geht hervor, dass schätzungsweise jeder fünfte Mann und jede sechste Frau im Laufe ihres Lebens an Krebs erkranken und jeder achte Mann und jede elfte Frau daran sterben [19]. Die Erforschung und Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Krebs stellt somit weltweit eine Herausforderung dar. Dabei beginnt die Erforschung eines neuen Arzneistoffes meist mit der Identifikation des Ziel- bzw. Wirkortes im Patienten [5,6].

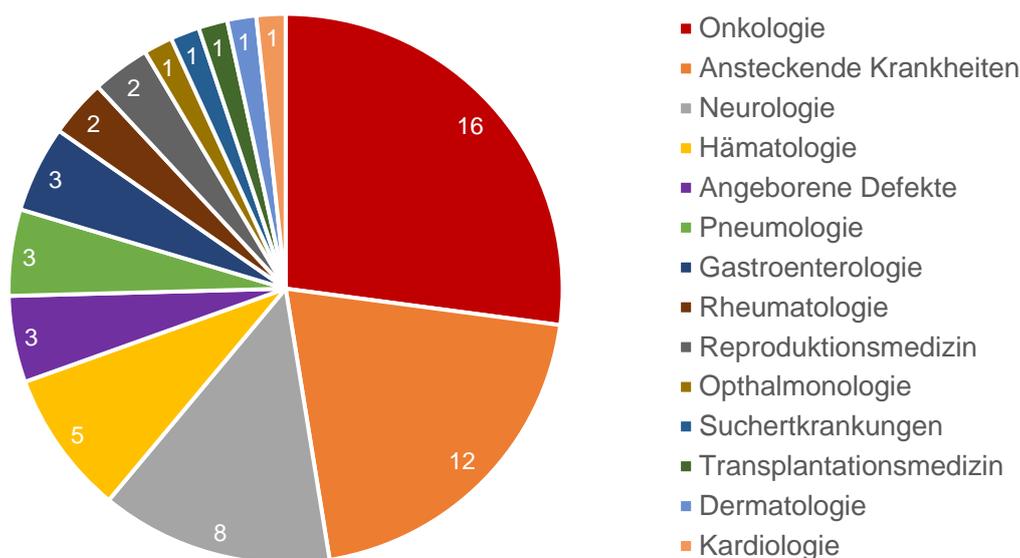


Abbildung 2: Zulassungen neuer Medikamente durch die FDA im Jahre 2018

Die von der FDA zugelassenen Medikamente wurden in die verschiedenen therapeutischen Gebiete gegliedert. Die Anzahl der Medikamente je therapeutischem Gebiet wurden in Prozent angegeben. (Modifiziert nach Mullard et al. [13])

1.2 Der Aufbau des Dünndarms und Dünndarmkarzinome

Im Falle eines Dünndarmkarzinoms befindet sich der Ziel- bzw. Wirkort eines zu entwickelnden Medikaments im Dünndarm des Patienten. Der Begriff Dünndarmkarzinom bezeichnet bösartige (maligne) Tumore des Dünndarms. Der Dünndarm gehört zum Organsystem des Gastrointestinaltrakts. Dieser umfasst die Abschnitte Oropharynx (Mund-Rachen-Raum), Ösophagus (Speiseröhre), Magen, Dünn- und Dickdarm. Die Aufgabe des Gastrointestinaltrakts besteht darin, die aufgenommene Nahrung in einzelne resorbierbare Substanzen zu zerlegen und diese über das Blut- und Lymphsystem im Körper zu verteilen. Bereits während der mechanischen Zerteilung der aufgenommenen Nahrung im Mund, wird diese mittels verschiedener Verdauungssäfte und Enzyme in ihre Bestandteile zerlegt [20]. Bei der Verdauung und Absorption spielt der Dünndarm eine übergeordnete Rolle. Der Dünndarm hat eine Länge von 3-5 m, was etwa 75 % der Gesamtlänge des Gastrointestinaltrakts und

etwa 90 % der Schleimhautoberfläche des menschlichen Körpers entspricht [21–23]. Der Dünndarm ist in der Bauchhöhle lokalisiert und ist größtenteils durch das Mesenterium mit der hinteren Bauchwand verbunden. Er kann in drei Abschnitte unterteilt werden, dem Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und dem Ileum (Krummdarm) [22]. Für den Transport und die Durchmischung des Nahrungsbreis im Dünndarm sind peristaltische Bewegungen verantwortlich. Dabei kommt es zu Kontraktionen der Ring- und Längsmuskulatur der Darmwand, die durch das enterische Nervensystem gesteuert werden [20]. Der Aufbau der Darmwand ist bei allen drei Dünndarmabschnitten identisch (Abbildung 3).

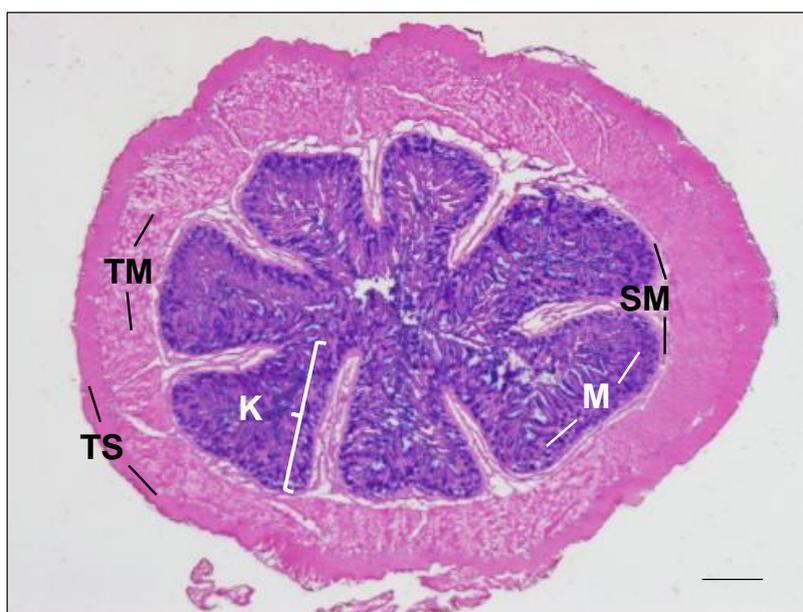


Abbildung 3: Histologischer Schnitt eines porcinen Dünndarms

Die histologische Abbildung zeigt einen Dünndarmschnitt eines porcinen Darmpräparats. Dieses wurde mittels Hämatoxylin, Eosin und Alcian blau gefärbt. Zu sehen sind die Abschnitte Tunica mucosa (M), Tunica submucosa (SM), Tunica muscularis (TM), Tunica subserosa (TS) und Kerckring-Falten (K). Der Messbalken entspricht 1 mm.

Vom Darmlumen aus betrachtet beginnt die Darmwand mit der Tunica mucosa (Schleimhaut). Durch Kerckring Falten, Zotten (Villi) und Mikrovilli entsteht die stark vergrößerte Resorptionsfläche des Dünndarms (Abbildung 4) [23]. Die Zotten sind aus Epithel- und Becherzellen aufgebaut und haben ein kapillares Netzwerk, welches aus Venen, Arterien und Lymphgefäßen besteht. Die Becherzellen der Tunica mucosa produzieren die Mukusschicht, die das Darmlumen auskleidet. Die Mukusschicht hat in erster Linie eine schützende Funktion. Dabei dient sie als physikalische Barriere, schützt die Mukosa vor dem Austrocknen und vor mechanischen Beschädigungen. Aufgrund der schmierenden Eigenschaften hilft der Mukus, den Nahrungsbrei durch den Darmtrakt zu transportieren [24]. Des Weiteren spielt die Mukusschicht eine wichtige Rolle als selektive Barriere für Partikel und Moleküle, in dem sie die ungehinderte Penetration in die Epithelschicht verhindert [25]. Mukus ist ein Hydrogel, das

zu etwa 95 % aus Wasser, 2-5 % Mucinen sowie aus kleinen Mengen Lipiden, DNA, Zellfragmenten und Salzen besteht [25,26]. Dabei bilden Mucine die strukturgebende Einheit des Mukus. Mucine sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 0,5 bis 50 MDa [26–28]. Sie bestehen aus einem Protein-Grundgerüst, das über Prolin-, Threonin- und/oder Serinreste durch O-verknüpfte N-Acetylgalactosamine sowie N-verknüpfte sulfathaltige Glykane glykosyliert ist [29,30]. Durch den hohen Sialinsäure- und Sulfatgehalt ist die Oberfläche stark negativ geladen [27]. Cysteinreiche Domänen können nicht-kovalente Dimere zwischen einzelnen Mukusfasern bilden, wodurch eine stabile Netzstruktur entsteht [31]. Mucine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat synthetisiert und dort in Vesikel verpackt. Die Vesikel konzentrieren sich in der Nähe der apikalen Membran, wo die Exozytose kontinuierlich stattfindet. Dies ist nötig, da sich die Mukusschicht kontinuierlich erneuern muss, um ihre Funktionen ausüben zu können [26,29]. Die Zeit zur Erneuerung variiert zwischen wenigen Minuten bis hin zu mehreren Stunden [26]. Die Schichtdicke des Mukus ist abhängig von der Region im Dünndarm und beträgt zwischen 170 bis 480 μm , wobei der Wert in Richtung Dickdarm ansteigt [32].

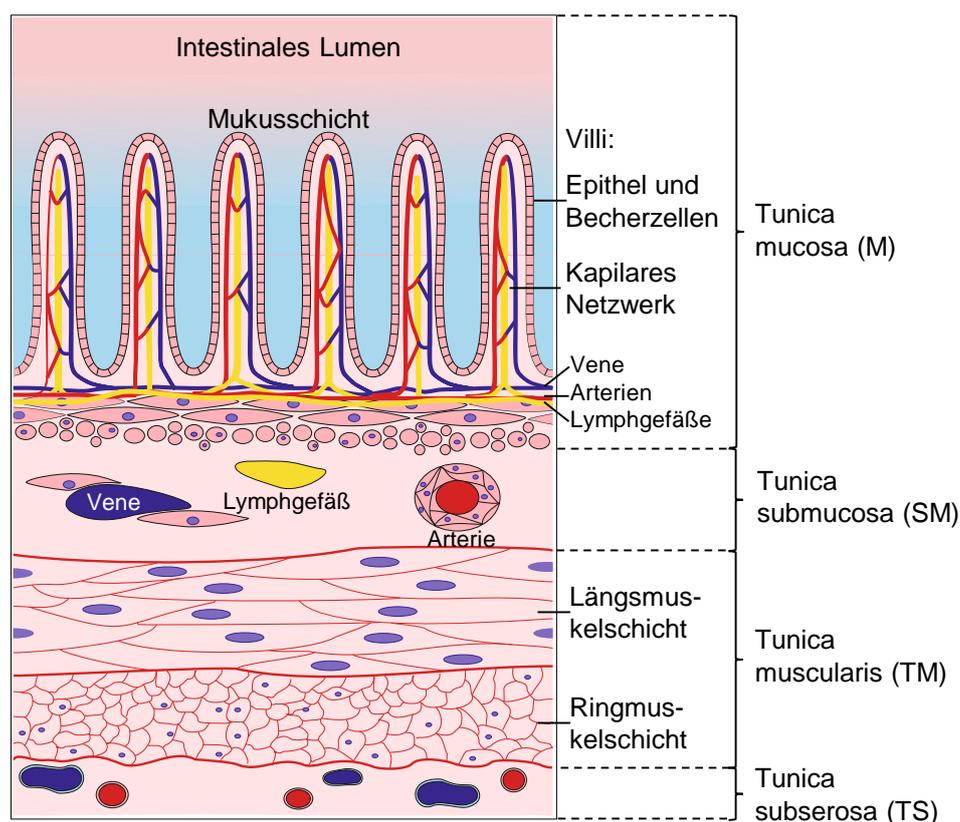


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Darmwand

Die Zeichnung zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Abschnitte der Darmwand. Diese kann unterteilt werden in Tunica mucosa (M), Tunica submucosa (SM), Tunica muscularis (TM) und Tunica subserosa (TS).

Die Barriere-Eigenschaften von Mukus können nach Boegh et al. [26] in die Kategorien dynamische, sterische und interaktive Barriere unterteilt werden. Als dynamische Barriere hindert die Mukusschicht Substanzen daran die Epithelschicht zu erreichen. Dies ist mit der kontinuierlichen Erneuerung der Mukusschicht, aber auch durch die peristaltischen Bewegungen im Darm zu begründen. Die sterischen Barriere-Eigenschaften sind zum einen auf die Netzstruktur des Mukus zurückzuführen und zum anderen auf die Viskosität. Das Mucin-Netzwerk agiert ähnlich wie ein Größenausschlussfilter. Die Maschengröße beträgt etwa 100 nm bis hin zu mehreren Mikrometern. Dabei können Moleküle und Partikel, die kleiner als der Maschenabstand zwischen den Mucinfasern sind, die Mukusschicht überwinden, während größere Moleküle zurückgehalten werden [33,34]. Eine weitere Eigenschaft des Mukus-Netzwerks ist die Filterung durch Interaktionen, die zwischen den Mucinfasern und den eindringenden Molekülen und Partikeln entstehen (Abbildung 5). Dabei spielen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und andere spezifische Bindungseinflüsse eine Rolle. Diese führen dazu, dass Moleküle und Partikel entsprechend ihrer Oberflächeneigenschaften durch starke Interaktionen zurückgehalten werden. Schwache oder kaum vorhandene Interaktionen hingegen können zu einer Permeation über die Mukusschicht führen [25]. Die Viskosität der Mukusschicht entsteht durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den hoch hydratisierten Mucinen [24,29]. Eine steigende Viskosität hängt nachweislich mit einer steigenden Mucin-Konzentration zusammen, wodurch gleichzeitig die sterischen Eigenschaften verstärkt werden [35]. Die interaktive Barriere der Mukusschicht führt zu Interaktionen zwischen Substanzen und der Mukusoberfläche. Dabei kann es zwischen dem Proteinkern des Mucins oder den enthaltenen Lipiden und den Substanzen zu hydrophoben Wechselwirkungen kommen. Des Weiteren können die Wasserstoffbrückenbindungen der Kohlenhydrate des Mucins als Wasserstoffbindungsakzeptoren und -spender dienen oder auch zu ionischen Wechselwirkungen führen [26]. Dies verdeutlicht die Komplexität der Mukusbarriere und die Herausforderung, die sich für den Transport von Molekülen über die Mukusschicht ergeben. Diese hat auch einen Einfluss auf den Transport von Medikamenten zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen.

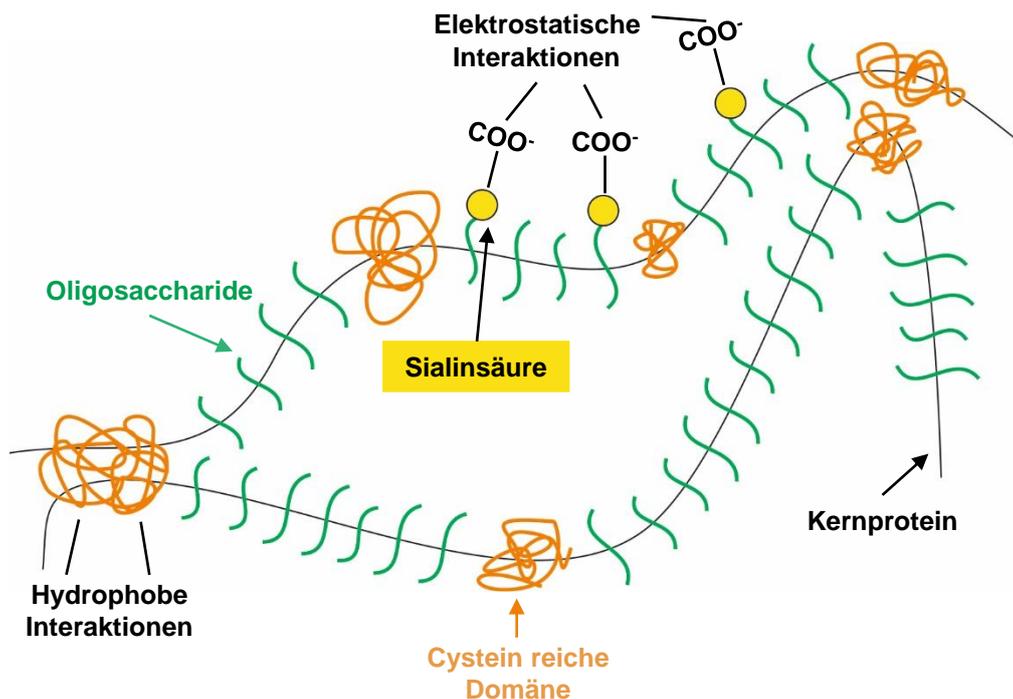


Abbildung 5: Schematische Struktur eines Mucin-Glykoproteins

Dargestellt ist eine schematische Zeichnung eines Mucin-Glykoproteins und seine potenziellen mukoadhesiven Elemente. (Modifiziert nach Yang et al. [30])

Karzinome, die im Dünndarm entstehen, sind eine seltene Erkrankung, die eine globale Inzidenz von etwa 1 Patienten pro 100 000 Einwohner im Jahr aufweist [36]. Als Gründe für die geringe Anzahl Erkrankter wird unter anderem die kurze Verweildauer kanzerogener Substanzen im Dünndarm und die schnelle Erneuerung der Darmschleimhaut genannt [21,37]. In Deutschland sind im Jahre 2014 1240 Männer und 1030 Frauen neu erkrankt, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei einem Median von 68 Jahren bei Männern und 71 Jahren bei Frauen liegt [38]. Dabei entstehen > 55 % der Dünndarmkarzinome im Duodenum, 11-25 % im Jejunum und 7-17 % im Ileum [39–42]. Im Allgemeinen werden als mögliche Risikofaktoren zur Entstehung von Dünndarmkarzinomen ein erhöhter Alkoholkonsum und Rauchen genannt. Des Weiteren scheint sich das Risiko durch einen erhöhten Konsum bestimmter Nahrungsmittel wie Zucker, raffinierten Kohlenhydraten, rotem und geräucherten Fleisch zu erhöhen. Wohingegen eine ausgewogene gesunde Ernährung das Risiko senkt [43–46]. In verschiedenen Studien konnten darüber hinaus genetische Prädispositionen identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Entstehung von Dünndarmkarzinomen haben. Darunter zählen die familiäre adenomatöse Polyposis [47,48], das Lynch-Syndrom [49–51], die Neurofibromatose Typ 1 [52] und das Peutz-Jeghers-Syndrom [53,54]. Auch bei den chronischen Erkrankungen Morbus Crohn [55] und Zöliakie [56,57] weisen erkrankte Patienten ein erhöhtes Dünndarmkrebsrisiko auf.

Histologisch betrachtet können Dünndarmkarzinome in vier Typen unterteilt werden: Adenokarzinome, neuroendokrine Tumore, gastrointestinale Stromatumore (Sarkome) und Lymphome [58]. Wobei mit jeweils rund 40 % neuroendokrine Tumore und Adenokarzinome am häufigsten vorkommen [39,40,59]. Pathologisch betrachtet entstehen maligne Tumore durch genomische Mutationen, die zu einem unkontrollierten Wachstum von Zellen führen [60]. Dabei entstehen neuroendokrine Tumore durch Mutationen in hormonproduzierenden Zellen des endokrinen Systems des Darms [61]. Adenokarzinome im Dünndarm entwickeln sich analog zu Dickdarmkarzinomen aus Polypen (Abbildung 6) [62]. Diese wachsen als breitbasige oder gestielte Schleimhautvorwölbung in das Darmlumen ein. Die Entwicklung eines Darmkarzinoms aus einem Polypen erfordert eine Vielzahl genetischer Mutationen [20]. Diese lösen ein unkontrolliertes Zellwachstum aus, durch das sich die Zellen in das Darmlumen und über die Darmwand in Form von Metastasen in andere Gewebe und Organe ausbreiten [58].

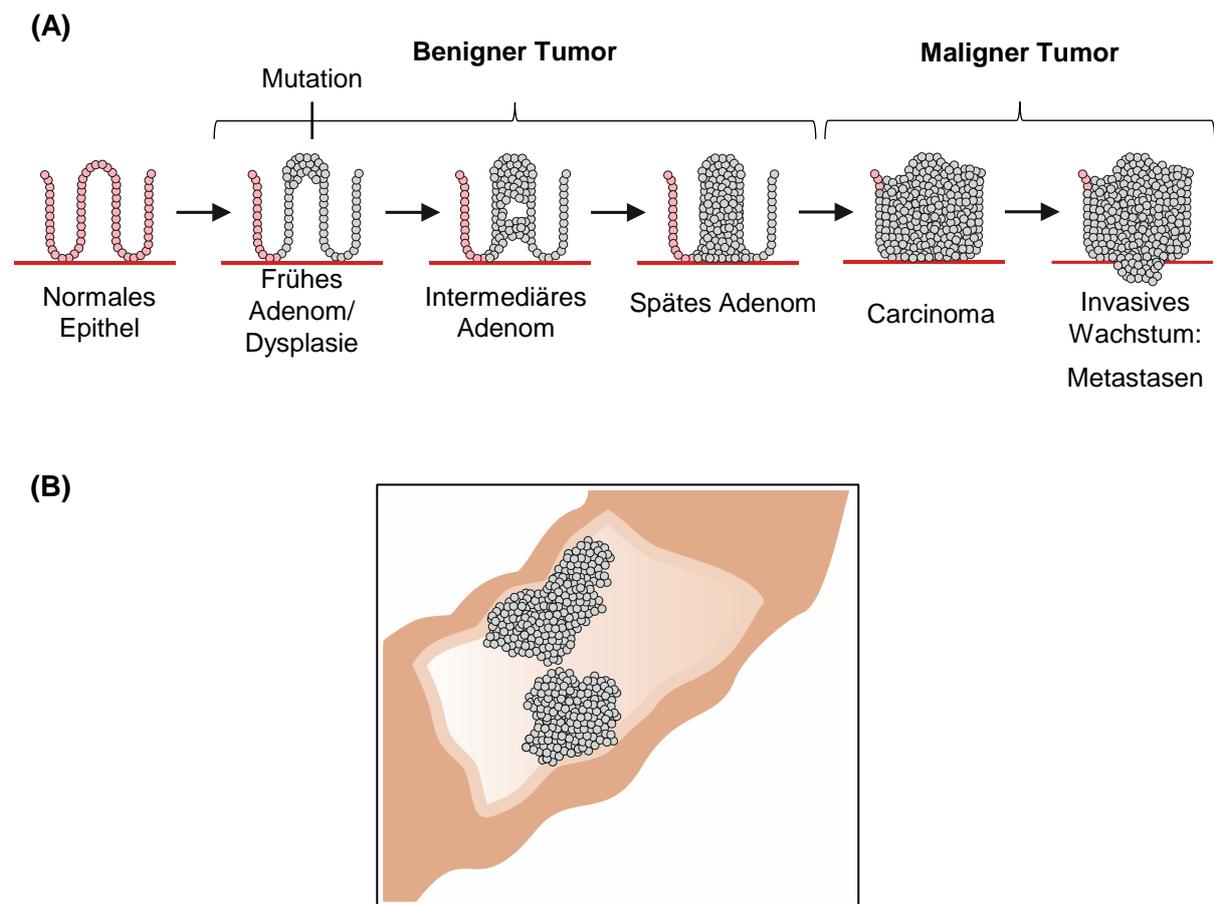


Abbildung 6: Entwicklung eines Adenokarzinoms im Darm

(A) Die Stufen der Entwicklung eines malignen Tumors vom normalen gesunden Epithel bis zum invasiven Wachstum der Tumorzellen über das Darmlumen hinaus. (B) Wachstum des Darmtumors im Darmlumen.

Aufgrund fehlender spezifischer Symptome wird das Dünndarmkarzinom meist erst in einem späten Stadium diagnostiziert. Dabei können Beschwerden wie Bauchschmerzen, unbeabsichtigter Gewichtsverlust, gastrointestinale Blutungen sowie ein akuter mechanischer Darmverschluss auftreten [63,64]. Die Diagnose eines Dünndarmkarzinoms erfolgt meist zunächst mittels bildgebender Verfahren wie der Endoskopie, der Computertomographie und der Magnetresonanztomographie [62]. Wie bei allen Krebserkrankungen ist eine frühe Diagnose ausschlaggebend für eine erfolgreiche Behandlung des Patienten. Die Behandlung nach der Diagnose Dünndarmkarzinom ist abhängig davon, ob sich der Tumor lokal befindet oder sich bereits Metastasen gebildet haben. Aus einer Studie der American Cancer Society geht hervor, dass in den Jahren 2009 bis 2013 zum Zeitpunkt der Diagnose bei rund 32 % das Dünndarmkarzinom lokal und somit auf den Entstehungsort begrenzt vorliegt. Bei über 59 % der neu diagnostizierten Patienten haben sich bereits Metastasen gebildet und sich auf umliegende Organe ausgebreitet [63]. Bei einem lokalen Tumor kann eine vollständige Resektion des Primärtumors und den umgebenden Lymphknoten durchgeführt werden. Diese stellt zur Zeit die einzige Möglichkeit zur Heilung eines Patienten dar, wobei bei etwa 40 % der Patienten erneut maligne Tumore auftreten [65]. Sobald Metastasen vorhanden sind, ist eine Resektion des primären Tumors nicht mehr zu empfehlen. In diesen Fällen wird eine Resektion nur noch palliativ durchgeführt, wenn ein mechanischer Verschluss des Darms, Perforation oder unkontrollierte Blutungen diagnostiziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur palliativen Behandlung stellt die Chemotherapie dar, allerdings ist die Datenlage hierzu sehr gering und basiert nur auf Studien mit einer geringen Anzahl von Patienten [66]. Beispielsweise hat die British Columbia Cancer Agency Daten aus den Jahren 1990 bis 2000 ausgewertet und eine Überlebensrate ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass bei einer Anzahl von 16 Patienten, die unter einem bereits metastasierendem Adenokarzinom litten, eine palliative Chemotherapie zu einer durchschnittlichen Überlebensrate von 15,6 Monaten führte. Im Vergleich zu unbehandelten Patienten ergab dies eine Steigerung der Überlebensrate von 7,9 Monaten [67]. Allerdings sind hierbei die hohen Nebenwirkungen der Chemotherapie wie Übelkeit und Erbrechen, Appetitlosigkeit, Haarausfall und eine hohe Anfälligkeit für Infektionen gegenüber der Lebensqualität des Patienten abzuwägen [60]. Aufgrund der späten Diagnose und mangelnder Therapieverfahren ist die Prognose von Patienten mit Dünndarmkarzinomen sehr schlecht. In Deutschland beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate insgesamt 59 % [38]. Wobei aus verschiedenen internationalen Studien, in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp, eine 5-Jahres-Überlebensrate für Adenokarzinome von 25 %, für Lymphome von 62 %, für neuroendokrine Tumore von 83 % und für Sarkome von 45 % ermittelt werden konnte [39,68–70]. Die aktuelle Datenlage zeigt, dass dringend neue Therapien für die Behandlung des Dünndarmkarzinoms benötigt werden (Abbildung 7).

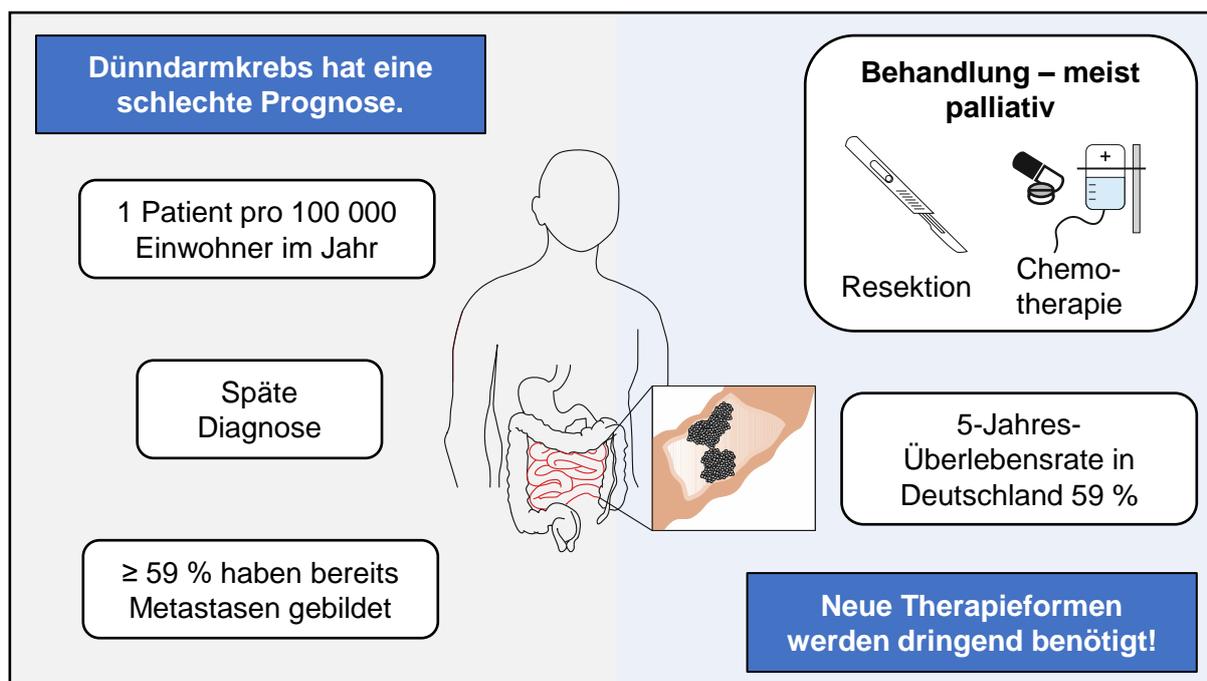


Abbildung 7: Fakten zur Erkrankung Dünndarmkrebs

Übersicht der Fakten zu Krebserkrankungen im Dünndarm von der Prognose, Inzidenz, den Therapieformen und der Überlebensrate.

1.3 Die photodynamische Therapie

Eine potenzielle neue Therapieform zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen stellt die photodynamische Therapie (PDT) dar. Die PDT ist eine minimalinvasive Behandlungsmethode bei der ein photoaktivierbarer pharmazeutischer Wirkstoff (Photosensibilisator) in Kombination mit Licht und Sauerstoff einen zytotoxischen Prozess auslösen kann. Chemisch betrachtet sind Photosensibilisatoren Moleküle, die meist aus einem Porphyrin-Grundgerüst aufgebaut sind. Das Porphyrin-Grundgerüst besteht aus Pyrrol-Ringen, die durch Methinbrücken zyklisch verbunden sind und konjugierte Doppelbindungen aufweisen (Abbildung 8) [71,72].

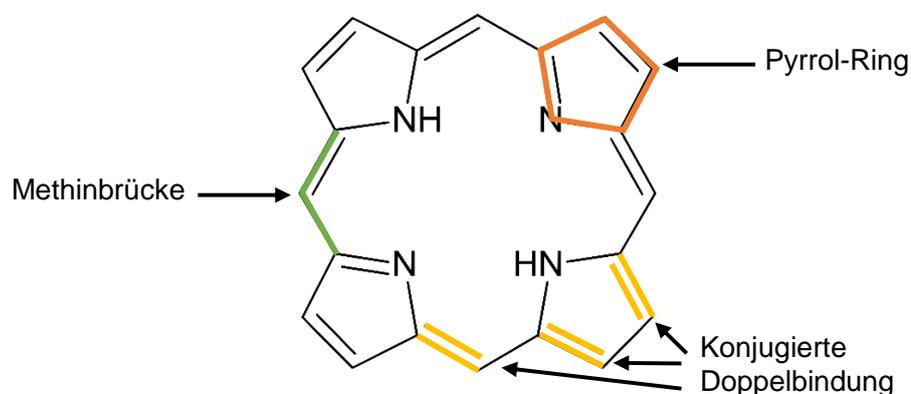


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Porphyrin-Grundgerüsts

Das Porphyrin-Grundgerüst ist aus vier Pyrrolringen aufgebaut, die zyklisch über Methinbrücken verbunden sind. Des Weiteren weisen sie eine Vielzahl konjugierter Doppelbindungen aus.

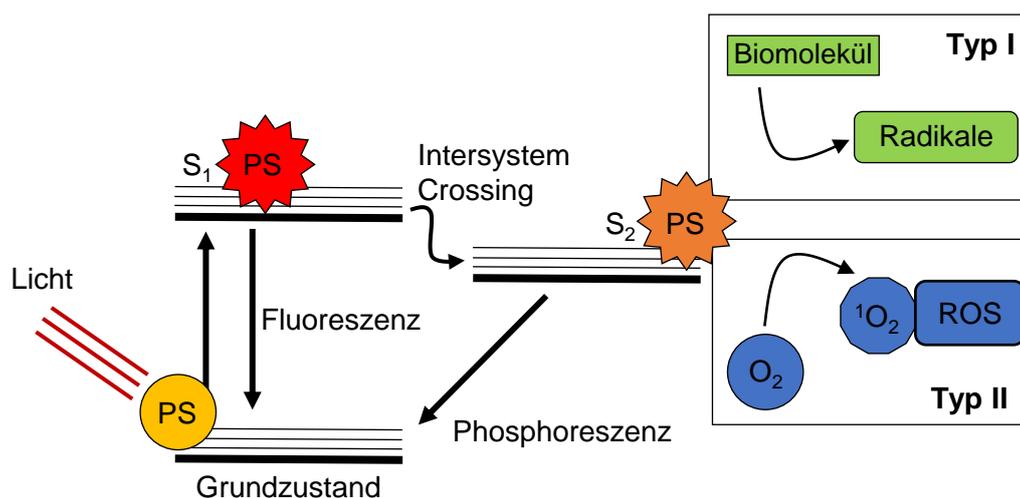


Abbildung 9: Modifiziertes Jablonski-Diagramm zur Darstellung der Aktivierung des Photosensibilisators

Der Photosensibilisator wird mit Licht einer spezifischen Wellenlänge bestrahlt und erreicht dadurch einen angeregten Singulett-Zustand (S₁). Nach dem Intersystem Crossing befindet sich der Photosensibilisator in einem Triplet-Zustand (S₂) und kann auf zwei Arten reagieren. Typ I-Reaktion: Der Photosensibilisator reagiert mit Biomolekülen durch Wasserstoffatom-(Elektronen)-Transfer unter Bildung von Radikalen. Typ-II-Reaktion: Der Photosensibilisator reagiert direkt mit Sauerstoff durch Energietransfer, um Singulett-Sauerstoffe und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu erzeugen. (Modifiziert nach Calixto et al. und van Straten et al. [73,74])

Zur Aktivierung des Photosensibilisators wird Licht einer bestimmten Wellenlänge eingesetzt. Für Porphyrinringe liegt der optimale Wellenlängenbereich um 415 nm. Weitere schwächere Intensitätsbanden befinden sich in einem Wellenlängenbereich zwischen 500 und 700 nm [75,76]. Die Aktivierung des Photosensibilisators kann mit einem vereinfachten Jablonski-Diagramm dargestellt werden (Abbildung 9). Durch die Bestrahlung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge gehen die Valenzelektronen des Photosensibilisator-Moleküls vom Grundzustand (S₀) in einen angeregten Singulett-Zustand (S₁) über. Dieser angeregte Zustand hat eine Dauer von ca. 10⁻⁶ Sekunden, danach können die Elektronen durch Abgabe der gewonnenen Energie in Form von Fluoreszenz wieder in ihren Grundzustand (S₀) zurückkehren oder es kommt zu einem Übergang in den Tripletzustand (S₂), der durch Intersystem Crossing ausgelöst wird. Dieser Tripletzustand ist eine Voraussetzung für die Funktionalität des Photosensibilisators und hat eine Dauer von mehreren Mikrosekunden bis Millisekunden, die auf das Vorhandensein von konjugierten Doppelbindungen zurückzuführen ist [72]. Dabei treten zwei Reaktionswege auf, die als Typ I- und II-Reaktion bezeichnet werden. Bei der Typ I-Reaktion reagiert der Photosensibilisator im angeregten Tripletzustand mit in der Zelle vorhandenen Biomolekülen wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren. Dabei werden Wasserstoffatome übertragen, die zu einer Bildung von freien Radikalen führen. Die Typ II-Reaktion führt zu einer direkten Reaktion des Photosensibilisators mit molekularem Sauerstoff, wobei es zu einem Energietransfer und der Generierung von Singulett Sauerstoff

($^1\text{O}_2$) und weiteren reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt. Die Typ II-Reaktion ist die Hauptreaktion der PDT [74,77].

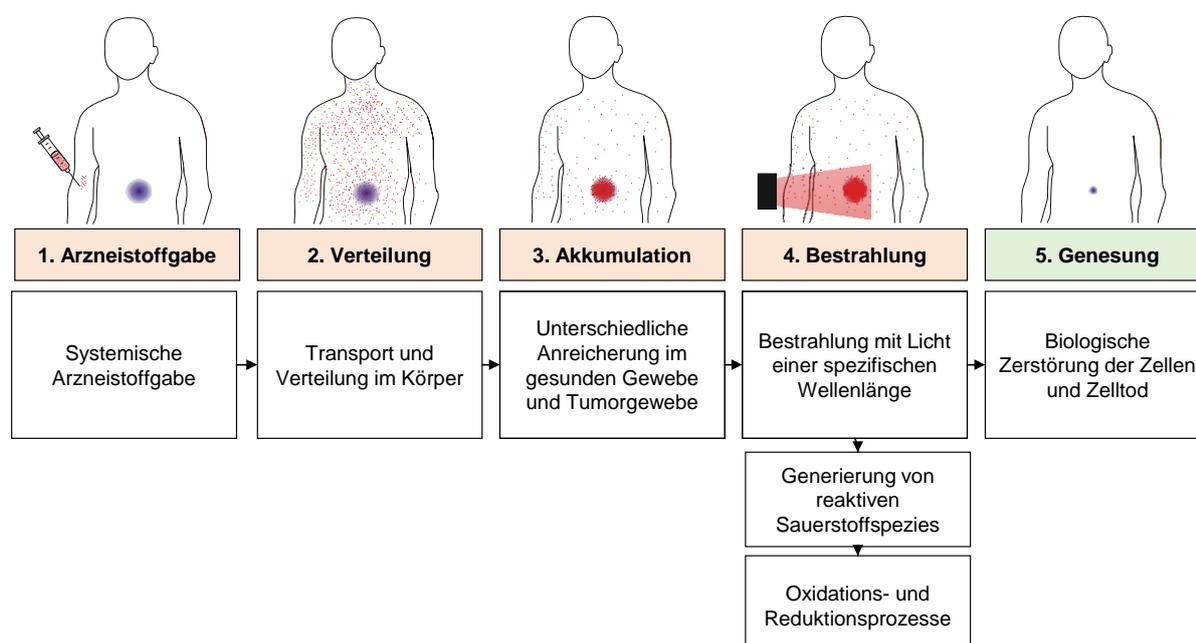


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Behandlung eines Patienten im Rahmen der PDT

Bei der photodynamischen Therapie (PDT) erfolgt die Arzneistoffgabe topisch oder durch intravenöse Injektion. Nach der systemischen Verteilung des Photosensibilisators kommt es zu einer Akkumulation im Tumorgewebe. Der Tumor wird dann mit Licht einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt, was zu einer Produktion von zelltoxischen reaktiven Sauerstoffspezies führt, die eine selektive Zerstörung des Tumorgewebes auslösen.

Bei der klinischen Behandlung des Patienten im Rahmen der PDT erfolgt zunächst die topische oder systemische Gabe durch intravenöse Injektion des Photosensibilisators (Abbildung 10). Der Photosensibilisator verteilt sich daraufhin im Organismus, wobei es zu einer passiven Akkumulation im Tumorgewebe kommt. Dieser Effekt wird als „erhöhter Permeabilitäts- und Retentions-Effekt“ (EPR-Effekt, engl. enhanced permeability and retention) bezeichnet (Abbildung 11). Dem EPR-Effekt liegt die Struktur von malignen Tumorgewebe zu Grunde. Aufgrund des schnellen Wachstums von Tumoren kommt es im Vergleich zu gesundem Gewebe zu einer veränderten Gewebearchitektur. Zum einen entstehen durch Hypervaskularisierung kaum entwickelte Blutgefäße, die nur sehr dünne Gefäßwände aufweisen. Des Weiteren führen Lücken mit einer Größe von 600 bis 800 nm zu vaskulären Leckagen, die eine Akkumulation von zirkulierenden Molekülen in das Tumorgewebe fördern [78]. Der Abtransport der Moleküle wird wiederum durch das Fehlen von Lymphgefäßen verhindert [79]. Für die PDT kann daher der EPR-Effekt positiv genutzt werden [80]. Nach einer vorgegebenen Inkubationszeit von 24-72 h, in der die Akkumulation des Photosensibilisators im Tumorgewebe stattfindet, wird die Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge, die der Absorptionsbande des Photosensibilisators entspricht, durchgeführt [81].

Wobei die Effizienz der photodynamischen Therapie maßgeblich von der verwendeten Bestrahlungswellenlänge, die zur Aktivierung des Photosensibilisators eingesetzt wird, abhängig ist. Die Penetrationstiefe von Licht in Gewebe ist durch absorbierende endogene Chromophore wie Hämoglobin und Wasser limitiert. Daher liegt das sogenannte „therapeutische Fenster“ in einem Wellenlängenbereich von 620 bis 850 nm [82,83]. Des Weiteren kann durch die Fokussierung der Bestrahlungseinheit eine selektive Aktivierung des Photosensibilisators ermöglicht werden. Die Bestrahlung und Aktivierung des Photosensibilisators führt zu einer Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Singulett-Sauerstoff. Diese sind stark zelltoxisch und führen zu einem Abbau von Lipiden in der Zellmembran, was zu nekrotischen Prozessen in der Zelle führt. Des Weiteren werden durch die Freisetzung des Cytochrom C apoptotische Prozesse eingeleitet. Die dadurch entstehenden akut entzündlichen Reaktionen führen zu einer Aktivierung des Immunsystems [84].

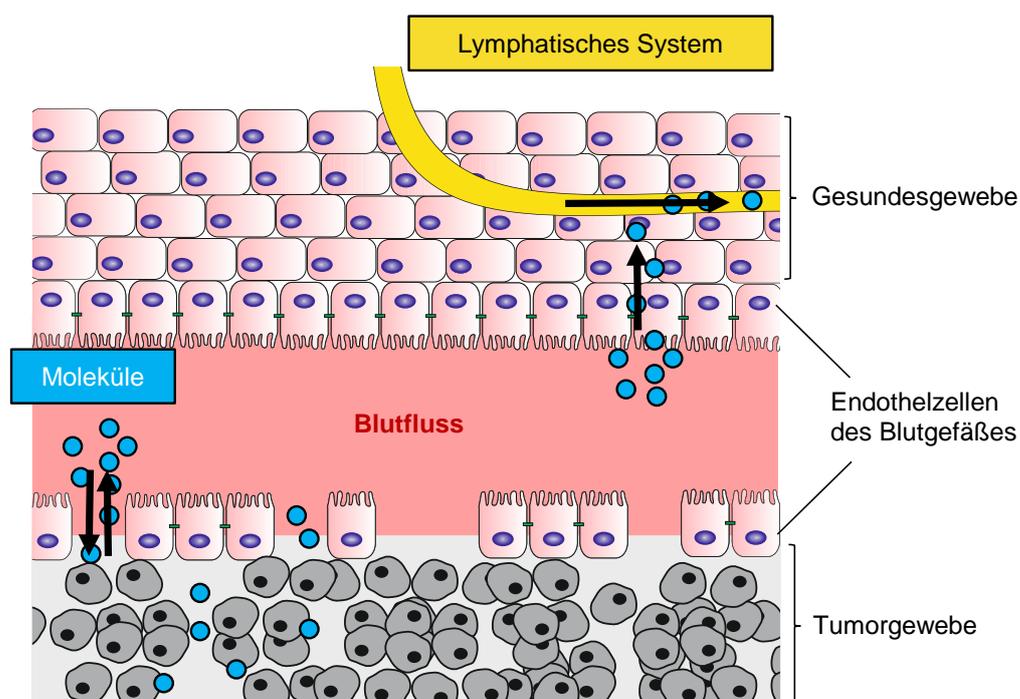


Abbildung 11: Erhöhter Permeabilitäts- und Retentions-Effekt (EPR-Effekt, engl. enhanced permeability and retention)

Im Vergleich zu gesundem Gewebe weisen die Blutgefäße von Tumoren eine veränderte Architektur auf und verfügen nicht über ein effektives Lymphsystem. Dies führt zu einer Akkumulation von Molekülen im Tumorgewebe.

Die PDT wurde erstmals im Jahre 1993 in Kanada zugelassen. Dies ermöglichte die Behandlung von Patienten mit Harnblasenkarzinomen unter Verwendung des Photosensibilisators Porfimer sodium (Photofrin®) [85]. Mittlerweile wird Photofrin® weltweit zur Behandlung von Ösophagus- und Lungenkrebs eingesetzt [73]. Danach wurde der

Photosensibilisator Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC) als Medikament unter dem Namen Foscan® zugelassen (Abbildung 12). Dieser stellt einen Photosensibilisator der zweiten Generation dar und hat gegenüber Porfimer sodium den Vorteil, dass er Absorptionsbanden im hohen Wellenlängenbereich aufweist und zudem eine verbesserte Sicherheit aufgrund einer verringerten systemischen Zirkulationszeit bietet [86]. Der Photosensibilisator mTHPC wurde extensiv erforscht und hat sich als Krebsmedikament auf dem Markt etabliert. Daher wird er häufig als Test- oder Beispielsubstanz zur Entwicklung neuer potentieller Photosensibilisatoren und Formulierungen verwendet [87]. Die Verwendung von Foscan® in Kombination mit Licht zur Behandlung von Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Nackenbereich wird als konventionelle Therapie eingesetzt. Sie hat die Vorteile, dass sie wenig Einfluss auf die zugrundeliegenden Funktionsstrukturen hat und ein sehr gutes kosmetisches Ergebnis liefert. Dabei liegt die Heilungsrate bereits nach zwei Behandlungen zwischen 85 bis 96 %, wobei nach zwei Jahren bei nur etwa 25 % der Patienten erneut Kopf- und Nackenkarzinome entstehen [88,89].

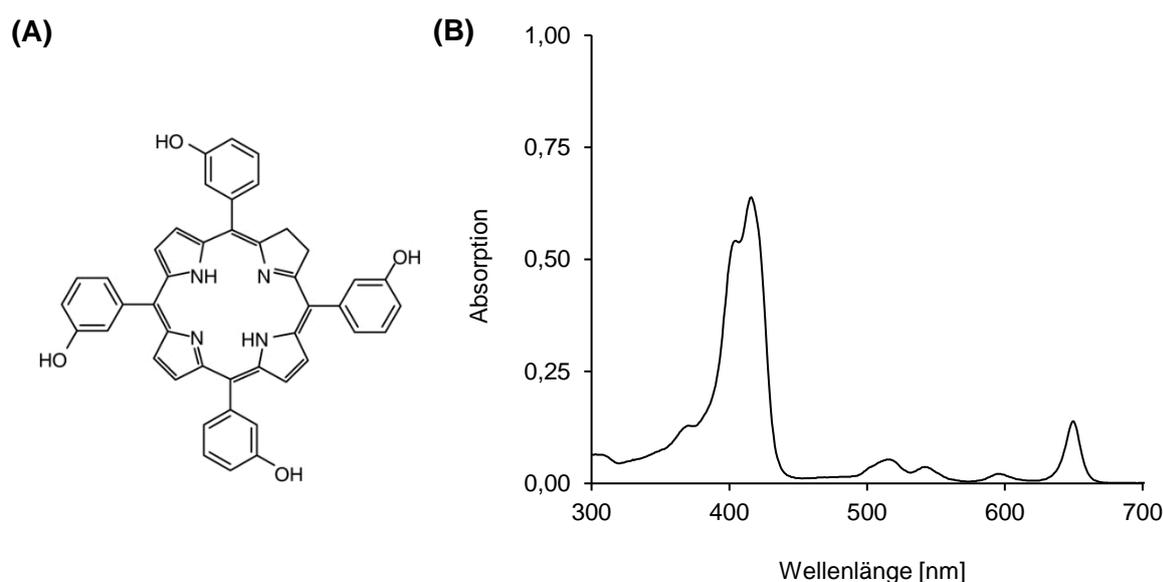


Abbildung 12: Strukturformel und Absorptionsspektrum des Photosensibilisators mTHPC

(A) Strukturformel des Photosensibilisators Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC) (Modifiziert nach [90]) und das (B) Absorptionsspektrum einer mTHPC-Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO).

Die Erfolge der PDT bei der Behandlung von oberflächlichen Karzinomen, wie Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen, ist unter anderem auf die leicht zu bestrahlende Fläche zurückzuführen. Allerdings können auch innenliegende Karzinome, wie das Harnblasenkarzinom, durch den Einsatz von Endoskopen in Kombination mit einer Lichtquelle effektiv bestrahlt werden [91]. Daher wird auch das Potential der PDT zur Behandlung von gastrointestinalen Tumoren untersucht [92]. Die meisten gastrointestinalen

Tumore entstehen an der Mukosa, der zum Lumen liegenden Membran des gastrointestinalen Traktes. Dies hat den Vorteil, dass die Bestrahlungsquelle direkt mittels eines flexiblen Endoskops zum Tumor geführt werden kann (Abbildung 13). Dabei kann durch eine im Endoskop integrierte Kamera und einer Lichtquelle zunächst der Tumor im Dünndarm lokalisiert werden. In einen Instrumentenport kann eine weitere Lichtquelle im Endoskop integriert werden, die eine fokussierte Bestrahlung des Tumors ermöglicht. Des Weiteren ist es dabei möglich Biopsien mittels einer Schlinge zu entnehmen, die für die Untersuchung des therapeutischen Effekts genutzt werden können [93].

In einer klinischen Studie von Hatogai et al. mit 113 Patienten konnte durch die Behandlung von Ösophaguskarzinomen mittels PDT eine komplette Remission des Tumors bei 58,4 % der Patienten erzielt werden [94]. Klinische Studien zur Behandlung von Patienten mit Karzinomen im kolorektalen Bereich des Gastrointestinaltraktes zeigen auch hier einen positiven anti-tumoralen Effekt. Nach einer Studie von Krasner et al. konnte bei der Behandlung von 11 Patienten nach endoskopisch durchgeführter PDT bei 3 Patienten eine vollständige Remission dokumentiert werden [95].

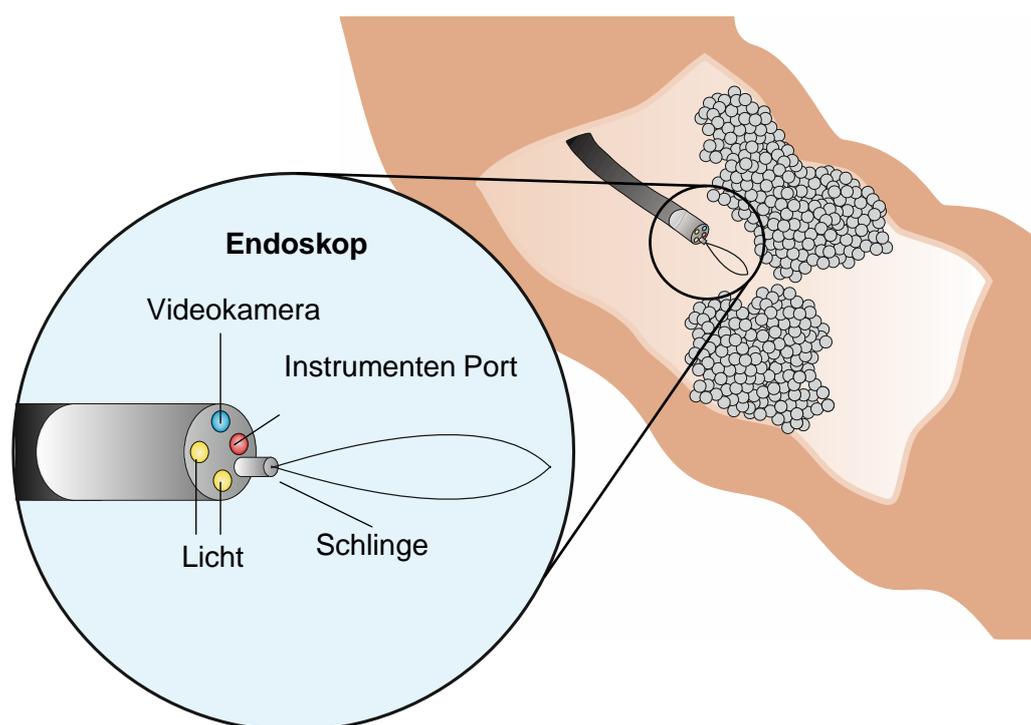


Abbildung 13: Photodynamische Behandlung eines Tumors im Gastrointestinaltrakt mittels endoskopischer Bestrahlung

Nach der Akkumulation des Photosensibilisators im Tumorgewebe kann eine fokussierte Bestrahlung des Dünndarmkarzinoms mittels Endoskop durchgeführt werden.

Ein großer Nachteil der PDT zur Behandlung von gastrointestinalen Tumoren stellt die intravenöse Medikamentengabe dar. Diese kann zu Überempfindlichkeitsreaktionen, Allergien, Toxizität und zu einer unvorhersehbaren systemischen Verteilung führen,

insbesondere bei der wiederholten Verabreichung des Photosensibilisators [96]. Des Weiteren kann es zu einer Akkumulation in unbeteiligten Geweben wie Augen und Haut führen, wodurch eine akute Phototoxizität ausgelöst wird, wenn Patienten Umgebungslicht ausgesetzt sind [96,97]. Dabei kann die kutane Photosensibilität nach intravenöser Gabe in Abhängigkeit vom verwendeten Photosensibilisator zwischen 1 bis hin zu 8 Wochen betragen [73,81,98]. Dies führt dazu, dass die Patienten für mehrere Wochen Sonnenlicht meiden müssen, was einen großen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten hat [73]. Als Alternative zur intravenösen Applikation wurde in einer klinischen Studie von Mikvy et al. der Photosensibilisator mTHPC 22 Patienten mit benignen und malignen Tumoren im Gastrointestinaltrakt, oral verabreicht. Dabei konnte eine Tumorgrößenreduktion um 20 bis 30 % nach der Behandlung festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass Aufgrund eines mangelnden Transportes des Photosensibilisators zum Wirkort nur ein geringer anti-tumoraler Effekt erzielt werden konnte [99]. Ein weiterer großer Nachteil von hoch effektiven Photosensibilisatoren ist deren schlechte Löslichkeit aufgrund von stark hydrophoben Eigenschaften. Die Effektivität der photodynamischen Therapie ist maßgeblich von der Penetration des Photosensibilisators in das Tumorgewebe abhängig. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften kann es zur Bildung von Aggregaten kommen, die eine Tumorpenetration verhindern [100]. Dennoch ist eine orale Medikamentengabe meist zu bevorzugen, da diese für den Patienten eine vereinfachte Einnahme aufweist und somit eine hohe „Patientencompliance“ erzielt werden kann. Um diese zu ermöglichen, ist es nötig, neue Formulierungen für den gezielten Transport des Photosensibilisators zum Wirkort zu entwickeln.

1.4 Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme

Der gezielte Transport von Medikamenten zum Wirkort ist relevant für die Effektivität und die Verringerung von Nebenwirkungen. Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme können eingesetzt werden, um eine gezielte Akkumulation am Wirkort zu fördern und dadurch die Nebenwirkungen zu vermindern [101]. Nanopartikel für die medizinische Anwendung sind feste, biologisch abbaubare Kolloide mit einem Durchmesser von 10 bis 1.000 nm, die Arzneistoffe oder andere biologisch aktive Substanzen tragen können [102,103]. Studien zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Größe der Nanopartikel, dem gezielten Transport und der zellulären Anreicherung existiert. Beispielsweise konnte eine erhöhte Akkumulation von Nanopartikeln in einem Größenbereich von 100 bis 200 nm in Tumoren nachgewiesen werden, die auf den EPR-Effekt zurückzuführen ist [104]. Nanopartikel mit einer Größe von < 10 nm werden durch die Niere herausgefiltert [105]. Größere Nanopartikel mit einem Durchmesser von mehr als 200 nm lösen eine Aktivierung des Komplementsystems aus, woraufhin es zu einer schnellen Eliminierung aus dem Blutkreislauf und einer anschließenden Akkumulation der Nanopartikel in der Leber und Milz kommt [104,106]. Die

Standard-Struktur eines nanopartikulären Arzneistoffträgersystems besteht meist aus einem biokompatiblen Kern, der inkorporierten Substanz und einer beschichteten Oberfläche. Als Grundmaterialien werden aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit verschiedene synthetische Polymere wie Polyvinylalkohol (PVA), Polymilchsäure (PLA), Polyethylenglykol (PEG) und Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA) sowie natürliche Polymere wie Alginat, Humanes Serum Albumin (HSA) und Chitosan zur Herstellung von Nanopartikeln eingesetzt [107,108]. Wobei PLGA häufig als Basismaterial verwendet wird, da es neben seiner hohen Biokompatibilität und guten Abbaubarkeit von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) für die humane klinische Anwendung zugelassen wurde [109], ein hohes Potential zur Veränderung der Oberflächeneigenschaften aufweist und sich für den Einsatz in verschiedenen Ländern und Kulturen, in denen die Verwendung von tierischen Produkten eingeschränkt ist, eignet (Abbildung 14, A) [110]. Eine wichtige Eigenschaft von PLGA-Nanopartikeln ist die verzögerte Freisetzung des Wirkstoffes, die auf den hydrolytischen Abbau von PLGA zurückzuführen ist [111]. Die chemischen Eigenschaften von PLGA ermöglichen einen hydrolytischen Abbau der Esterbindungen, wodurch Polymilch- und Polyglykolsäuren entstehen. Die Polymere werden dann in monomeren Komponenten weiter gespalten, wobei die Polymilchsäure im Cytrazyklus und die Polyglykolsäuren durch die Umwandlung zu Metaboliten abgebaut werden [110,111]. Allerdings hat auch die Größe von Nanopartikeln einen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung. Kleinere Partikel haben ein größeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Daher befindet sich ein Großteil des inkorporierten Wirkstoffes nah an der Oberfläche, was zu einer schnelleren Wirkstofffreisetzung führt. Im Gegensatz dazu haben größere Partikel große Kerne, die eine langsamere Freisetzung ermöglichen [112]. Dadurch bietet die Optimierung der Partikelgröße ein Mittel zur Anpassung der Freisetzungsraten von Wirkstoffen. Zusätzlich kann die Abbaurate und damit die Freisetzungsrate des Arzneistoffes durch Variation des Verhältnisses von PLA und Polyglykolsäure (PGA) beeinflusst werden. Wird beispielsweise der Anteil an PGA erhöht, erfolgt die Degradation schneller als bei einem niedrigen PGA-Anteil [113,114]. Weitere Optimierungen können durch die Verwendung von PLGA in Kombination mit PVA und PEG vorgenommen werden. Durch die Verwendung dieser kann die Partikelgröße, die Degradationsrate und die zelluläre Aufnahme beeinflusst werden [115].

Ein weiteres vielversprechendes Trägermaterial für den Transport von Arzneistoffen stellen Liposomen dar (Abbildung 14, B). Liposomen bestehen aus zellmembranähnlichen Phospholipid-Doppelschichten. Aufgrund dieser Ähnlichkeit mit den Membranen von Zellen kann die Aufnahme von Wirkstoffen in die Zelle erleichtert werden [116]. Zudem können sie durch die Inkorporation zur Stabilität von Wirkstoffen beitragen und ihre biologische Verteilung verbessern. Dabei können sowohl hydrophile als auch hydrophobe Arzneistoffe inkorporiert

werden. Analog zu PLGA-basierten Nanopartikeln sind sie biokompatibel und biologisch abbaubar [101].

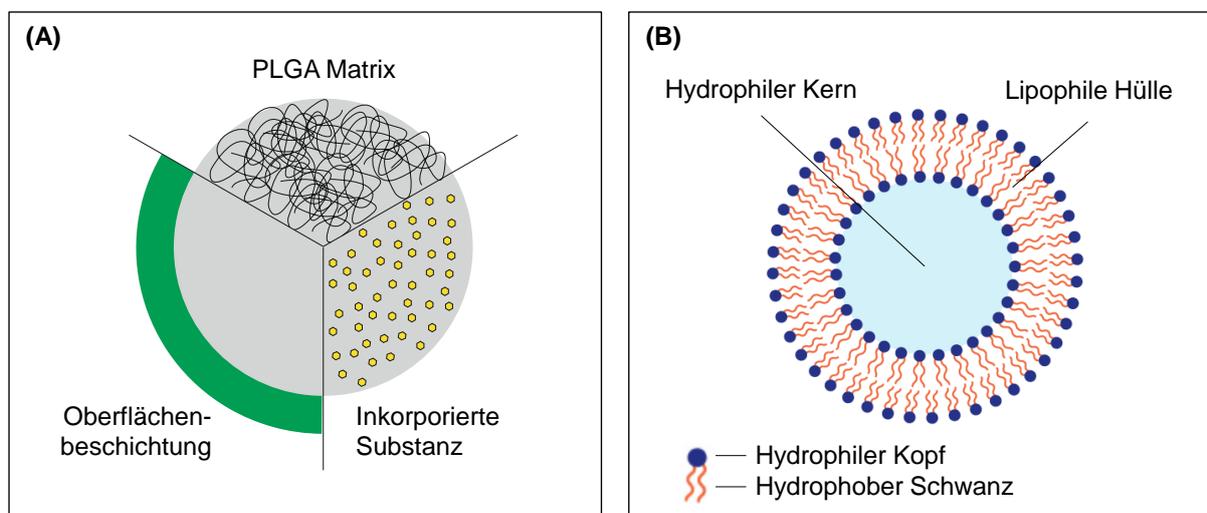


Abbildung 14: Schematische Darstellung PLGA-basierender Nanopartikel und Liposomen

(A) Ein auf dem Polymer Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA) basierender Nanopartikel, der eine inkorporierte Substanz und eine Oberflächenbeschichtung zeigt. (B) Liposomaler Nanopartikel bestehend aus amphiphilen Phospholipiden mit einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Schwanz, die als partikuläres System einen hydrophilen Kern und eine lipophile Hülle aufweisen.

Die Akkumulation der nanopartikulären Arzneistoffträger im Gewebe und damit die Aufnahme des Wirkstoffes in die Zellen ist ein wichtiger Aspekt für die Wirksamkeit eines Krebsmedikamentes. Dabei können zwei Wege für die Akkumulation von Nanopartikeln unterschieden werden, passives Targeting basierend auf dem EPR-Effekt und das aktive Targeting durch die Modifizierung der Oberfläche [117]. Des Weiteren hängt die Art der verwendeten nanopartikulären Formulierung und der Modifizierung zum einen vom Wirkstoff aber auch vom Wirkort und von der Einnahme des Medikamentes ab. Im Falle des zu behandelnden Dünndarmkarzinoms mittels PDT werden besondere Anforderungen in Bezug auf die zu überwindende Mukusbarriere gestellt. Dünndarmkarzinome, die in das Lumen des Darms einwachsen, sind von einer Mukusschicht umgeben [118–120]. Daher muss der zu transportierende Wirkstoff über die Mukusbarriere kommen, um den Wirkort zu erreichen. Dabei können zwei Strategien angewendet werden, zum einen die Entwicklung mukoadhärerender und zum anderen mukopermeierender Arzneistoffträgersysteme (Abbildung 15).

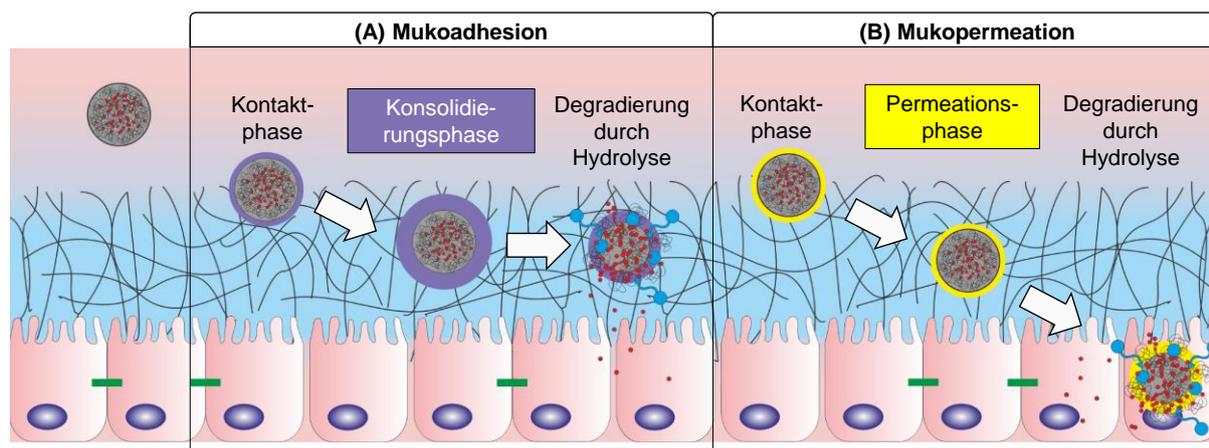


Abbildung 15: Aktives Targeting von Nanopartikeln mittels mukoadhesiver und mukopermeabler Oberflächenmodifizierung

Nach dem Eintreten des Nanopartikels in das Darmlumen, kommt es zu einer Kontaktphase mit der Mukusschicht. (A) Oberflächenmodifizierungen des Nanopartikels zur Mukoadhäsion führen in der Konsolidierungsphase zu einer Quellung der Polymerformulierung und einer Diffusion des Nanopartikels in die Mukusschicht. Dort kommt es zur Freisetzung des Wirkstoffes aufgrund der Degradierung des Nanopartikels durch Hydrolyse. (B) Eine Oberflächenmodifizierung zur Mukopermeation führt nach der Kontaktphase zu einer Permeationsphase durch die Netzstruktur der Mukusbarriere. Die Degradierung durch Hydrolyse findet an der Zelloberfläche oder nach Aufnahme des Nanopartikels in der Zelle statt. (Modifiziert nach Pillai et al. [121])

Bei der Mukoadhäsion kommt es zu einer Adhäsion zwischen der Mukusschicht und einem zweiten Material [122] (Abbildung 15, A). Für die Entwicklung von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen bedeutet dies, dass die Oberfläche eines Nanopartikels mit einem Material modifiziert werden muss, welches mukoadhäsive Eigenschaften aufweist. Nach der Verabreichung dieser Nanopartikel kommt es zu einem Kontakt zwischen dem adhäsiven Material und der Oberfläche der Mukusschicht und in der anschließenden Konsolidierungsphase zu einem Quellen der Oberfläche des Nanopartikels. Diese führt zu einer Penetration des nanopartikulären Systems in das Mukus-Netzwerk, wo durch Hydrolyse eine Degradation und somit eine Freisetzung des Wirkstoffes aus der Partikelmatrix stattfindet [121]. Für diesen Prozess gibt es eine Vielzahl von Polymeren, die durch ihre mukoadhäsiven Eigenschaften in der Lage sind, die Verweildauer des nanopartikulären Arzneistoffträgersystems in der Mukusschicht zu verlängern, was zu einer Erhöhung der Wirkstoffakkumulation im Tumor führt [123]. Ein häufig genutztes Polymer natürlichen Ursprunges ist Chitosan, das aufgrund seiner hohen Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit für die Formulierung pharmazeutisch aktiver Substanzen mit dem Ziel zur Mukoadhäsion häufig eingesetzt wird [124,125]. Gründe für die mukoadhäsiven Eigenschaften von Chitosan sind zum einen die hydrophilen Gruppen, die eine Absorption von Wasser und somit ein Quellen begünstigen. Zum anderen kommt es zwischen dem kationischen Chitosan und den negativ geladenen Mucinen zu elektrostatischen Wechselwirkungen, die die Adhäsion verstärken [126]. Ein Beispiel für ein stark mukoadhäsives synthetisches Polymer ist die Polyacrylsäure (PAA). Die mukoadhäsiven Eigenschaften basieren auf der Fähigkeit der

Carboxylgruppen der PAA unter Bildung starker Wasserstoffbrückenbindungen mit den Oligosaccharidketten der Mucine. Zusätzlich kommt es zu einer physikalischen Verflechtung der Polymere und den Mucinfasern [127]. Eine Gruppe von PAA-Polymeren sind Carbopole, die in der Pharmazie häufig als Emulgatoren und Geliermittel für topische Formulierungen verwendet werden [128]. Zudem weisen sie starke mukoadhäsive Eigenschaften, aufgrund von mechanischer Interpenetration der Polymerketten sowie der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und durch ionischen Wechselwirkungen, auf [129].

Die zweite Strategie zum Transport von Wirkstoffen zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen ist die Permeation der Nanopartikel über die Mukusbarriere. Generell führen die sterischen Eigenschaften des Mukus dazu, dass kleine Nanopartikel leichter über das Mukusnetzwerk permeieren können als größere [130]. Zusätzlich kann durch die Modifikation der Oberfläche eine Mukopermeation erzielt werden. Dabei kann ein passiver und aktiver Transport unterschieden werden. Beim passiven Transport ist das Ziel Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln und der Mukusschicht zu vermeiden. Nachdem das nanopartikeläre Arzneistoffträgersystem im Lumen des Dünndarms angekommen ist, kommt es zu einer Kontaktphase zwischen dem Nanopartikel und der Mukusoberfläche. Aufgrund nicht vorhandener Wechselwirkungen der beiden Materialien kann der Nanopartikel die Mukusschicht permeieren. Die Freisetzung des Wirkstoffes erfolgt dann an der Zelloberfläche oder nach Aufnahme des Nanopartikels in die Zelle durch Hydrolyse (Abbildung 15, B). Um diese Eigenschaften zu erreichen, wird häufig Polyethylenglycol (PEG) zur Oberflächenmodifikation eingesetzt. Durch die Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanopartikeln mit PEG kommt es zur Bildung einer dichten bürstenartigen Oberfläche, die die negative Grundladung von PLGA-Nanopartikel abschirmen können, was zu einer Verringerung der Wechselwirkungen mit der Mukusschicht führt [131,132]. Ein weiteres häufig genutztes Polymer zur passiven Mukopermeation ist das Poloxamer Pluronic® F127, ein nichtionisches Triblockcopolymer. Aufgrund seiner hydrophilen und hydrophoben Polymerketten weist es amphiphile Eigenschaften auf. Die Modifizierung von Nanopartikel mit Pluronic® F127 führt daher zu einer Reduktion der Wechselwirkungen zwischen dem nanopartikelären Arzneistoffträgersystem und der Mukusschicht. Zusätzlich führt diese Modifikation zu einer hohen Nanopartikelstabilität [133]. Neben der passiven Mukopermeation kann auch eine aktive Permeation der Nanopartikel über die Mukusschicht angewendet werden. Hierzu werden häufig mukolytische Substanzen zur Oberflächenmodifizierungen verwendet. Diese werden meist nachdem Kontaktstadium mit der Mukusoberfläche langsam durch Hydrolyse aus dem Partikelsystem freigesetzt und führen zu einer lokalen Viskositätsminderung der Mukusschicht, die eine Permeation der Nanopartikel erleichtert [129]. Ein Beispiel hierfür ist die Substanz N-Acetylcystein, die Aufgrund ihrer Fähigkeit, Disulfidbrücken in den Glykoproteinen der Mucine zu spalten, schleimlösende

Eigenschaften ausweist [134]. Des Weiteren eignen sich mukolytische Enzyme wie Papain, die mit hoher Effektivität Amid-Bindungen der Mucin Glykoproteine aufspalten, wodurch die Nanopartikel einfacher die Mukusschicht überwinden können [135].

Im Zusammenhang mit der photodynamischen Therapie ist die Inkorporation des Photosensibilisators in liposomale oder polymer-basierte nanopartikuläre Systeme ein vielversprechender Ansatz, um den Wirkstofftransport zu verbessern. Eine der größten Limitationen in der PDT sind die hydrophoben Eigenschaften der Photosensibilisatoren und ihre Neigung unter physiologischen Bedingungen Aggregate zu bilden, die eine Penetration in das Tumorgewebe vermindern [136]. Die intravenöse Applikation des Photosensibilisators führt zudem zu hohen Nebenwirkungen, aufgrund von unspezifischer Akkumulation im Körper. Versuche den Photosensibilisator oral zu verabreichen, haben zu einer unzureichenden Arzneistoffakkumulation am Wirkort geführt und dadurch keinen ausreichenden therapeutischen Effekt erzeugt [99]. Durch die Inkorporation in ein nanopartikuläres Arzneistoffträgersystem kann die Löslichkeit, Stabilität und somit die Bioverfügbarkeit verbessert werden [102,136–138]. Des Weiteren bieten nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme eine kontrollierbare Freisetzung des Photosensibilisators aus der nanopartikulären Matrix. Durch geeignete Modifizierung der Oberfläche kann die Akkumulation am Wirkort erhöht werden und unspezifische Akkumulation in gesundem Gewebe verhindert werden, was zu einer Vermeidung von Nebenwirkungen führt. Ein Beispiel für einen vielversprechenden nanopartikulären Photosensibilisator für die PDT ist das Medikament Foslip[®], bei dem der Photosensibilisator mTHPC in eine liposomale Formulierung inkorporiert wurde. Daten zeigen, dass die liposomale Formulierung von mTHPC eine höhere Wirksamkeit und eine geringere Schädigung von gesundem Gewebe und Toxizität bei Abwesenheit von Licht im Vergleich zu Foscan[®] aufweisen [139]. Foslip[®] wird aktuell noch in präklinischen Studien untersucht und steht daher noch nicht für die klinische PDT zur Verfügung (Stand Juli 2020, [140]).

1.5 Präklinische Testsysteme

Potenzielle neue Arzneistoffe werden in der präklinischen Forschung auf ihre Wirksamkeit und toxikologischen Eigenschaften untersucht. Ziel dieser Studien ist es einen oder mehrere vielversprechende Arzneistoffe zu identifizieren und dabei umfangreiche Nachweise über deren Wirksamkeit und toxikologische Sicherheit zu liefern, so dass In-vivo-Studien durchgeführt werden können. Dabei hängt die Auswahl der geeigneten Testmodelle von der zu behandelnden Krankheit und der zu untersuchenden Fragestellung ab. Aufgrund der hohen Anzahl potenzieller neuer Arzneistoffe werden zu Beginn der Entwicklung eines Medikaments Screening-Modelle benötigt, die eine schnelle und kostengünstige Untersuchung der Wirksamkeit und Toxizität ermöglichen. Zellbasierte Testsysteme sind ein wesentliches

Element in der Arzneistoffentwicklung. Im Vergleich zu kostenintensiven Tiermodellen sind Tests auf Basis von Zellkulturen einfach, schnell, kostengünstig, vielseitig und leicht reproduzierbar durchzuführen [141]. Für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente eignen sich Zelllinien, die ihren Ursprung aus Tumoren in der zu behandelnden Region haben. Die meisten Zellkultur-Tests, die in der Arzneimittelforschung verwendet werden, sind 2D-Monolayer-Zellkulturen, die auf flachen und starren Kunststoffoberflächen kultiviert werden [142]. Die zu untersuchende Substanz kann über einen bestimmten Zeitraum inkubiert werden, um deren biologischen und toxischen Effekt mittels standardisierter Tests zu untersuchen. Diese 2D-Monolayer Zellkultursysteme eignen sich für automatisierte Hochdurchsatz-Screening-Verfahren, die eine erste Identifikation potentieller Arzneistoffe ermöglichen [143]. Ein Nachteil von 2D-Monolayer-Zellkulturen ist, dass sie die komplexen physiologischen Bedingungen eines In-vivo-Tumors kaum nachbilden können und somit Rückschlüsse auf das In-vivo-Verhalten nur schwer geschlossen werden können. Mit 3D-Tumorsphäroiden kann die gewebsspezifische Struktur von In-vivo-Tumoren und die daraus resultierenden physiologischen Bedingungen zumindest teilweise abgebildet werden [143]. Ähnlich wie Micrometastasen weisen Tumorsphäroide, die einen Durchmesser von mehr als 500 µm haben, einen physikochemischen Gradienten auf (Abbildung 16) [144]. Dieser führt dazu, dass die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff von der Oberfläche zur Mitte des Tumorsphäroids abnimmt. Gleichzeitig kommt es zu einer Ansammlung von Kohlenstoffdioxid und Abfallprodukten im Inneren des Tumorsphäroids. Daraus entstehen verschiedene Zellschichten innerhalb des Tumorsphäroids, eine vitale Randschicht mit proliferierenden Zellen und ein Kern mit nekrotischen Zellen. Zwischen diesen Schichten ist zusätzlich eine Zellschicht mit Zellen, die sich in der Ruhephase befinden und daher nicht proliferieren, diese Eigenschaft aber wieder aktivieren können [144–146]. Die verringerte Wirkstoffpenetration im Tumorsphäroid führt dazu, dass diese meist eine verringerte Sensitivität im Vergleich zu Monolayer-Zellkulturen gegenüber Krebsmedikamenten aufweisen [143]. Untersuchungen mit 3D-Tumorsphäroiden werden daher bei der Entwicklung neuer Krebsmedikamente für die Auswahl wirksamer Arzneistoffe genutzt und können aufgrund ihrer Eigenschaften, Mikrometastasen *in vitro* zu simulieren, einen Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen leisten [147]. Insgesamt können daher 3D-Tumorsphäroide als Erweiterung zu den Untersuchungen mit 2D-Monolayer-Zellkulturen angesehen werden.

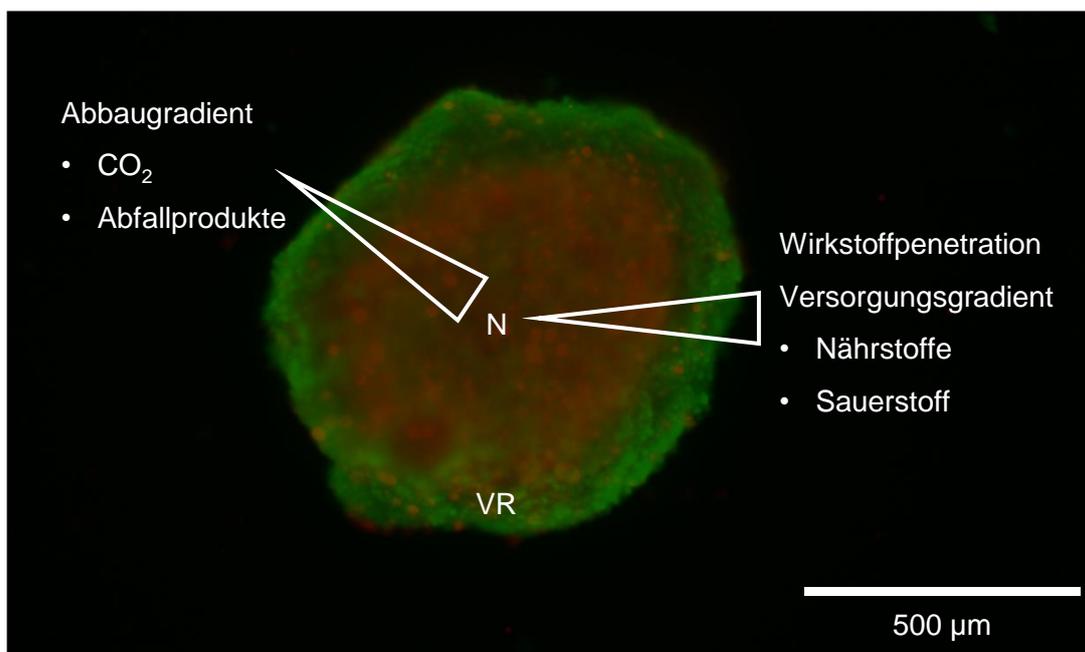


Abbildung 16: Morphologie eines Tumorsphäroids

Lebend-Tod-Färbung eines Tumorsphäroids der Zelllinie HuTu-80 (Duodenum Adenokarzinoma Zellen). Gleichzeitige Fluoreszenz Färbung von vitalen Zellen (Calcein-AM, grün) und toten Zellen (Propidium Iodid (PI), rot). Die vitale Randschicht (VR) umgibt den nekrotischen Kern (N). Die physikochemischen Abbau- und Versorgungsgradienten sind schematisch dargestellt.

Die Entwicklung eines neuen Medikaments beinhaltet neben der Identifikation des Arzneistoffes auch die Entwicklung einer geeigneten Formulierung. Die Wirksamkeit eines Arzneistoffes hängt maßgeblich von der Bioverfügbarkeit ab, die hauptsächlich durch die Löslichkeit und Permeabilität bestimmt wird [148]. Daher sind pharmazeutische Formulierungen ein wichtiger Bestandteil in der akademischen und industriellen Forschung. Allgemein wird die orale Arzneistoffgabe aufgrund der hohen Patient compliance und der kosteneffektiven Art der Wirkstoffgabe bevorzugt [123]. Oral eingenommene Medikamente müssen eine Vielzahl physiologischer Barrieren überwinden, bevor sie den Wirkort erreichen. Eine häufig verwendete Formulierungsmethode ist die Verwendung von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen. Dabei kann die Inkorporation in Nanopartikel die Stabilität und Löslichkeit des Arzneistoffes verbessern und zum anderen kann durch die Modifizierung der Oberfläche eine nachhaltige Freisetzung am Wirkort ermöglicht werden. Die Wahl des nanopartikulären Systems und der Oberflächenmodifizierung ist daher maßgeblich von den Eigenschaften des Arzneistoffes und dem Wirkort abhängig. Zur Charakterisierung nanopartikulärer Arzneistoffträger stehen in der präklinischen Forschung verschiedene Methoden zur Verfügung. Zunächst werden meist grundlegende Daten, wie die Messung der Partikelgröße, des Polydispersitätsindex (PDI) zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung und die Oberflächenladungen mittels Zetapotential (ZP), ermittelt. Des Weiteren können die Zusammensetzung und die Menge der inkorporierten Substanz durch die Verwendung analytischer Verfahren untersucht werden. Die Morphologie eines Nanopartikels kann durch

bildgebende Verfahren wie die Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), veranschaulicht werden. Die Überprüfung der Sicherheit wird meist in toxikologischen In-vitro-Untersuchungen analog zu den Wirksamkeitsstudien des Arzneistoffes mit standardisierten 2D- und 3D-Zellkultursystemen durchgeführt. Jedoch können diese Methoden keinen Aufschluss über die Fähigkeit des Nanopartikels, den Wirkstoff zum Wirkort zu transportieren, erbringen, was spezielle präklinische Untersuchungsmethoden erforderlich macht. In dieser Arbeit stehen die mukoadhärenierenden und mukopermeierenden Eigenschaften der entwickelten nanopartikulären Formulierungen im Vordergrund. Ausgehend von dem zu behandelnden Dünndarmkarzinom werden Modellsysteme benötigt, die eine Untersuchung der Darmbarriere ermöglichen.

Ein umfangreich untersuchtes und häufig genutztes In-vitro-Modell zur Untersuchung der intestinalen Barriere ist das Caco-2-Zellkulturmodell [26,149]. Caco-2-Zellen wurden aus menschlichen kolorektalen Adenokarzinomzellen gewonnen. Bei der Kultivierung von Caco-2 Zellen kommt es zu einer spontanen Differenzierung, die den Zellen ähnliche morphologische und biochemische Eigenschaften, wie sie bei Enterozyten des Dünndarms vorkommen, verleiht. Dazu gehört unter anderem die Ausbildung von Mikrovilli an der apikalen Seite sowie vorhandene enzymatische hydrolytische Aktivitäten [149]. Der größte Nachteil dieses Systems ist das Fehlen einer Mukusschicht [26,150]. In Anbetracht dessen, dass oral applizierte nanopartikuläre Formulierungen an die Mukusschicht adhären oder permeieren sollen, stellt das Caco-2-Modell aufgrund der fehlenden Mukusschicht ein ungeeignetes System dar.

Eine alternative Zelllinie ist die Mukus-produzierende Zelllinie HT29-MTX-E12. Diese Zelllinie ist ein Klon der Zelllinie HT29, abgeleitet vom kolorektalen Adenokarzinom, die in Becherzellen differenziert wurden. Sie können als verbessertes In-vitro-Mukosa-Modell in Form von 2D-Monolayer-Zellkulturen oder kultiviert auf permeablen Filtereinsätzen, um den Transport über die Mukosa-Barriere zu untersuchen, eingesetzt werden [26,151]. Diese auf Zelllinien basierenden Modelle ermöglichen die Untersuchung der Permeation von Wirkstoffen und nanopartikulären Formulierungen über eine mit Mukus bedeckte Zellschicht. Ein Nachteil dieser Systeme sind die statischen Versuchsbedingungen, die sich stark von den physiologischen Begebenheiten *in vivo* unterscheiden. *In vivo* tragen fluidische Reize zu Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und der Mukusbarriere bei und haben dadurch einen Einfluss auf die Adhäsion und Permeation der Nanopartikel. Kenntnisse über diese Einflüsse können zu einem Verständnis der Verteilung und zellulären Aufnahme von Arzneistoffen und Nanopartikeln beitragen. Ein gängiges dynamisches Modell zur Untersuchung des Transports von Medikamenten über die Darmbarriere ist das Ussing-Kammer-System [152,153]. Das System besteht aus zwei Kammern, die meist durch intestinale Zellen oder Gewebe getrennt sind. Durch eine Begasung mit einem Gasgemisch

aus Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid (Carbogen) wird das Kammermedium in Bewegung versetzt und gleichzeitig die Epithelschicht mit Sauerstoff versorgt. Die Darmepithelien sind eines der am besten untersuchten Gewebe im Ussing-Kammer System [153]. Es eignet sich daher für die Untersuchung der Permeation von Arzneistoffen und nanopartikulären Formulierungen über die Darmbarriere [152]. Einige Arzneistoffe oder Nanopartikel scheitern jedoch bereits daran, die Mukusschicht zu überwinden [154,155]. Dies hat dazu geführt, dass das Interesse an der Entwicklung neuer Mukus-Modelle zur Untersuchung des Arzneistofftransportes eine wichtige Rolle in der Forschung spielen [156]. Ein simples Modell zur Untersuchung der Mukuspermeation von Substanzen und nanopartikulären Formulierungen ist die Verwendung von permeablen Filtereinsätzen. Der Mukus wird in diesem Modell direkt auf einen Filtereinsatz appliziert und die Mukuspermeation kann ohne Berücksichtigung einer Epithelschicht untersucht werden [157,158]. Des Weiteren wurden zur Untersuchung der Mukuspermeabilität unter dynamischen Bedingungen mikrofluidische Modelle entwickelt. Ein Beispiel hierzu ist das Modell von Li et al., bei dem ein fluidischer Fluss über eine Mukusschicht mit einer Schichtdicke von 250 μm fließt. Mit dieser Konstruktion wurde die Verteilung von fluoreszenzmarkierten Peptiden in der Mukusschicht untersucht, woraus Rückschlüsse auf die Partikel-Diffusion gemacht werden konnten [159]. Die beschriebenen Mukus-Modelle können zur Untersuchung der mukuspermeierenden Eigenschaften eingesetzt werden.

Die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Tumoren erfordert den Einsatz von In-vitro- und In-vivo-Modellen (Tiermodelle) [5]. In Anbetracht der beschriebenen präklinischen In-vitro-Testsysteme ist es möglich den anti-tumoralen Effekt und unerwünschte toxische Effekte von freien Photosensibilisatoren und deren nanopartikulären Formulierungen mit 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden zu untersuchen. Dies ermöglicht eine Identifikation von Photosensibilisatoren und nanopartikulären Formulierungen, die einen anti-tumoralen Wirkung ohne unerwünschte toxische Effekte aufweisen. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus In-vitro-Studien ist die Vorhersagekraft für die therapeutische Wirksamkeit bei der Behandlung von Patienten limitiert [160,161]. Eine entscheidende Limitation der In-vitro-Testsysteme ist die fehlende Vaskularisierung. Das Wachstum eines Tumors *in vivo* führt zu einer Angiogenese und damit zu einem Anschluss an das Gefäßsystem des Körpers, wodurch eine Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff ermöglicht wird [162]. Dies kann Auswirkungen auf die systemische Verteilung und Akkumulation der Arzneistoffe und deren Formulierungen haben, die kaum mit In-vitro-Modellen reflektiert werden können. Tiermodelle spielen daher nach wie vor eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Validierung von neuen Krebsmedikamenten [163–165]. In-vivo-Studien erfordern jedoch in der Regel spezielle Fähigkeiten und Genehmigungen der Ethikkommission und sind daher zeit- und kostenintensiv [166]. Zudem gibt es ethische

Bedenken, da dem Tier Schaden und beträchtliches Leid zugefügt wird, oft bis hin zum Tod. Im Sinne des 3R-Prinzips Replace (Vermeiden), Reduce (Verringern), Refine (Verbessern) sollten daher in der präklinischen Forschung alternative Testsysteme entwickelt und angewendet werden [167]. Eine mögliche Alternative zur Untersuchung von vaskularisierten Tumoren ist die Nutzung des Hühnerei-Tests an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM). Die CAM ist eine stark vaskularisierte Membran, die für die arterielle Versorgung des Embryos zuständig ist (Abbildung 17). Der HET-CAM-Test ist ein klassisches biologisches Modell zur Untersuchung der Angiogenese. Die Verwendung dieses Tests in Kombination mit Tumormodellen bietet neue Möglichkeiten zur Studie von Tumorprozessen. Tumorsphäroide können hierfür direkt auf die CAM appliziert werden, was eine Angiogenese induziert und das Gefäßwachstum fördert. Die Gefäße der CAM wachsen in den Tumorsphäroid ein und es kommt zu einer Vaskularisierung. Daraus resultiert ein Anschluss des Tumorsphäroids an das Gefäßsystem des Eies und damit eine Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Auf diese Weise kommt es zu einem Wachstum der Zellpopulation auf der CAM [168,169]. Die Gewebezusammensetzung und Zugänglichkeit der CAM für die experimentelle Manipulation macht sie zu einem attraktiven präklinischen In-vivo-Modell für das Wirkstoffscreening oder für Studien zum Gefäßwachstum [166,170,171].

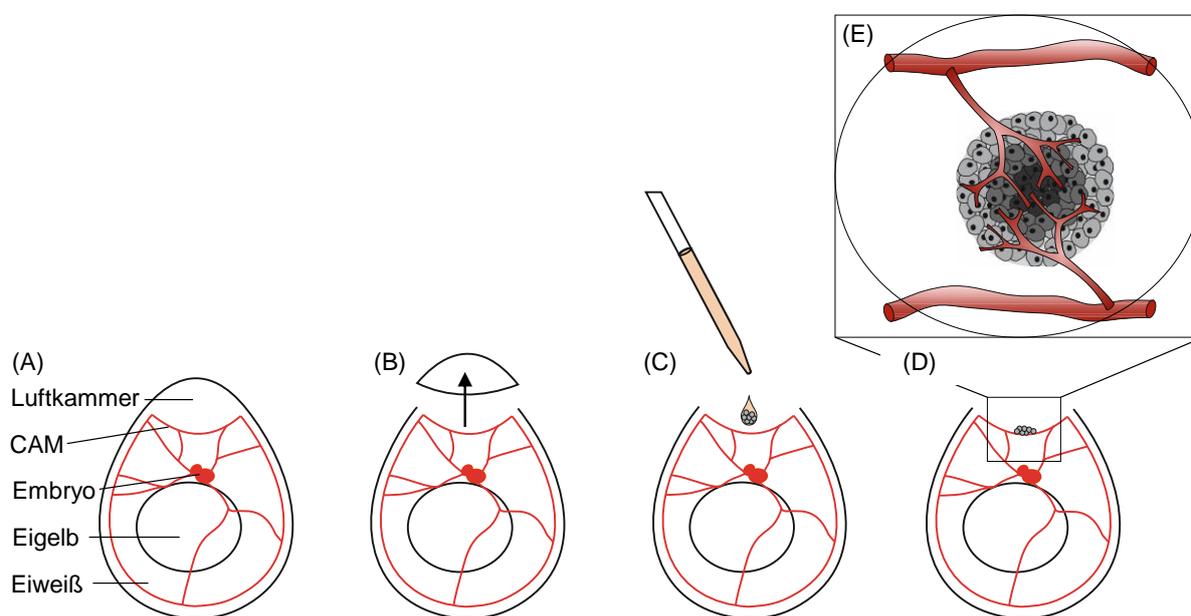


Abbildung 17: Übersichtabbildung des HET-CAM-Tests zur Vaskularisierung von Tumorsphäroiden

(A) Die schematische Darstellung eines befruchteten Hühnereis zeigt die Luftkammer, die Chorion-Allantois-Membran (CAM), den Embryo, das Eigelb und Eiweiß. (B) Zur Freilegung der CAM kann das Ei an der Luftkammer geöffnet werden. (C) Die Applikation der Tumorsphäroide kann direkt durch Applikation auf die CAM erfolgen. (D) Nach der Applikation der Tumorsphäroide induzieren diese eine Angiogenese und Vaskularisierung. (E) Aufsicht auf einen vaskularisierten Tumorsphäroid.

Die beschriebenen präklinischen Testsysteme geben einen Überblick über aktuell etablierte Untersuchungsmethoden, die für Beurteilung von Arzneistoffen und deren Formulierungen zur Verfügung stehen. Aufgrund der Vielzahl neuer potenzieller Arzneistoffe und Formulierungen bleibt jedoch die Entwicklung von innovativen In-vitro-Modellen, die eine verbesserte In-vivo-Simulation aufweisen eine Herausforderung für die präklinische Forschung.

2 Ziele der Arbeit

Die Entwicklung, Untersuchung und Erprobung neuer Medikamente ist eine Herausforderung für die akademische und industrielle Forschung. Dabei ist die Identifikation eines potenziellen neuen Arzneistoffes nur der erste Schritt im Entwicklungsprozess eines Medikaments. Es folgt ein Optimierungsprozess mit dem Ziel, den Arzneistoff besser, schneller und effektiver zu machen. Zu diesem Zweck stehen Wirkstoffformulierungen wie nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme zur Verfügung. Nanopartikel können die Löslichkeit, Stabilität und somit die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes verbessern. Zudem können sie durch spezifische Oberflächenmodifizierung gezielt am Wirkort akkumulieren und damit Nebenwirkungen in der Peripherie reduzieren. Zur Untersuchung von Arzneistoffen und deren Formulierungen werden geeignete präklinische In-vitro-Testsysteme benötigt. Dabei können realitätsnahe In-vitro-Testsysteme die steigenden Anforderungen der Wirksamkeits- und Sicherheitsnachweise für Arzneimittel und deren Formulierungen erfüllen und so dazu beitragen, Tierversuche gemäß zwei der Bedingungen des „3R“-Prinzips zu vermeiden (Replace) und zu verringern (Reduce). Daher haben spezifische präklinische Testsysteme eine wichtige Bedeutung bei der Entwicklung neuer Medikamente.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist der Einsatz der photodynamischen Therapie zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen. Als Wirkstoff sollte der Photosensibilisator mTHPC sowie weitere neu synthetisierte Photosensibilisatoren eingesetzt werden. Da Photosensibilisatoren im allgemeinen stark hydrophobe Eigenschaften aufweisen, die zu einer schlechten Bioverfügbarkeit und hohen Nebenwirkungen aufgrund unspezifischer systemischer Akkumulation führen, sollten neue, auf nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen basierende Formulierungen, entwickelt werden. Die Aufgabe des Nanopartikels ist der Transport und die Freisetzung des Photosensibilisators am Wirkort, wobei die gezielte Akkumulation am Wirkort gleichzeitig zu einer Verringerung der Nebenwirkungen führen soll. Um dies zu erreichen, muss jeder einzelne Schritt von der Synthese der Nanopartikel über den Transport, bis zur Wirkstofffreisetzung und Akkumulation am Wirkort effizient ablaufen. In Anbetracht der Lage und Ausbreitung des Dünndarmkarzinoms im Darmlumen, stellt die Mukusbarriere eine besondere Herausforderung für die Anreicherung am Tumorgewebe dar. Das wissenschaftliche Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung von Modellsystemen, die eine Untersuchung des Transportes der Photosensibilisators, speziell über die Mukusbarriere und die darauffolgende Akkumulation in den Tumorzellen ermöglicht, um hochwirksame Photosensibilisatoren und nanopartikuläre Formulierungen für die Behandlung von Dünndarmkarzinomen zu identifizieren. Zunächst sollten nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme mit mukoadhäsiven und mukopermeablen Eigenschaften auf Basis des Polymers PLGA bzw. Liposomen entwickelt, hergestellt und getestet werden. Zur Untersuchung der zellulären Verträglichkeit

(Zytotoxizität) und des induzierten phototoxischen Effekts der freien und nanopartikulär gebundenen Photosensibilisatoren ist die Aufgabe geeignete 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide zu etablieren. Eine zusätzliche Fragestellung ist die Untersuchung der zellulären Akkumulation des Photosensibilisators. Zur Quantifizierung der zellulären Akkumulation sollte eine HPLC-Analyse Methode entwickelt und nach ICH-Guideline validiert werden. Ziel dieser Screening-Untersuchungen soll die Identifikation von freien und nanopartikulär gebundenen Photosensibilisatoren sein, die nachweislich einen lichtinduzierten anti-tumoralen Effekt aufweisen, wobei gleichzeitig ein dunkeltoxischer Effekt der freien Photosensibilisatoren und ein zytotoxischer Effekt der Nanopartikel ausgeschlossen werden muss. Nach der Identifikation von vielversprechenden freien und nanopartikulär gebundenen Photosensibilisatoren soll eine fokussierte Untersuchung der mukoadhäsiven und mukopermeierenden Eigenschaften durchgeführt werden. Hierfür ist es nötig In-vitro-Testsysteme zu entwickeln, die eine Untersuchung der Permeation über die Mukusschicht und die Adhäsion an eine Mukusschicht unter dynamischen Bedingungen ermöglichen. Außerdem sollen die Akkumulation und der induzierte phototoxische Effekt an einem zu entwickelnden vaskularisierten Tumor-Modell untersucht werden. Als Basis für das Modell ist die Etablierung des HET-CAM Systems vorgesehen, das als Bindeglied zwischen In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen dienen soll. Hierfür ist es zudem erforderlich, eine Bestrahlungseinheit aufzubauen, die eine fokussierte Bestrahlung des vaskularisierten Tumorsphäroids *in ovo* ermöglicht.

Anhand der erzeugten Ergebnisse aus den Screening-Untersuchungen und Studien mit den neu entwickelten spezifischen Testsystemen soll ermöglicht werden hoch wirksame Photosensibilisatoren und nanopartikuläre Formulierungen für die Behandlung von Dünndarmkarzinomen zu entwickeln und zu identifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien für die Analytik mittels HPLC besaßen analytischen Reinheitsgrad. Die verwendeten Materialien für die Zellkulturtechnik wurden vor der Verwendung für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert oder vom Hersteller steril geliefert.

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
1260 Infinity HPLC System mit quaternärer Pumpe, Säulenthermostat, automatischer Probengeber und Diodenarray-Detektor	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland
Absaugpumpe	Integra Bioscience GmbH, Biebertal, Deutschland
Analysenwaage Secura	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage, CP64	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Bestrahlungseinheit	Eigenbau Fraunhofer IBMT, Sulzbach, Deutschland
Bestrahlungseinheit PDT 1200	Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Deutschland
Binokular Olympus SZX 9	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
BRUJA COB-LED-Schierlampe	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Brutschrank BK 4029	Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
CASY® Cell Counter & Analysesystem, Model TT	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen, Deutschland
Cero	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen, Deutschland
Exsikkator	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FACSCalibur™, Durchflusszytometer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop IX70	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Heizplatte/Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Irisblende	Thorlabs GmbH, Bergkirchen, Deutschland
Kamera Pen Light E-PL 7	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Konfokales Laserraster-Mikroskop TCS SP8	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Kryostat CM3050 S	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Laserdiode, Peak-Wellenlänge 635 nm, 30 mW	Thorlabs GmbH, Bergkirchen, Deutschland
Laserdiode, Peak-Wellenlänge 375 nm, 4 mW	Thorlabs GmbH, Bergkirchen, Deutschland
Laserstrahl- & Spektralmessgerät (LaserCheck™)	Melles Griot GmbH, Bensheim, Deutschland
Magnetrührer Cimarec i Multipoint	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Magnetrührer Multipoint HP6	Variomag Corporation, Daytona Beach, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Mikroskop CKX31, Phasenkontrast IX2-SLP	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Mini-UniPrep™ G2	GE Healthcare Life Sciences, Whatman™, Maidstone, Vereinigtes Königreich
Motorschrankbrüter Bruja 168/EM	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg, Deutschland
Motorschrankbrüter Hemel Top Profi 300	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co.KG, Verl, Deutschland
Mucus-Spatel	Eigenbau Fraunhofer IBMT, Sulzbach, Deutschland
Multifunktionswerkzeug Dremel 400	GW-Werkzeuge, Heroldsberg, Deutschland
Peristaltikpumpe, Ismatec Reglo Digital	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
pH-Messgerät FiveEasy Plus FEP20	Mettler-Toledo AG, Gießen, Deutschland
Poroshell 120 EC-C18	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Deutschland
Rheometer Physica MCR 101	Anton Paar GmbH, Ostfildern, Deutschland
Säule Poroshell 120 EC-C18, 4,6 * 50 mm, 2,7 µm	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Deutschland
Stereomikroskop SZX16	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Tecan Reader Infinite 200	Tecan Group Ltd., Maennedorf, Schweiz
ThermoMixer Compact 5350	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trockenschrank ED 23	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Ultrafeinwaage XP6U	Mettler-Toledo AG, Gießen, Deutschland
Ultraschallbad Elmasonic S15	Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator, Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV-Plano-Konvexlinse, asphärisch	Thorlabs GmbH, Bergkirchen, Deutschland
Verdrängungspipette	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Vortexer Top-Mix 11118	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Wärmeschrank BK4029	EHRET GmbH Life Science Solutions, Freiburg, Deutschland
Wasserbad Typ 1003, No 11434207K	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 3K18	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Gebrauchsgegenstände

Bezeichnung	Hersteller
6-, 24-, 96-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Aluminiumfolie	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Alu-Schalen	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Aspirationspipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Bruteier, Huhn	LSL Rhein-Main GmbH & Co. KG, Dieburg, Deutschland
Capillary Cell	Malvern Panalytical GmbH, Herrenberg, Deutschland
Cero tube	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen, Deutschland
Corning® Transwell®	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Costar 3471, 6-Well Ultra Low Cluster Plate	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Cryomold Einbettgeschälchen	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Einmalpipetten mit Wattestopfen (2,5, 10 und 25 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einwegspritzen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Frischhaltefolie	Lakeland company, Windermere, Vereinigtes Königreich
Glasgefäße	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
HPLC Probefläschchen und Deckel	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Deutschland
Kryovial	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Küvetten, PMMA, halbmikro	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Laborschlauch, SILASTIC® Innendurchmesser 1,57 mm und Außendurchmesser 3,18 mm	Dow® Corning Corporation, Wiesbaden, Deutschland
Luer und Lock Adapter	Ibidi GmbH, Planegg, Deutschland
Parafilm	American National Can. Co., Chicago, USA

Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pinzetten, verschiedene	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pipettierwannen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
REM Probenteller	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Scheren, verschiedene	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Spritzenfilter 2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Spritzenfilteraufsatz 0,45 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vakuumfiltrationseinheit 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, Falcon®	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Acetonitril	Avantor Performance Material B.V., Deventer, Niederlande
alamarBlue™ Viabilitätsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Alcianblau	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumoxid-Keramik	CoorsTek Corporation, Golden, USA
Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BLC 1157, BLC 2175, BLC 5152, BLC 6151, BLC 6166, BLC 6167	Zur Verfügung gestellt von biolitec® research GmbH, Jena, Deutschland
Calcein-AM	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Cacodylat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Carbopol 971P NF	Lubrizol Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
CASY®ton	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulf3.oxid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

FITC-Dextran, 70 kDa	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Formaldehydlösung 10 %, gepuffert, pH 6,9	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fötiales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaptonfolie (Polyimid)	GoodFellow GmbH, Friedberg, Deutschland
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Koffein	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
mTHPC (Foscan®)	Zur Verfügung gestellt von biolitec® research GmbH, Jena, Deutschland
mTHPP	Zur Verfügung gestellt von biolitec® research GmbH, Jena, Deutschland
N-Acetylcystein	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Natriumcacodylat, 0.1 M-Pufferlösung, pH 6.8	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid, Pellets	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
NeoMount®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	LifeTechnologies Corporation, Carlsbad, USA
Phosphatpuffer (PBS), pH 7,2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PLGA P2191	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Pluronic F-127 (Poloxamer 407)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Reinstwasser	Hausinterne Milli Q Anlage
Resomer® RG 503 H (PLGA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Saponin von der Quillaja-Rinde	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Schweinedarm	Emil Färber GmbH & Co. KG, Zweibrücken, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Praxair Deutschland GmbH, Dillingen, Deutschland
Tissue-Tek®	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trifluoressigsäure 99 %	Avantor Performance Material B.V., Deventer, Niederlande
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.1.4 Analysesoftware

Bezeichnung	Hersteller
Agilent ChemStation	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Deutschland
CASYexcell	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
CellIP 5.1	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
CellQuest™ Pro Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
ImageJ 1.52a	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA

3.1.5 Zelllinien

Zelllinie	HuTu-80
Bezugsquelle	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland
Spezies	Homo sapiens (human)
Zelltyp	Duodenum Adenocarcinoma

Zelllinie	HT29
Bezugsquelle	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Spezies	Homo sapiens (human)
Zelltyp	Colorectales Adenocarcinoma

Zelllinie	HT29-MTX-E12
Bezugsquelle	ECACC/ Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Spezies	Homo sapiens (human)
Zelltyp	Differenzierte HT29-Zellen, Mukus sekretierende Becherzellen

3.1.6 Zellkulturmedien

HuTu-80 Zellkulturmedium	Hersteller
EMEM (#820100a)	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppenheim, Deutschland
10 % FKS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
1 % Penicillin-Streptomycin (100 U / mL; 100 µg / mL)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HT29 Zellkulturmedium	Hersteller
McCoy's 5A Medium + GlutaMAX™ (#11594466)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
10 % FKS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
1 % Penicillin-Streptomycin (100 U / mL; 100 µg / mL)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HT29-MTX-E12 Zellkulturmedium	Hersteller
DMEM (#11960-044)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
10 % FKS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
1 % Penicillin-Streptomycin (100 U / mL; 100 µg / mL)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1 % 2 mM GlutaMAX™ Supplement (100x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
1 % MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.1.7 Lösungen

Krebs-Ringer-Lösung	
Natriumchlorid	115 mM
Natriumhydrogencarbonat	25 mM
Dikaliumhydrogenphosphat	2,4 mM
Calciumchlorid	1,2 mM
Magnesiumchlorid	1,2 mM
Kaliumhydrogenphosphat	0,4 mM
Spüllösung zur Mukus-Präparation	
HEPES	10 mM
Calciumchlorid	1,3 mM
Magnesiumsulfat	1,0 mM
Natriumchlorid	137 mM

3.2 Methoden

3.2.1 Analytische Methode: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Ein Kriterium zur Beurteilung von Wirkstoffen und Wirkstoffformulierungen ist deren quantitative Bestimmung in einer Probe. Hierzu kann in Abhängigkeit des verwendeten Tests, der Wirkstoff aus der Probenmatrix aufgereinigt und die enthaltene Wirkstoffkonzentration quantitativ ermittelt werden. Die quantitative Bestimmung erfordert die Entwicklung und Validierung von spezifischen analytischen Messmethoden. Als Standardmethode zur Detektion von Wirkstoffen hat sich die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) in der pharmazeutischen Forschung etabliert. Die HPLC beruht auf dem Prinzip der Säulenchromatographie. Hierbei wird die Probe in einen Flüssigkeitsstrom (mobile Phase) injiziert und so zur Säule (stationären Phase) transportiert. Die Elution mit der mobilen Phase erfolgt, bis die zu analysierenden Komponenten getrennt aus der Säule gespült werden. Der Trenneffekt basiert auf unterschiedlichen Polaritäten der mobilen und stationären Phase. Die daraus resultierende Retentionszeit ist charakteristisch für jede einzelne Komponente. Nach der Elution der Komponenten aus der Säule werden diese von einem Detektor (beispielsweise Diodenarray-Detektor) registriert und ein Signal ausgegeben. Die Vorteile der HPLC beruhen auf der Verwendung von feinkörnigen und dichtgepackten Säulen in Kombination mit einem hohen Arbeitsdruck von bis zu 600 bar. Diese führen zu einer hohen Auflösung der Probenbestandteile, einer geringen Analysedauer und einer sensitiven Nachweisempfindlichkeit im Spurenbereich. Die Identifizierung und Quantifizierung der zu analysierenden Substanzen erfolgt durch den Einsatz von Standards. Zur Überprüfung, ob eine analytische Methode die geforderten Ergebnisse unter festgelegten Kriterien liefert, ist eine Methodenetablierung und Validierung nötig. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit ein Validierungsplan erstellt und angewendet.

3.2.1.1 Validierung der HPLC-Methode

Die Methodvalidierung erfolgte nach den Vorgaben der ICH Harmonised Tripartite Guideline – Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology Q2 (R1) [172] und unter Zuhilfenahme fachbezogener Literatur [173–175]. Die ICH Guideline beinhaltet eine Darstellung der Parameter und deren Definitionen, welche für die Validierung benötigt werden. Die für die Validierung festgelegten und zu überprüfenden Parameter sind Richtigkeit, Präzision, Detektionslimit, Quantifizierungslimit, Linearität, Arbeitsbereich, Robustheit und Spezifität (Abbildung 18). Zur statistischen Auswertung der Messwerte wurde das Programm Excel 2016 von Microsoft® verwendet. Als Signifikanzniveau (α -Niveau) wurde ein Schwellenwert von 5 % angenommen. Dieser Wert gilt als Standardwert in den Biowissenschaften [174]. Ein Signifikanzniveau von 5 % bedeutet, dass mit einer

Wahrscheinlichkeit von 5 % eine Fehlentscheidung getroffen wird. Bei der Bestätigung der Nullhypothese ist somit zu 95 % eine richtige Entscheidung getroffen worden. Die analytische Methode gilt als validiert, wenn die Kriterien der Validierungsparameter erfüllt wurden.

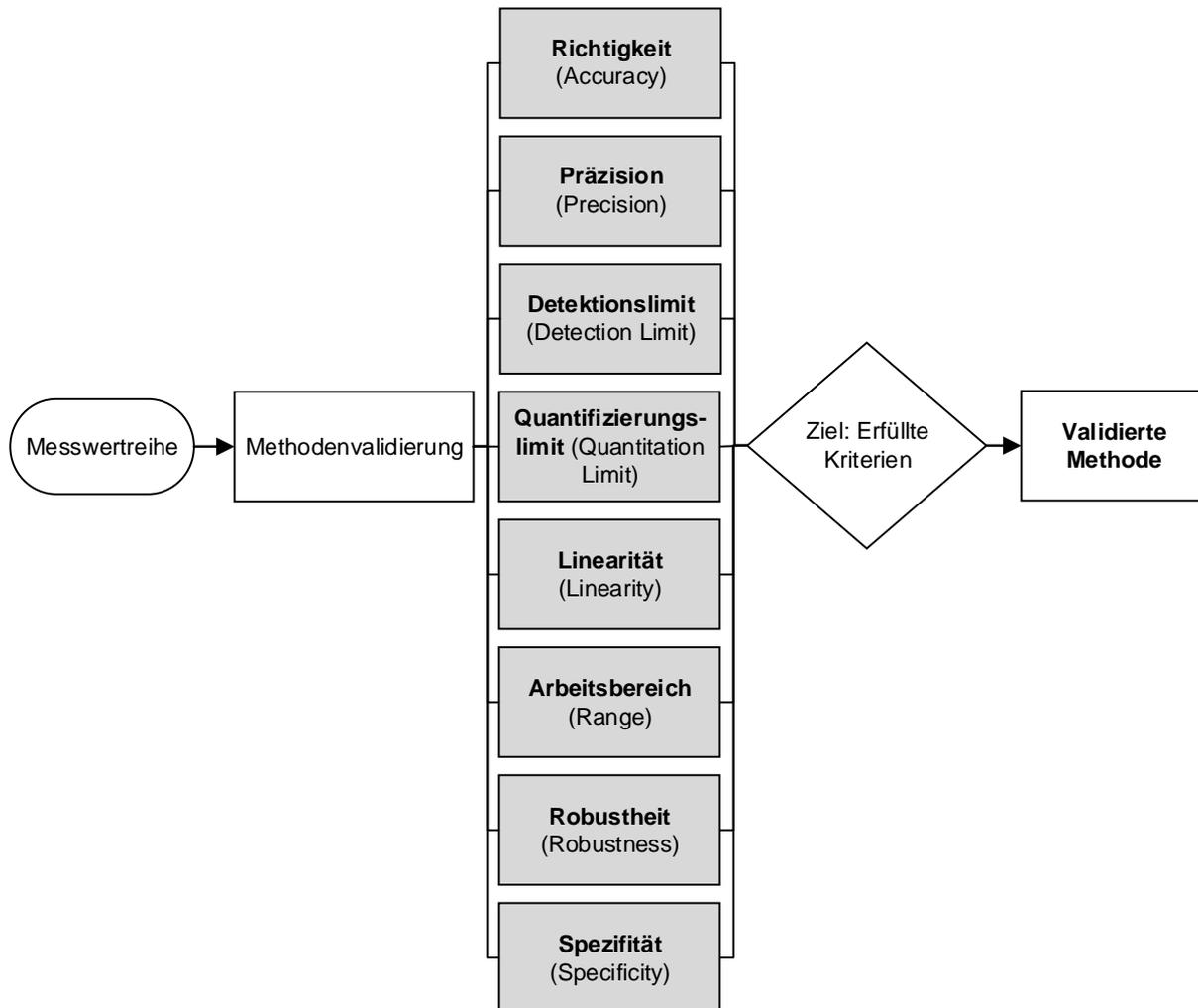


Abbildung 18: Validierungsparameter nach ICH Guideline als Flussdiagramm dargestellt

Das Diagramm zeigt die Validierungsparameter nach ICH Guideline. Um sicher zu stellen, dass die entwickelte Methode ihren Zweck erfüllt, muss diese die Kriterien der Parameter erfüllen.

Probenvorbereitung

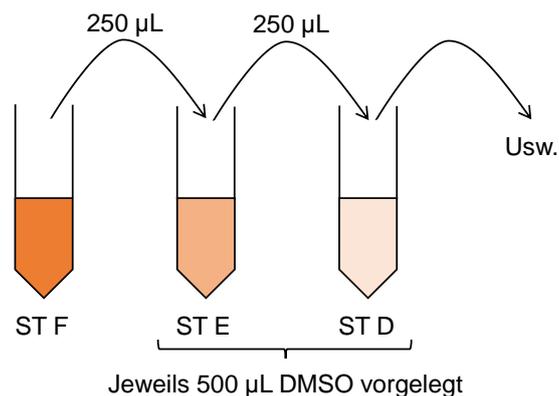
Zur Methodenvalidierung ist es nötig die Proben entsprechend der späteren Verwendung vorzubereiten. Die Substanzen für die Standardreihen wurden mit der Analysenwaage unter dem Abzug eingewogen. Es wurde eine mTHPC-Stammlösung von 6 $\mu\text{mol/L}$ was einer Konzentration von 4,084 $\mu\text{g/mL}$ entspricht, hergestellt. Als Lösungsmittel wurde DMSO verwendet. Zur Validierung wurde eine lineare Messwertreihe mit unterschiedlichen Konzentrationsniveaus der mTHPC-Reinsubstanz angesetzt. Die gewählten Konzentrationen umfassen den erwarteten Messbereich und werden im Folgenden als Standards A-F bezeichnet (Tabelle 1).

Tabelle 1: mTHPC-Standardreihe mit unterschiedlichen Konzentrationsniveaus

Die Standardreihe wurde mit der mTHPC-Reinsubstanz ausgehend von der Stammlösung angesetzt. Die unterschiedlichen Konzentrationsniveaus werden als Standards (ST) bezeichnet und fortlaufend mit A-F bezeichnet.

ST	mTHPC	
	$\mu\text{mol} / \text{L}$	$\mu\text{g} / \text{mL}$
A	0,025	0,017
B	0,074	0,050
C	0,222	0,151
D	0,667	0,454
E	2,000	1,361
F	6,000	4,084

Die Messwertreihe mit den Standards A-F wurden mit den in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen nach dem Schema in Abbildung 19 hergestellt. Um voneinander unabhängige Messwertreihen zu erhalten, wurde viermal aus vier unterschiedlichen Stammlösungen Messwertreihen angesetzt und in Doppelbestimmung vermessen.

**Abbildung 19: Herstellung der linearen Messwertreihe**

Für die lineare Messwertreihe wurde aus der Stammlösung eine Lösung mit einem Konzentrationsgehalt von 6,000 $\mu\text{mol} / \text{L}$ hergestellt und davon 750 μL in ST F vorgelegt. In die Röhrchen der jeweiligen Standards A bis E wurden 500 μL DMSO vorgelegt. Aus ST F wurden 250 μL entnommen und mit dem in ST E vorgelegten DMSO durch auf und ab pipettieren vermischt. Aus ST E wurden 250 μL in ST D überführt und gemischt usw. Die so erstellte lineare Verdünnungsreihe umfasst einen aufsteigenden Konzentrationsbereich von 0,025 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bis 6,000 $\mu\text{mol} / \text{L}$.

HPLC-Methode

Es wurde eine HPLC-Methode entwickelt und etabliert, die es ermöglicht, alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen zu detektieren (Tabelle 2). Für die Messung wurde das System Agilent 1260 Infinity Quaternary LC von Agilent Technologies verwendet. Das System setzt sich zusammen aus einer quaternären Pumpe, einem Säulenhalter mit integriertem Thermostat, einem automatischen Probengeber und einem Diodenarray-Detektor (DAD-Detektor). Die detektierten Signale wurden mit der Software ChemStation analysiert und ausgewertet. Verwendet wurde eine Gradienten-Methode, bei der sich die Zusammensetzung des Laufmittels stufenförmig veränderte. Der Gradient setzt sich aus den Lösungsmitteln der mobilen Phase Wasser (A) und Acetonitril (B) und 0,1 % Trifluoressigsäure (C) zusammen. Alle verwendeten Lösungsmittel haben einen Gradienten geeigneten Reinheitsgrad. Bei der Optimierung wurden unterschiedliche Gradienten getestet. Die Auswahl erfolgte anhand der Effizienz und Reproduzierbarkeit der Retentionszeit. Als stationäre Phase wurde die Säule Poroshell 120 EC-C18 von Agilent Technologies mit einer Länge von 100 mm und einem Innendurchmesser von 2,1 mm verwendet. Die Säule ist gepackt mit einem Füllmaterial aus Partikeln mit einem Durchmesser von 2,7 μm und einer lipophilen C18 Oberfläche.

Tabelle 2: HPLC-Bedingungen und Einstellungen zur Messung von mTHPC

Apparatur:	HPLC-System Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Deutschland)				
Säule:	Poroshell 120 EC.C18 (100 x 2,1 mm; 2,7 μm , Agilent Technologies, Deutschland)				
Eluent A:	Wasser				
Eluent B:	Acetonitril				
Eluent C:	0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser				
Gradient:		Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
	1. Stufe	Start	76,5	8,5	15
	2. Stufe	0,5	76,5	8,5	15
	3. Stufe	2,5	42	38	20
	4. Stufe	4	0	57,5	42,5
	5. Stufe	10	0	57,5	42,5
	6. Stufe	14	76,5	8,5	15
Flussrate:	0,4 mL / min				
Säulentemperatur:	60 °C				
Injektionsvolumen:	2 μL				
Detektorwellenlänge:	415 nm				

Beurteilung der Messwertreihe

Zur Beurteilung der Messwertreihe wurden die objektiven Kriterien Prüfung auf Normalverteilung, Prüfung auf Ausreißer und ein Trendtest durchgeführt. Diese Prüfungen bilden die Voraussetzung für die Durchführung der gewählten statistischen Methoden.

Prüfung auf Normalverteilung

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgt nach David et al. (Formel 1) [176]. Nach David et al. liegt eine Normalverteilung vor, wenn die Prüfgröße zwischen der oberen und unteren Schranke, in Abhängigkeit von der Anzahl der Werte (n) und dem Signifikanzniveau (α), liegt (Anhang: Statistische Tabellen - Tabelle 22). Für die Normalverteilung wird zusätzlich die Spannweite (Range, Formel 2) und die Standardabweichung berechnet (Formel 3).

Formel 1: Normalverteilung nach David et al. [176]

$$PG_{David} = \frac{R}{s}$$

Mit:

PG_{David} = Prüfgröße berechnet nach David
 R = Range bzw. Spannweite der Messwerte
 s = Standardabweichung

Formel 2: Berechnung des Range [175]

$$R = x_{max} - x_{min}$$

Mit:

R = Range
 x_{max} = größter Messwert der Messreihe
 x_{min} = kleinster Messwert der Messreihe

Formel 3: Formel zur Berechnung der Standardabweichung [175]

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

Mit:

s = Standardabweichung
 x = Messwert
 \bar{x} = Mittelwert der Messwertreihe
 n = Anzahl der Messwerte

Prüfung auf Ausreißer

Mit einem Ausreißertest kann überprüft werden, ob eine Abweichung eines einzelnen Wertes innerhalb einer Messwertreihe zufällig ist oder ob die Abweichung aufgrund eines systematischen Fehlers entstanden ist [175]. Nach DIN 53804 wird der Dean-Dixon-Test für Stichproben bis $n = 29$ empfohlen (Formel 4 und Formel 5). Um zu beurteilen, ob der geprüfte

Wert ein Ausreißer ist, wird die Prüfgröße mit dem kritischen Wert Q_{krit} verglichen (Anhang: Statistische Tabellen - Tabelle 23). Ist die berechnete Prüfgröße des experimentellen Wertes kleiner als die Prüfgröße liegt kein Ausreißer vor.

Formel 4: Dean-Dixon Ausreißertest: Berechnung der Prüfgröße nach unten [173]

$$PG_{\text{Dean-Dixon}} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$$

Formel 5: Dean-Dixon Ausreißertest: Berechnung der Prüfgröße nach oben [173]

$$PG_{\text{Dean-Dixon}} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1}$$

Mit:

$PG_{\text{Dean-Dixon}}$ = Prüfgröße Dean-Dixon

x_1 = niedrigster Messwert

x_2 = zweitniedrigster Messwert

x_n = höchster Messwert

x_{n-1} = zweithöchster Messwert

Prüfung auf das Vorliegen eines Trends

In einer Messwertreihe kann ein Trend durch z. B. Abbau von Lösungen, Temperaturdrift oder schleichender Dejustierung verursacht werden. Zur Überprüfung auf das Vorliegen eines Trends wird der Neumann – Trendtest angewendet (Formel 6 und Formel 7). Die errechnete Prüfgröße wird mit dem Tabellenwert verglichen (Anhang: Statistische Tabellen - Tabelle 24). Ist die Prüfgröße größer als der Tabellenwert liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % kein Trend vor.

Formel 6: Berechnung der Prüfgröße nach Neumann [173]

$$PG_{\text{Neumann}} = \frac{\Delta^2}{s^2}$$

Mit:

PG_{Neumann} = Prüfgröße Neumann

Δ^2 = Differenzstreuung

s^2 = Varianz

Formel 7: Differenzstreuung [173]

$$\Delta^2 = \frac{\sum(x_i - x_{i+1})^2}{n - 1}$$

Mit:

Δ^2 = Differenzstreuung

x_i = Einzelwerte

x_{i+1} = folgender Einzelwerte

n = Anzahl der Messwerte

Richtigkeit (Accuracy)

Die Richtigkeit eines analytischen Verfahrens ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem tatsächlich ermittelten Wert (Ist-Wert) und dem als richtig angesehenem Wert (Soll-Wert) [172]. Die Richtigkeit wird über den kompletten Messbereich der analytischen Methode überprüft. Zur Ermittlung der Richtigkeit wird die Differenz zwischen dem Soll-Wert und dem Ist-Wert des errechneten Substanz-Gehaltes zusammen angegeben [172]. Hierzu wurden 6 verschiedene Konzentrationen (Standard A-F), die den Messbereich abdecken, jeweils zweimal vermessen. Zur Bestimmung des Analyt-Gehaltes wurde die mathematische Analyseverfahren mittels Responsefaktor gewählt. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen Signal und der Soll-Wert-Menge des Analyten (Formel 8) [177].

Formel 8: Berechnung des Responsefaktors zur quantitativen Analyse [177]

$$RF = \frac{x_i}{y_i}$$

Mit:

RF = Responsefaktor

x_i = Messwerte, hier AUC (Area Under the Curve)

y_i = Substanzkonzentration der Probe

Präzision (Precision)

Der Validierungsparameter Präzision ist das Maß für die Streuung von Analyseergebnissen, die unter Standardbedingungen im Labor erzeugt werden [173]. Die Präzision kann weiter unterteilt werden in die Parameter **Wiederholbarkeit**, **intermediäre Präzision** und die **Reproduzierbarkeit**. Zur Berechnung des Präzisionsmaß für alle drei Unterparameter wurde der Variationskoeffizient berechnet (Formel 9) [178]. Dieser berücksichtigt, dass bei einer Stichprobe mit kleinen Messwerten kleinere Abweichungen entstehen als bei einer Stichprobe mit großen Messwerten. Dadurch kann ein gemeinsamer Grenzwert von $\leq 2\%$ als Kriterium festgelegt werden.

Die **Wiederholbarkeit** beschreibt nach DIN 5184 und ISO 5725 die Streuung der Analyseergebnisse, die unter denselben Bedingungen erzeugt wurden. Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit wurden drei Proben mit den Konzentrationen Standard B, D und F innerhalb kürzester Zeit im selben Labor durch denselben Prüfer viermal hintereinander vermessen und der Variationskoeffizient berechnet.

Die **intermediäre Präzision** umfasst die Variationen, die innerhalb eines Labors auftreten können. Dies beinhaltet Messungen an unterschiedlichen Tagen, Messungen mit unterschiedlicher Ausstattung und verschiedenen Prüfern [172]. Für die Bestimmung der intermediären Präzision wurden erneut die Konzentrationen der Standardreihe B, D und F verwendet. Die Proben wurden von zwei unterschiedlichen Personen angesetzt und an zwei

unterschiedlichen Tagen in Doppelbestimmung gemessen. Zur Beurteilung der intermediären Präzision wurde erneut der Variationskoeffizient errechnet.

Die **Reproduzierbarkeit** wird durch interne Laborversuche bestätigt. Dies ist nötig, um ein analytisches Verfahren standardmäßig verwenden zu können [172]. Beim routinemäßigen Einsatz der analytischen Methode können Veränderungen wie unterschiedliche Geräte, Prüfer und Chargenwechsel auftreten. Die vorliegende Methode wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit nur an einem Gerät und von einem Prüfer durchgeführt. Daher wurde die Reproduzierbarkeit im Rahmen der Arbeit nicht überprüft.

Formel 9: Berechnung des Präzisionsmaß mittels Standardabweichung und Variationskoeffizient [173]

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

Mit:

x_i = gemessener Wert, hier Gehalt

\bar{x} = konstanter systematischer Fehler; y-Abschnitt aus linearer Regression

n = Proportionalitätskonstante, Maß für einen möglichen proportionalen Fehler; Steigung der linearen Regression

s = Soll-Wert, hier: Gehalt der Standardprobe, er gilt als fehlerfrei

V_k = Variationskoeffizient

Detektions- und Quantifizierungslimit (Detection- and Quantitation-Limit)

Nach der ICH-Guideline ist das Detektionslimit definiert als die kleinste Menge eines Analyten in einer Probe, die detektiert werden kann, aber nicht unbedingt als ein exakter Gehalt quantifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu ist das Quantifizierungslimit eines individuellen analytischen Verfahrens die kleinste Menge eines Analyten in einer Probe die quantitativ mit einer angemessenen Präzision und Genauigkeit ermittelt werden kann [172]. Für den vorliegenden Validierungsplan wurde ein Konzentrationsbereich des Analyten von 0,002 - 4,084 µg / mL gewählt. Für das Detektionslimit wurde die geringste Konzentration ermittelt, die sich deutlich vom Blindwert unterscheidet. Als Quantifizierungslimit wurde die Konzentration ermittelt, die einer angemessenen Präzision mit einem Variationskoeffizienten $\leq 2 \%$ entspricht.

Linearität (Linearity)

Die Linearität eines Analyseverfahrens ist die Eignung in einem gegebenen Bereich Testergebnisse zu erhalten, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sind [172]. Der lineare Zusammenhang wurde im angegebenen Arbeitsbereich des analytischen Verfahrens überprüft. Hierzu wurde die Messwertreihe (Tabelle 1) vermessen.

Aus den Ergebnissen wurde eine Kalibriergerade mittels Excel generiert, aus der sich der lineare Zusammenhang ergibt (Formel 10). Errechnet wurden hierbei der Korrelationskoeffizient (Formel 11), der Y-Achsenabschnitt (Formel 12) und die Steigung der Regressionskurve (Formel 13). Die Abweichung der errechneten Steigung wurde zum Vergleich mit dem Soll-Wert grafisch dargestellt.

Formel 10: Berechnung der linearen Kalibrierfunktion [175]

$$\bar{y}_i = a + b \cdot x_i$$

Mit:

\bar{y}_i = Erwartungswert für die Messgröße der Kalibrierprobe i
 x_i = Gehalt der Kalibrierprobe i
 a = Ordinatenabschnitt
 b = Steigung, Empfindlichkeit des Verfahrens

Formel 11: Berechnung des Korrelationskoeffizienten [173]

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{\frac{1}{2}}} = \frac{Cov(X, Y)}{s^2(X) \cdot s^2(Y)}$$

Mit:

r = Korrelationskoeffizient
 x_i = Messwerte, hier AUC
 \bar{x} = Mittelwert der Messwertreihe
 y_i = Substanzkonzentration der Probe
 \bar{y} = Mittelwert der Substanzkonzentration in der Probe
 s^2 = Varianz

Formel 12: Berechnung des Ordinatenabschnitts, an dem die Regressionsgerade die y-Achse schneidet [175]

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Mit:

a = y- Achsenabschnitt, Ordinatenabschnitt
 \bar{x} = Mittelwert der Messwertreihe
 \bar{y} = Mittelwert der Substanzkonzentration in der Probe
 b = Steigung, Empfindlichkeit des Verfahrens

Formel 13: Berechnung der Steigung der Kalibrierfunktion [173]

$$b = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Mit:

b = Steigung, Empfindlichkeit des Verfahrens
 x_i = Messwerte, hier AUC
 \bar{x} = Mittelwert der Messwertreihe
 y_i = Substanzkonzentration der Probe
 \bar{y} = Mittelwert der Substanzkonzentration in der Probe

Arbeitsbereich (Range)

Der Arbeitsbereich einer analytischen Methode ist der Bereich zwischen der niedrigsten und höchsten Konzentration des Analyten in der Probe, für die das Analyseverfahren eine geeignete Präzision, Genauigkeit und Linearität aufweist [172]. Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine Höchstkonzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ eingesetzt. Daher wurde ein Arbeitsbereich von 0,025 bis 6 $\mu\text{mol} / \text{L}$ gewählt.

Robustheit (Robustness)

Die Evaluation der Robustheit sollte während der Entwicklungsphase betrachtet werden und hängt vom Verfahrenstyp der Studie ab. Sie sollte die Zuverlässigkeit der Analyse unter Beachtung möglicher Variationen der Methoden-Parameter zeigen [172]. Die zu überprüfenden Parameter sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Ändert sich das Ergebnis durch die Veränderung der jeweiligen Variablen mehr als der als Grenze vorgegebene Variationskoeffizient von $\leq 2\%$, wird die Variable als kritisch eingestuft [173].

Tabelle 3: Überprüfung der Robustheit der HPLC-Methode zur Analyse von mTHPC

Einflussfaktoren	Überprüfung
pH-Wert und Zusammensetzung der Eluenten	Keine Überprüfung, beide Eluenten werden von zertifizierten Lieferanten bezogen
Flussrate	$\pm 5\%$ und Einfluss auf Peak-Fläche und Retentionszeit.
Temperatur	$\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ und Einfluss auf Peak-Fläche und Retentionszeit.
Säule	Keine Überprüfung, dieser Punkt muss bei einem Austausch der Säule überprüft werden
Stabilität der Testsubstanzen	Prüfung der Stabilität über den Testzeitraum von 3 Monaten

Spezifität (Specificity)

Die Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten eindeutig zu identifizieren [172]. Hierzu wurde die Probenmatrix und die der Probenmatrix hinzugegebene mTHPC-Reinsubstanz vermessen und die Chromatogramme auf ihre Proben-Auflösung überprüft. Das Kriterium zur Überprüfung ist, dass die Probensubstanz nicht von der umgebenden Probenmatrix beeinflusst wird.

3.2.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter aseptischen Bedingungen zur Vermeidung von Kontaminationen. Die verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht, um diese ausschließen zu können.

Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden unter den Standardbedingungen 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80 % passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin EDTA (0,05 %) für 4-9 min abgelöst. Nach zusätzlichem Abklopfen der Zellen von der Wachstumsfläche, wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, was zu einer Inhibierung der Trypsin-Aktivität führt. Das Pelletieren der Zellen erfolgte mittels Zentrifugation bei 115 g für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und mit einem Verhältnis von 1:3 bis 1:8 bzw. mit einer bestimmten Zellzahl entsprechend der Kultivierungsfläche ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage vollständig abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

Zellzahlbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte automatisiert mit dem Zellzähl-System CASY® TT. Hierzu wurden eine 1:400 Verdünnung der Zellsuspension in isotonischem Messpuffer CASY®ton hergestellt. Die Durchführung der Zellzahlbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Auswertung der gemessenen Zellzahl wurde automatisiert mit der Software CASYexcell durchgeführt.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung der verwendeten Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden diese in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Der Prozess zur Einlagerung begann mit dem Ablösen der Zellen und der Bestimmung der Zellzahl mittels CASY® TT. Anschließend wurden die Zellen in einem Einfriermedium bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter überführt und in einem -80 °C Gefrierschrank kontinuierlich um 1 °C pro Minute heruntergekühlt. Nach etwa 24 h wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank umgelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig, um eine größtmögliche Zellviabilität zu gewährleisten. Hierzu wurden die Zellen unter Bewegung in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Zur Entfernung des Einfriermediums wurden die Zellen für 5 min bei 115 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche in entsprechender Verdünnung überführt. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium gewechselt, um Zelldebris und Reste des Einfriermediums zu entfernen.

3.2.3 Generierung und Charakterisierung von 3D-Tumorsphäroiden

Die Generierung von 3D-Tumorsphäroiden erfolgte in mehreren Schritten. Nachdem die Zellen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 abgelöst und die Zellzahl bestimmt wurde, wurden sie in 96-Well-Sphäroid-Mikrotiterplatten von Corning® ausgesät. In der Etablierungsphase haben sich als optimale Zellzahl pro Well für die HuTu-80 Zellen 3800 Zellen / Well und für die Zelllinien HT29 und HT29-MTX-E12 4500 Zellen / Well ergeben. Die Zellen wurden für 5 Tage in den Well-Platten kultiviert. Ein Wechsel des Mediums wurde an Tag 3 durchgeführt. An Tag 5 wurden die Tumorsphäroide aus der Platte in 3D-Suspensionskultur-Behälter (CERObute, ©OLS) überführt und in einem automatisierten Suspensionsbioreaktor (CERO, ©OLS) unter rotierenden Bedingungen für weitere 5 Tage kultiviert. An Tag 10 wurden 1-5 Tumorsphäroide entsprechend der weiteren Verwendung in für die Suspensionskultivierung geeignete 96-Well-Mikrotiterplatten mit U-förmigen Wells überführt. Durch die erneute statische Kultivierung kam es nach zwei bis drei Tagen zu einer Ausbildung des nekrotischen Kerns. Die generierten Tumorsphäroide wurden innerhalb von 3 Tagen für die verschiedenen Untersuchungen verwendet.

Histologische Analyse

Für die histologische Beurteilung der generierten Tumorsphäroide wurden diese für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h in 10 % gepufferter Formaldehydlösung fixiert. Zum Schutz vor Gefrierschäden wurden die Tumorsphäroide für jeweils eine Stunde in einer aufsteigenden Saccharose-Lösung von 10 %, 20 % und 30 % inkubiert. Die präparierten Tumorsphäroide wurden in dem Einbettmedium Tissue-Tek® eingebettet und bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Kryostat (Leica CM3050) hergestellt. Die Färbung der Schnitte wurde analog zu den Anweisungen des Herstellers, mit Kernechtrot und Alcianblau durchgeführt und anschließend mittels Hellfeldmikroskopie dokumentiert.

Lebend-Tod-Färbung

Die Lebend-Tod-Färbung wurde an Tag 12 der Tumorsphäroid-Kultivierung durchgeführt. Hierzu wurden die Tumorsphäroide zunächst mit PBS gewaschen und danach in einer Lösung aus 1 µmol / L Calcein-AM und 1 µmol / L Propidium Iodid für 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Tumorsphäroide erneut mit PBS gewaschen und für die Zeit der Mikroskopie in PBS gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop gemacht. Die Bearbeitung der Bilder wurde mit der Software ImageJ 1.52a durchgeführt.

Probenpräparation für die Rasterelektronenmikroskopie

Zur Charakterisierung der Morphologie und Oberfläche der Tumorsphäroide wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Die Vorbereitung der Proben wurden

analog zum Protokoll Katsen et al. [179,180] durchgeführt. Hierzu wurden die Tumorsphäroide auf Transwell®-Zellkultureinsätze überführt, mit PBS gewaschen und über Nacht in 2 % Glutaraldehyd-haltigen 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer fixiert. Danach folgte eine weitere Fixierung unter Verwendung einer 2%igen Osmiumtetroxidlösung, gelöst in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer. Die Proben wurden mit einer steigenden Ethanol-Konzentration von 10 bis 100 % entwässert. Die Proben wurden auf einen REM-Probenteller aufgebracht und zum vollständigen Abdampfen des Ethanols sowie zum Schutz vor Feuchtigkeit bis zur Beschichtung mit Kohlenstoff in einem Exsikkator aufbewahrt. Die fertigen Proben wurden danach mit der Rasterelektronenmikroskopie analysiert.

3.2.4 Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme

Neben den intern hergestellten und entwickelten „Nanopartikel IBMT“ wurden auch externe nanopartikuläre Formulierungen zusammengefasst unter den Namen „Nanopartikel WWU“ und „Nanopartikel biolitec®“ in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Alle in der Arbeit verwendeten Nanopartikel wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und konnten daher für die Untersuchungen mit zellbasierten Testsystemen eingesetzt werden.

Nanopartikel WWU

Die auf PLGA basierenden Nanopartikel wurden von Frau Juliane Anderski am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Klaus Langer entwickelt, hergestellt und charakterisiert. Es wurden zwei unterschiedliche nanopartikuläre Systeme zur Verfügung gestellt. Das nanopartikuläre System A wurde basierend auf PLGA hergestellt. Zur Oberflächenmodifizierung dieses Nanopartikels wurden Chitosan zur Mukoadhäsion und PEG zur Mukopermeation verwendet. Beladen wurden diese nanopartikulären Arzneistoffträgersysteme mit dem Photosensibilisator mTHPP. Zur Herstellung von zwei unterschiedlichen Nanopartikelgrößen wurden die Synthesemethoden „Lösungsmittel-Verdrängungsmethode“ zur Herstellung 100 nm großen Nanopartikeln und die „Emulsions-Diffusions-Methode“ zur Herstellung von 200 nm großen Nanopartikeln verwendet [181,182]. Das nanopartikuläre System B basierte auf dem Polymer PLGA, dessen Oberfläche mit PEG modifiziert wurde. Zur Beladung dieser Nanopartikel wurde der Photosensibilisator mTHPC eingesetzt. Eine weitere Modifikation dieses Nanopartikels wurde durch die Verwendung eines lichtresponsiven Polymers durchgeführt. Das lichtresponsive Polymer wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dirk Kuckling an der Universität Paderborn entwickelt und hergestellt. Es führte zu lichtspaltbaren Partikeleigenschaften, die zur gesteuerten Freisetzung des Photosensibilisators aus der Partikelmatrix eingesetzt werden sollten. Auch dieses partikuläre Arzneistoffträgersystem wurde mit dem Photosensibilisator mTHPC beladen.

Nanopartikel biolitec®

Die Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung der liposomalen nanopartikulären Formulierungen erfolgte durch die biolitec® research GmbH. Die liposomalen Nanopartikel basierten auf den Phospholipiden Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG). Die Lipid-Zusammensetzung der Liposomen betrug 18 mg DPPC / mL und 2 mg DPPG / mL und lag in ungepuffertem Wasser vor. Zur Inkorporation wurden die neu synthetisierte Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 eingesetzt.

3.2.4.1 Synthese der Nanopartikel IBMT

Für die Synthese der „Nanopartikel IBMT“ wurden zwei Herangehensweisen gewählt, um mukoadhärerende Nanopartikel bzw. mukopermeierender Nanopartikel zu erhalten. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Synthese-Methoden und verschiedene Oberflächenmodifizierungen eingesetzt und adaptiert. Zur Oberflächenmodifizierung der mukoadhärerenden Nanopartikel wurde Carbopol® 971P NF und für die mukopermeierenden Nanopartikel Pluronic® F127 verwendet.

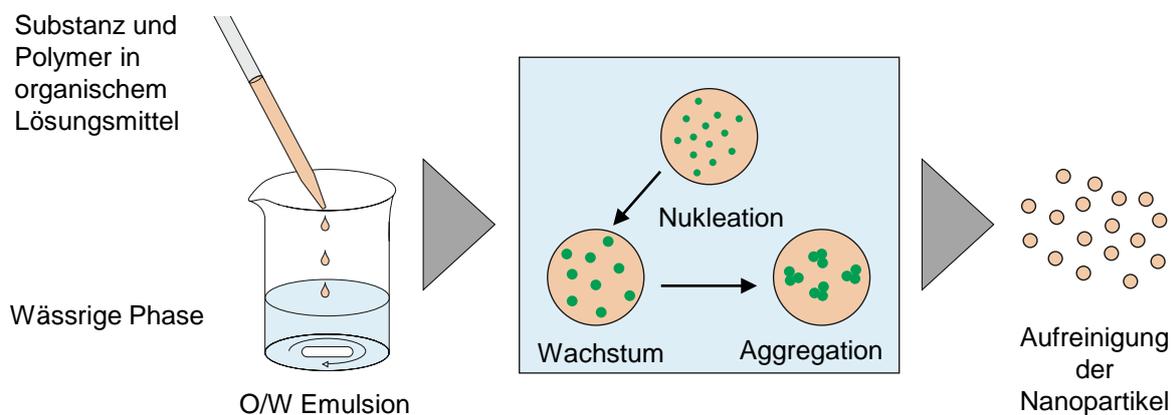


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Nanopartikel-Synthese mittels Nanopräzipitation

Die zu inkorporierende Substanz und das Polymer (PLGA) werden in einem organischen Lösungsmittel gelöst und mit einer wässrigen Phase zu einer O/W Emulsion vereinigt. Aufgrund von Grenzflächeneffekten kommt es zu einer Übersättigung des Polymers in der organischen Phase, was zu einer Nukleation und einem Wachstumsprozess und Aggregation führt. Die Nanopartikel werden nach der Herstellung aus der wässrigen Phase aufgereinigt. (Modifiziert nach Rivas et al. [183])

Das erste Partikelsystem bezeichnet als CP-PLGA (Carbopol®- Poly(lactid-co-glycolid)) wurde mittels Nanopräzipitation hergestellt (Abbildung 20). Als Grundlage zur Entwicklung des Synthese-Protokolls dienten die Protokolle nach Rojnik et al. [113] und Niu et al. [184]. Für die wässrige Phase wurde eine 0,1 %ige Carbopol®-Stammlösung mit Reinstwasser hergestellt und über Nacht quellen gelassen. Danach wurde die Stammlösung mittels 2 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Um die dadurch stark erhöhte Viskosität zu reduzieren,

wurden 100 μL 10 %ige Salzsäure hinzugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert zur Neutralisation durch erneute Zugabe von 2 M Natronlauge eingestellt und die hergestellte Lösung autoklaviert. Für die Herstellung der organischen Phase wurden 20 mg Resomer RG 503 H in 1 mL DMSO gelöst. Die organische Lösung wurde tropfenweise mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mL / min in eine 0,04 %ige Carbopol-Wasserphase unter Rühren bei 600 U / min zugegeben. Zur Verdampfung des Lösungsmittels wurde die Emulsion für mindestens 5 h gerührt. Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgte mittels Zentrifugation für 30 min bei 21.000 g und einer Temperatur von 4 °C. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert. Zur Inkorporation des Photosensibilisators mTHPC wurde dieser mit einer Menge von 0,25 mg in der organischen Phase gelöst. Die Lagerung der Partikel erfolgte bei 4 °C.

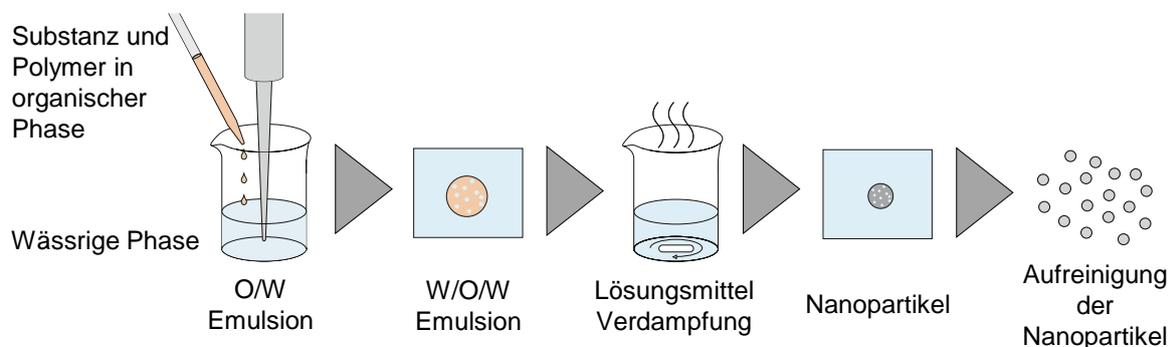


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Nanopartikel-Synthese nach dem Doppalemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungsverfahren

Die Substanz wurde mit dem Polymer im organischen Lösungsmittel aufgelöst und mittels Ultraschall in einer wässrigen Phase homogenisiert. Die W/O/W Emulsion wird in einem größeren Volumen mit wässriger Phase überführt und das Lösungsmittel verdampft. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der Nanopartikel.

Das zweite Partikelsystem bezeichnet als F127-PLGA (Polaxamer 407 - Poly(lactid-co-Glycolid)) wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Xu et al. [185] synthetisiert (Abbildung 21). Die verwendete Methode wird als W/O/W Doppalemulsions-Lösungsmittel-Verdampfungsverfahren bezeichnet. Hierzu wurde eine Ölphase, die sich aus einem Gemisch aus 1 mL Aceton und 3 mL Dichlormethan (DCM) und 50 mg PLGA zusammensetzt, hergestellt. Für die Inkorporation von mTHPC wurde zusätzlich 0,5 mg mTHPC in der Ölphase gelöst. Diese wurde durch die Verwendung eines Ultraschall-Homogenisators bei einer Amplitude von 30 % für 30 s homogenisiert. Eine zweite Lösung aus 10 mL 1 %iger Saponinlösung wurde als wässrige Phase vorgelegt und die Ölphase zügig tropfenweise hinzu pipettiert. Die so entstandene Doppalemulsion wurde erneut mit einer Amplitude von 70 % für 5 min homogenisiert. Diese wurde unter Rühren bei 800 UpM zu einer weiteren 1 %igen Saponinlösung mit einem vorgelegten Volumen von 30 mL tropfenweise hinzu pipettiert. Das

in der Lösung enthaltene Dichlormethan und Aceton wurde für drei Stunden unter Rühren bei 800 UpM verdampft und anschließend über Nacht in einen Exsikkator unter Vakuum gestellt. Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgte mittels Zentrifugation bei 21 000 g für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in sterilem Reinstwasser resuspendiert. Die Aufreinigung wurde zweimal wiederholt. Zur Modifizierung der Nanopartikel wurde während der Aufreinigung eine 0,1 %ige F127-Lösung zum Resuspendieren der Pellets verwendet. Die Anlagerung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen, die sich zwischen dem Poly(propylenoxid)-Block (PPO-Block) von F127 und PLGA bilden. Zur Lagerung wurden die Partikel bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.4.2 Charakterisierung der Nanopartikel

Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel

Die physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel wurde mittels Zetasizer Nano ZS durchgeführt. Dieser ermöglicht die Messung des Nanopartikel-Durchmessers, des Polydispersitätsindex (PDI) und der Oberflächenladung (Zetapotential). Die Messung des Nanopartikel-Durchmessers und des PDI erfolgt nach dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung, nach der kleine Partikel und Moleküle eine größenabhängige Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen [186]. Diese thermisch bedingte Bewegung, bei der sich kleine Partikel schneller bewegen als große, wird durch die Brownsche Molekularbewegung beschrieben. Zur Messung wurden die hergestellten Nanopartikel in Reinstwasser verdünnt und in eine Küvette überführt. Während der Messung wird die Nanopartikelprobe mit einem Laser bestrahlt, durch die Bewegung der Partikel kommt es zu einer schwankenden Streuintensität. Diese wird mit einem digitalen Autokorrelator analysiert und eine Korrelationsfunktion erzeugt, durch die die Größe und Größenverteilung automatisiert errechnet wurde. Die Berechnung des hydrodynamischen Radius der Nanopartikel basiert auf der Stokes-Einstein-Gleichung [187]. Jede Nanopartikelprobe wurde dreimal mit 10 Einzelmessungen vermessen und der arithmetische Mittelwert gebildet.

Die Bestimmung der Oberflächenladung der Nanopartikel wird durch die Bewegungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld bestimmt. Nanopartikel, die eine Oberflächenladung besitzen, bewegen sich in einem elektrischen Feld zu einer Elektrode. Dabei ist die Bewegungsgeschwindigkeit direkt proportional zum Zetapotential [186]. Zur Messung wurde die Nanopartikel-Probe in eine Kapillarküvette überführt und das Zetapotential vermessen. Die Messbedingungen und die Anzahl der Messungen entspricht der durchgeführten Größenmessung.

Gravimetrische Bestimmung der Nanopartikelkonzentration

Die hergestellten Nanopartikel lagen als Nanopartikelsuspension vor. Um die Konzentration der Nanopartikel in der Suspension zu bestimmen, wurden diese in drei Konzentrationen (1:1, 1:2 und 1:5) mit Reinstwasser verdünnt. Zur Messung wurden zunächst leere Aluminium-Wägeschälchen auf einer Ultrafeinwaage gewogen. Anschließend wurden 20 µL der verdünnten Nanopartikel-Suspension in die Wägeschälchen pipettiert und für 2 h bei 70 °C im Wärmeschrank getrocknet. Das Abkühlen der Wägeschälchen auf Raumtemperatur erfolgte im Exsikkator, um erneute Hydrierung zu vermeiden. Anschließend wurden die Wägeschälchen erneut mittels Ultrafeinwaage gewogen und das vorher ermittelte Leergewicht subtrahiert. Zur Kalkulation der Nanopartikelkonzentration in der Suspension wurde jede Probe dreimal vermessen und der arithmetische Mittelwert errechnet.

Quantifizierung der inkorporierten Substanzmenge

Zur Bestimmung der inkorporierten mTHPC-Konzentration wurde die zuvor beschriebene analytische HPLC-Methode angewendet (siehe 3.2.1.). Für die Messung wurden 2 µL der hergestellten Nanopartikel-Suspensionen in 1 mL Acetonitril gelöst. Dies führte zu einem Auflösen des Nanopartikels und somit zu einer Freisetzung des inkorporierten mTHPCs. Die Proben wurden vermessen und die Konzentration mittels Responsefaktor-Analyse berechnet.

Berechnung der Verkapselungseffizienz und Beladungskapazität

Die Effizienz der Inkorporation von mTHPC in die nanopartikulären Formulierungen wurde näherungsweise mittels Verkapselungseffizienz (VE) und Beladungskapazität (BK) berechnet. Die Verkapselungseffizienz ist definiert als die prozentuale Menge des Arzneistoffes, der nachweisbar in die Nanopartikel inkorporiert wurde. Berechnet wird diese aus der eingesetzten Substanzmenge und der freien, nicht inkorporierten Substanzmenge (Formel 14) [188]. Die Beladungskapazität ist die Menge des inkorporierten Arzneistoffes bezogen auf das Gewicht der Nanopartikel. Diese kann durch die Menge des insgesamt inkorporierten Arzneistoffes, dividiert durch das Gesamtgewicht der Nanopartikel, berechnet werden (Formel 14) [189]. Zur Bestimmung der inkorporierten Substanzmenge wurden 100 µL der Nanopartikelsuspension für 30 min bei 21 000 g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Das Nanopartikel-Pellet wurde mit 1 mL DMSO resuspendiert und mittels HPLC-Analyse vermessen (siehe Abschnitt 3.2.1). Aufgrund des hohen Wasseranteil in der Carbopol®-Quellschicht der Nanopartikel mit der Bezeichnung CP-PLGA, wurde ein doppeltes Volumen für die Berechnung der inkorporierten Substanzmenge verwendet.

Formel 14: Berechnung der Verkapselungseffizienz

$$VE [\%] = \frac{\text{Inkorporierte Substanzmenge}}{\text{Eingesetzte Substanzmenge}} \times 100$$

Formel 15: Berechnung der Beladungskapazität

$$BK [\%] = \frac{\text{Inkorporierte Substanzmenge}}{\text{Gewicht der Nanopartikel}} \times 100$$

3.2.5 Untersuchung der biologischen Wirksamkeit

In einem ersten Schritt wurden die neu synthetisierten Photosensibilisatoren und partikulären Formulierungen in einem Wirkstoff-Screening untersucht. Dabei sollte die biologische Wirksamkeit mit Hilfe von 2D-Monolayer und 3D-Tumorsphäroid Screening-Modellen aus den Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 getestet werden. Die Protokolle für das Wirkstoff-Screening wurden in der vorliegenden Arbeit entwickelt und etabliert.

3.2.5.1 Screening potenzieller Wirkstoffe und Wirkstoffformulierungen

Das Screening potenzieller Wirkstoffe und Wirkstoffformulierungen beginnt mit der Kultivierung der 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide (Abbildung 22). Für die 2D-Monolayer-Zellkulturen wurden jeweils 80 000 Zellen / cm² der Zelllinie HuTu-80, 100 000 Zellen / cm² der Zelllinie HT29 und Zelllinie HT29-MTX-E12 in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Kultivierungszeit vor der Wirkstoffinkubation wurde an die Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie angepasst. Diese betrug für die Zelllinie HuTu-80 26 h [190], für die Zelllinien HT-29 und HT29-MTX-E12 48 h [191]. Die 3D-Tumorsphäroide wurden nach Absatz 3.2.3 hergestellt. Die freien Photosensibilisatoren und die partikulären Formulierungen wurden in entsprechender Konzentration im zelllinienspezifischen Medium verdünnt. Das Medium der 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide wurde abgesaugt und durch jeweils 100 µL der Wirkstoffverdünnungen ersetzt. Nach der gewählten Inkubationszeit wurden die Wirkstoffverdünnungen abgenommen und die 2D-Monolayer-Zellkulturen sowie die 3D-Tumorsphäroide jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde erneut das Zelllinienspezifische Medium zugegeben. Die Zellen zur Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge wurden nach Abschnitt 3.2.5.4 weiter behandelt. Zur Untersuchung der Phototoxizität wurden die Zellen mit einer Dosis von 50 J / cm² mit der Bestrahlungseinheit PDT 1200 der Firma Waldmann GmbH & Co. KG bestrahlt. Die Lichtleistung wurde mit einem mobilen Laserstrahl und Spektralmessgerät gemessen und eine Bestrahlungszeit von 8 min berechnet (Formel 16). Während der Bestrahlung wurden die Well-Platten für die Dunkelkontrolle ebenfalls aus dem Brutschrank entnommen und mit Alufolie abgedeckt, um sie vor Lichteinstrahlung zu schützen. Anschließend wurden die Well-Platten für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert.

Formel 16: Berechnung der Bestrahlungszeit

$$\text{Bestrahlungszeit [t]} = \frac{\text{Bestrahlungsdosis [J]}}{\text{Lichtleistung [W]}}$$

Das Screening wurde pro Zelllinie und Zellkultursystem viermal in unabhängigen Tests mit jeweils vier Chargen der freien Photosensibilisatoren und nanopartikulären Formulierungen mit einer Wirkstoffkonzentration von $5 \mu\text{mol/L}$ durchgeführt. Zudem wurden auch unbeladenen nanopartikulären Arzneistoffträgersysteme (Leerpartikel) untersucht. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Test eine unbehandelte Zellkontrolle und eine Lösungsmittelkontrolle zur Überprüfung eines potenziellen Einflusses auf das Zellkultursystem durch die verwendeten Lösungsmittel mitgeführt.

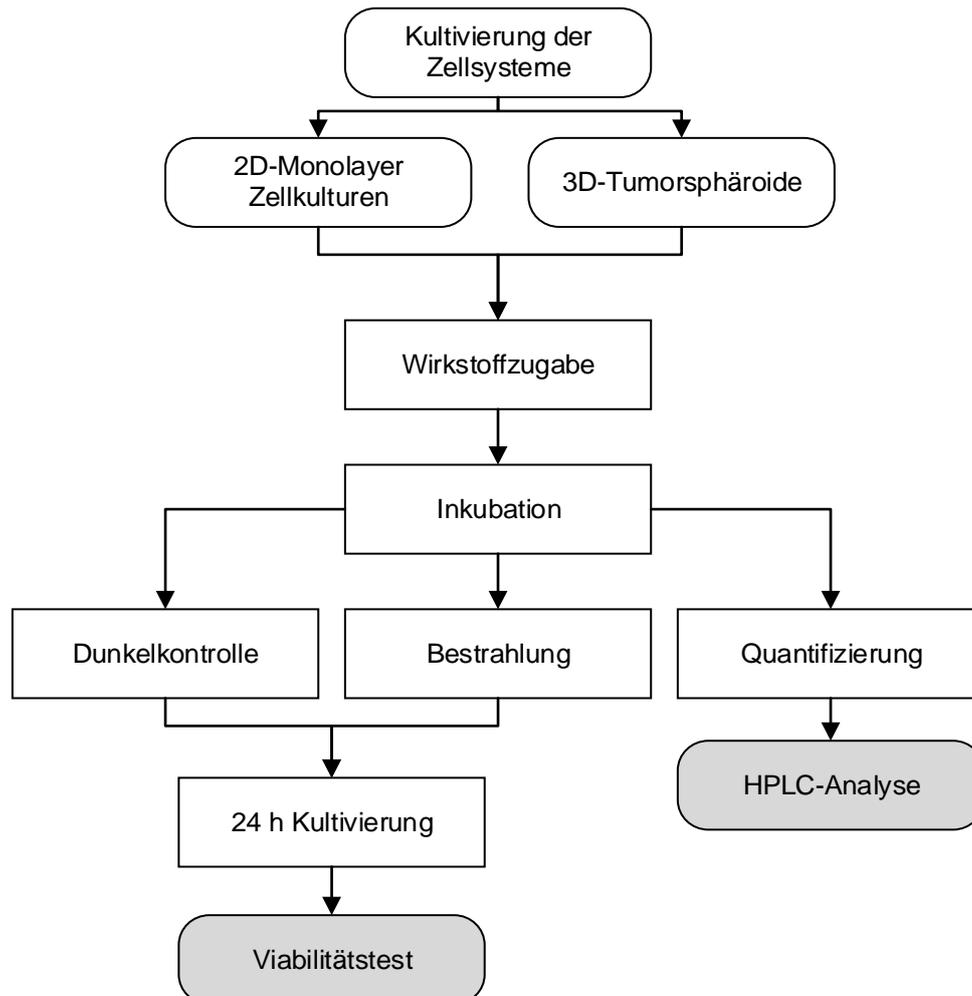


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Wirkstoff-Screenings

Gezeigt sind die Schritte von der Kultivierung der Zellsysteme bis zur Untersuchung der Dunkelkontrolle, Bestrahlung und Quantifizierung.

3.2.5.2 Automatisiertes Screening der freien Photosensibilisatoren

Die Vielzahl verschiedener, potenziell neuer Photosensibilisatoren und partikulären Formulierungen erfordern eine hohe Anzahl an Versuchsdurchführungen. Daher wurden die Untersuchungen an 2D-Monolayer-Zellkulturen der neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 1157, BLC 2175, BLC 5152, BLC 6151, BLC 6166 und BLC 6167 teilautomatisiert mit dem System Tecan Freedom EVO 200 durchgeführt (Abbildung 23). Das System ist mit

verschiedenen Modulen ausgestattet, die auf einem Arbeitstisch unter einer Sterilhaube integriert wurden. Für die teilautomatisierte Versuchsdurchführung wurde ein Skript geschrieben, um die einzelnen Schritte der manuellen Durchführung automatisiert steuern zu können. Hierbei wurden zunächst die 96-Well-Platten in das Karussell eingelegt und mit der Transferstation auf den Arbeitstisch transferiert. In einem Flüssigkeitsreservoir wurde eine Zellsuspension vorgelegt, die mittels Flüssigkeits-Handling-Modul in die 96-Well-Platten ausgesät wurde. Danach wurden die Mikrotiterplatten mittels Robot-Manipulator-Arm auf eine zweite Transferstation übertragen und in den Zellinkubator transportiert. Nach der Zellkultivierung wurde das Medium automatisiert abgesaugt und die Wirkstoffverdünnungen erneut mittels Flüssigkeits-Handling-Modul in die 96-Well-Platten pipettiert. Die Wirkstoff-Inkubation erfolgte im Brutschrank des Systems. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium ersetzt. Die Bestrahlung und weiteren Analyse-Schritte wurden manuell außerhalb des Tecan Systems, nach den Abschnitten 3.2.5.3 und 3.2.5.4 durchgeführt.

Teilautomatisiert getestet wurde eine steigende mTHPC-Konzentrationsreihe, mit den Verdünnungsstufen 100; 75; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 und 0,25 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Die neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 1157, BLC 2175, BLC 5152, BLC 6151, BLC 6166 und BLC 6167 wurden mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ analog teilautomatisiert untersucht.

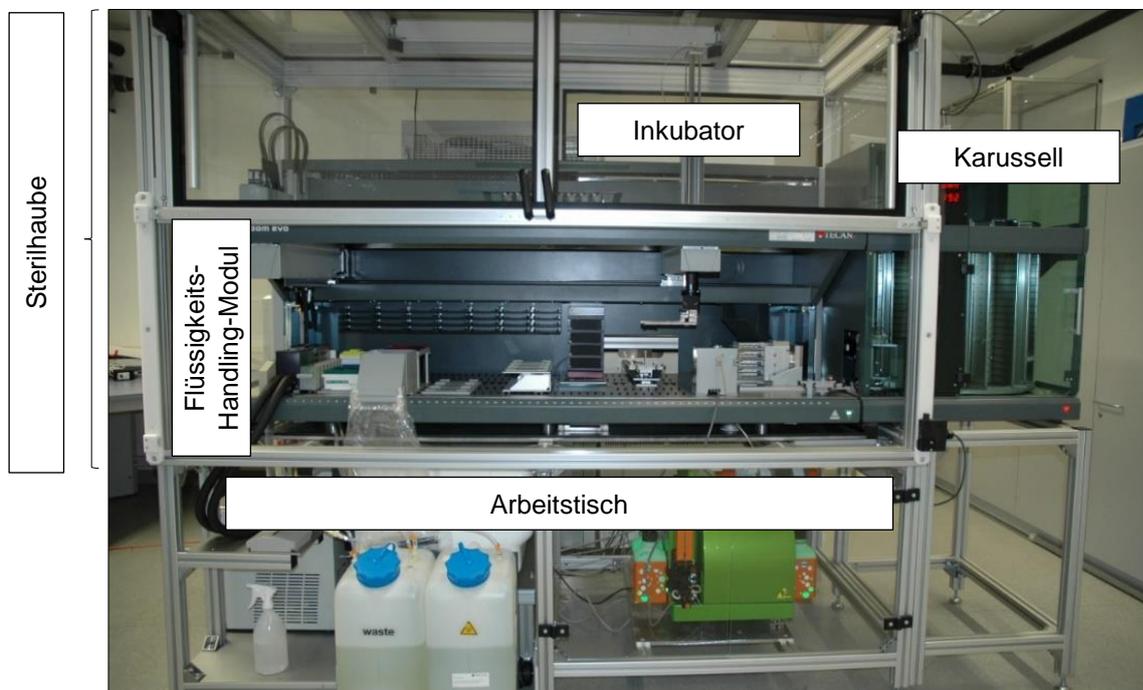


Abbildung 23: Tecan Evo 200 System

Der Aufbau der Liquid-Handling-Plattform Tecan Evo 200, die zur teilautomatisierten Durchführung des Screening-Verfahrens genutzt wurde.

3.2.5.3 Bestimmung der Zellviabilität

Als Kriterium zur Beurteilung der Dunkeltoxizität und induzierten Phototoxizität wurde die Zellviabilität mittels alamarBlue™ Test untersucht. Die aktive Komponente des alamarBlue™ Reagenz ist Resazurin, eine nicht toxische, zellpermeable, blaue, nicht fluoreszierende Substanz. Das Prinzip des Tests beruht auf der Fähigkeit von lebenden Zellen den Redox-Farbstoff Resazurin, in ein fluoreszierendes Endprodukt Resorufin reduzieren. Dadurch kann die Zellviabilität anhand der mitochondrialen enzymatischen Aktivität der Zellen bestimmt werden. Die Reduktion des Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin kann mittels Fluoreszenz-Messung detektiert werden. Der Test wurde analog zu den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde 24 h nach der Bestrahlung bzw. Dunkel-Inkubation das Medium abgesaugt und frisches zellinienspezifisches Medium, versetzt mit 10 % alamarBlue™ Reagenz, hinzupipettiert. Die Inkubationszeit der 2D-Monolayer-Zellkulturen betrug 1 h und der 3D-Tumorsphäroide 3 h. Anschließend wurde die Fluoreszenzmessung mit einem Photometer bei einer Extinktions-Wellenlänge von 560 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 610 nm gemessen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals verhält sich proportional zur Anzahl der vitalen Zellen. Die unbehandelte Zellkontrolle wurde auf 100 % Vitalität gesetzt.

3.2.5.4 Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der freien Photosensibilisatoren und der partikulären Formulierungen wurde eine Analyse der aufgenommenen Wirkstoffkonzentration durchgeführt. Hierzu wurden die 2D-Monolayer-Zellkulturen, nach der Inkubation und dem Waschschrift mit PBS, aus den Well-Platten mittels Trypsin/EDTA gelöst. Die gelösten Zellen wurden in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 115 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit DMSO resuspendiert. Die frei im Medium vorliegenden Tumorsphäroide wurden aus den Well-Platten gesammelt und ebenfalls in Reaktionsgefäße überführt. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und die Tumorsphäroide wurden für 1 h mit Trypsin/EDTA lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Pellet ebenfalls in DMSO resuspendiert. Um eine komplette Freisetzung des Photosensibilisators aus den Zellen zu gewährleisten, wurden sowohl die Proben aus den 2D-Monolayer-Zellkulturen als auch die Proben der 3D-Tumorsphäroide mittels Ultraschall bei einem Puls-Modus von 30 s und einer Arbeitsfrequenz von 20 kHz behandelt. Durch diese Behandlung soll eine komplette Lyse der Zellen garantiert und somit eine annähernd komplette Aufreinigung des Photosensibilisators durchgeführt werden können. Die Zellbestandteile wurden durch erneute Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mittels HPLC-Analyse nach Abschnitt 3.2.1 vermessen.

3.2.6 Spezifische biologische Testsysteme

In einem zweiten Schritt wurden vielversprechende freie und nanopartikuläre Photosensibilisatoren auf ihre mukoadhäsiven und mukopermeablen Eigenschaften untersucht. Hierfür wurden Modelle zur Prüfung der Mukuspermeation, zur Studie von Mukus-adhärenzierenden Eigenschaften und ein vaskularisiertes Darmtumor-Modell entwickelt.

3.2.6.1 Mukus-Chip

Zur Untersuchung der mukuspermeierenden Eigenschaften von freien und partikulären Photosensibilisatoren wurde ein mikrofluidischer Mukus-Chip entwickelt. Voraussetzung für die Entwicklung war ein Modell aufzubauen, welches aus einem Proben-Kompartiment und einem Akzeptor-Kompartiment besteht, die durch eine Mukusschicht voneinander separiert sind. Zusätzlich sollte eine Fluidik integriert werden, die die Begebenheiten im Darm simuliert. Umgesetzt wurde die Entwicklung mit einem mikrofluidischen Chip-System in Kombination mit nativem porcinen Mukus und einer peristaltischen Pumpe (zuvor beschrieben [192]).

Mukus-Präparation und Rheologie

Das primäre Dünndarmgewebe vom Schwein, der Gattung *Sus scrofa domestica*, wurde von einem lokalen Schlachthof (Färber GmbH) bereitgestellt. Die Tiere wurden gemäß der Richtlinie 93/119/EG des Rates vom 22. Dezember 1993 zum Schutz von Tieren geschlachtet und verarbeitet. Der frische porcine Dünndarm wurde in Stücke von ca. 10 cm Länge geschnitten und mit einer Spüllösung zur Entfernung des verbliebenen Chymus gespült [193]. Der Darm wurde anschließend entlang der mesenterialen Linie geöffnet und mit der mucosalen Seite nach oben in eine Präparier-Schale gelegt. Danach wurde der Mukus mit einem Mukus-Spatel isoliert und in ein 50 mL Röhrchen überführt. Der isolierte Mukus wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb von 48 h nach der Präparation verwendet. Der hierfür verwendete Mukus-Spatel wurde aus einer Aluminiumoxid-Keramik-Platte auf eine Breite von 25 mm und eine Länge von 100 mm zugeschnitten. Der vordere Teil des Mukus-Spatels wurde mit einer Kaptonfolie umklebt, um die Kanten des Spatels abzurunden. Dies ermöglichte eine vereinfachte Isolation des Mukus aus dem porcinen Dünndarm. Zudem wurde der Mukus-Spatel genutzt, um den Mukus in den Mukus-Chip einzubringen.

Zur Bestimmung der rheologischen Eigenschaften des primären Mukus wurde ein luftgelagertes Rheometer mit einem Platte-Platte-Aufbau verwendet. Der Plattendurchmesser betrug 25 mm. Die Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt und mit der Software RehoPlus™ gesteuert und ausgewertet. Für die Untersuchung wurden 1,5 mL der jeweiligen Probe in Einwegspritzen überführt. Pro Messung wurde ein Volumen von etwa 400 µL des Mukus auf den Probenhalter aufgebracht und die Sonde auf eine Trimmposition von 0,325 mm herabgefahren. Die überschüssige Probe wurde mit einem Tuch entfernt. Bei der Messung erfolgte alle 2 s eine Aufnahme von 60 Messpunkten bei einer Messposition von 0,3 mm und

einer Scherrate von 1 s^{-1} . Die ersten zehn Messpunkte wurden verworfen, um anfängliche Verfälschungen durch Schubspannung auszuschließen. Jede Probe wurde dreimal gemessen und der arithmetische Durchschnitt berechnet.

Aufbau des Chip-Moduls

Das Chip-Modul im Objektträgerformat ($75 \times 25 \text{ mm}^2$) setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen (Abbildung 24). Als Kartuschenboden wurde eine Polystyrol-Folie verwendet. Auf diese Folie wurde ein $140 \text{ }\mu\text{m}$ dickes doppelseitiges Klebeband geklebt. Dieses Band wurde vor der Montage durch Schneiden strukturiert, um den Mikrofluidikkanal mit einer Länge von 68 mm und einer Breite von 4 mm zu definieren. Der Ein- und Auslaufbereich des Mikrokanals hat eine trichterförmige Geometrie, um eine homogene Strömungsverteilung vom kreisförmigen Einlauf zum Bereich unterhalb der Mikromembran zu ermöglichen. Anschließend wurde ein lasergeschnittenes Edelstahlblech ($500 \text{ }\mu\text{m}$) auf das Klebeband gelegt. Dieses Stahlblech enthielt zwei Löcher, um den fluidischen Kontakt zum darunterliegenden Mikrokanal herzustellen und eine rechteckige Öffnung als Rahmen für den Mikromembran-Chip. Schließlich wurde ein Spritzteil aus Polystyrol mit zwei Luer-Adaptoren auf der Oberseite der Baugruppe, wiederum mit Hilfe eines vorgeschneidene, doppelseitigen Klebebands auf dem Edelstahlblech befestigt. Dieses Band enthielt zwei Öffnungen für die Fluidikanschlüsse und eine große rechteckige Öffnung in der Mitte, um den Zugang von oben zum Mikromembranchip zu ermöglichen. Die fertige Kartusche wird über die zwei Luer-Adapter mit den peripheren Fluidikkomponenten verbunden.

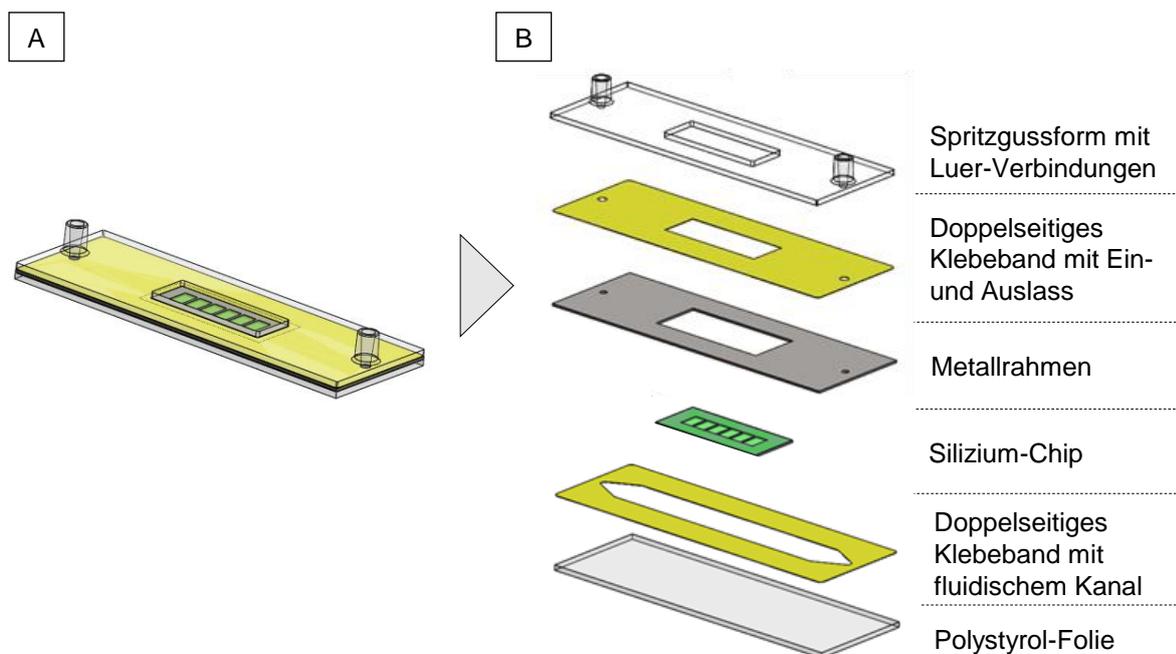


Abbildung 24: Konstruktion des mikrofluidischen Chip-Moduls

(A) Das fertig montierte mikrofluidische Chip-Modul. (B) Detaillierter Aufbau der einzelnen Komponenten des Chip-Moduls. (Abbildung modifiziert nach [192])

Zur Herstellung des Mikromembranchips wurde zunächst ein 500 µm dicker, doppelseitig polierter Siliziumwafer (Durchmesser 100 mm) auf beiden Seiten mit Siliziumnitrid beschichtet. Die Schichtdicke betrug jeweils 1,5 µm und die dünnen Schichten wurden mittels chemischer Gasphasenabscheidung (englisch plasma-enhanced chemical vapour deposition, PECVD) hergestellt. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten, wurden die Parameter für die PECVD auf eine Zugspannung von ca. 80 MPa justiert. Nach der Abscheidung wurden die Nitridschichten auf beiden Seiten des Substrats durch Photolithografie und anschließendes reaktives Ionenätzen (englisch reactive-ion etching, RIE) strukturiert. Die UV-Exposition erfolgte mit dem UV-Kontakt-Belichtungsgerät EVG AL620, unter Verwendung einer Standard-Chrom-Maske und dem positiven Photoresist SP25-10, der mit einer Belichtungs-dosis von 105 mJ / cm² belichtet wurde. Zunächst wurde eine Seite strukturiert, um die rechteckige Membranstruktur zu definieren. Danach wurden mittels RIE (Ätzgase: CF₄ und O₂) rechteckige Öffnungen in die Nitridschicht geätzt. Die zweite Seite des Substrats wurde dann mittels Lithografie und RIE strukturiert, um Mikrolöcher mit einem Lochdurchmesser von 3 µm für die spätere poröse Membranschicht herzustellen. Nasschemisches anisotropes Ätzen in wässrigem KOH (25 %) entfernte das Silizium und legte die Nitridmembranen mit den Mikrolöchern frei. Die Mikromembran-Chips wurden schließlich mit einer Wafersäge vereinzelt. Der produzierte Mikromembranchip hat eine Größe von 28 x 12 mm² und enthält sechs rechteckige Membrane mit einer Fläche von je 5 x 2,5 mm². Jeder Mikromembranchip hat eine Gesamtfläche von 75 mm² und enthält 7750 Mikrolöcher.

Zum Einbringen der Mukusschicht wird eine Filtermembran mit einer Porengröße von 0,4 µm in die rechteckige Öffnung des Chip-Moduls eingesetzt, gefolgt von einem Metallgitter, mit einer Höhe von 0,2 mm, in das der Mukus eingebracht wird (Abbildung 25). Der Mukus wird mit einer Verdrängungspipette auf das Metallgitter aufgebracht und mit dem Mukus-Spatel auf die gesamte Fläche verteilt. Nach dem Füllen des Gitters mit Mukus wird eine zweite Filtermembran darübergelegt.

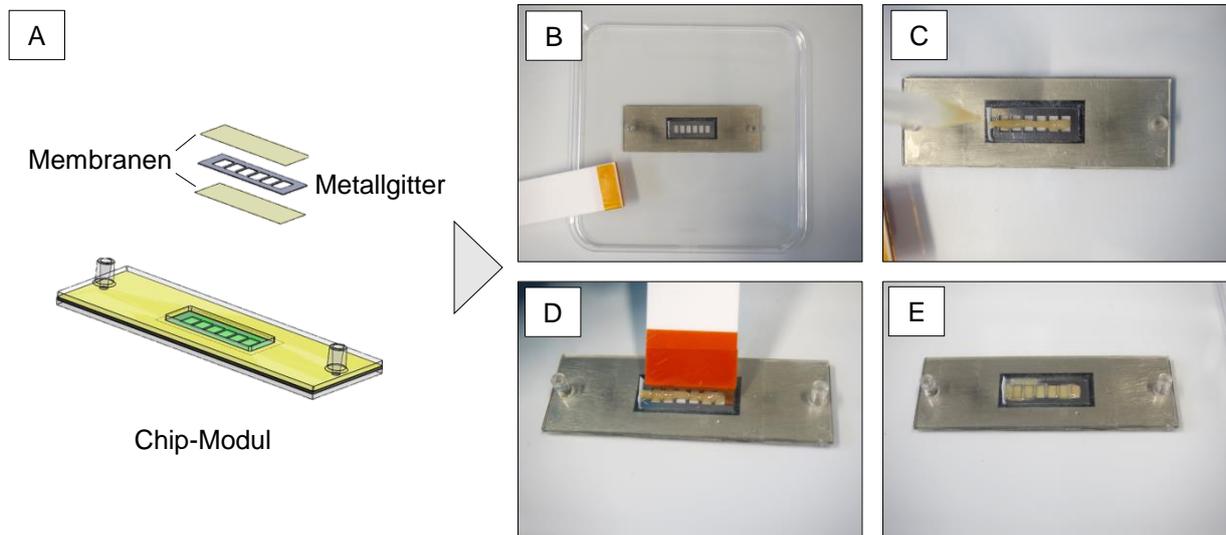


Abbildung 25: Einbringung der Mukusschicht in das mikrofluidische Chip-Modul

A) Der Mukus wird in die Öffnungen des Metallgitters eingebracht, unter dem sich eine Filtermembran befindet. Anschließend wird eine zweite Filtermembran aufgelegt. B) Zeigt das vorbereitete Chip-Modul und den Mukus-Spatel. C) Der Mukus wurde mit einer Verdrängungspipette auf das Metallgitter aufgebracht. D) Mit dem Mukus-Spatel wurde der Mukus im Gitter verteilt. E) Zeigt das mit Mukus befüllte Chip-Modul.

Für das mikrofluidische Chip-Modul wurde eine Halterung konstruiert, die aus einer Grundplatte mit einem Deckel, einer Silikondichtung, einer Halterung für die Silikondichtung und einer Abdeckung besteht (Abbildung 26). Für den Zusammenbau wird zunächst das Chip-Modul auf der Grundplatte positioniert. Die Silikondichtung wird auf die Filtermembranen und das Metallgitter mit dem Mukus gelegt, um diesen Teil des Systems gegen Flüssigkeitsaustritt abzudichten. Die Silikondichtung wird von einer weiteren Metallkomponente gehalten, die für eine homogene Druckverteilung auf der Dichtung sorgt. Abschließend wird die Abdeckung auf die gesamte Konstruktion aufgesetzt und mit der Grundplatte verschraubt. Die Abdeckung hat einen mit Wasser zu füllendem Behälter und kann durch eine dünne Glasscheibe verschlossen werden, um eine feuchte Atmosphäre über der Mukusschicht zu erzeugen.

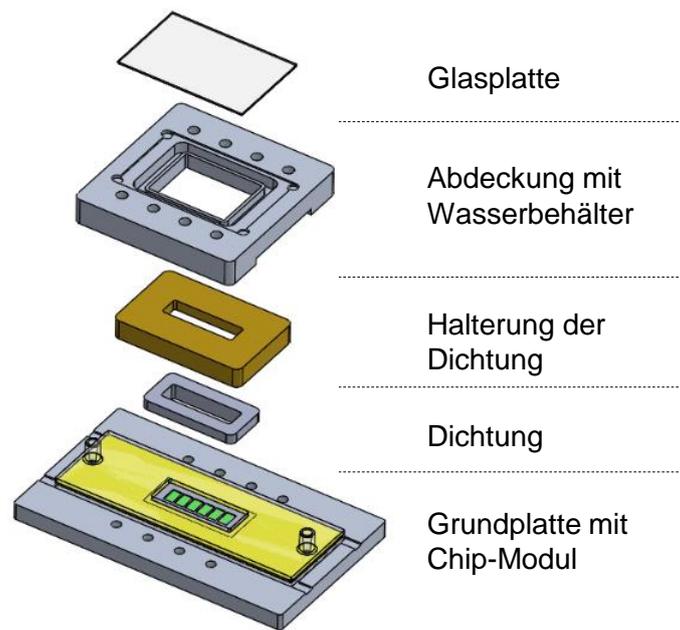


Abbildung 26: Aufbau der Chip-Modul-Halterung

Schematische Darstellung der Halterung für das mikrofluidische Chip-Modul. Diese zeigt die einzelnen Komponenten des kompletten Aufbaus.

Durchführung der Permeations-Studien

Der neu entwickelte und produzierte Mukus-Chip wurde genutzt, um die Permeation der partikulären Formulierungen durch die Mukus-Barriere unter fluidischen Bedingungen zu untersuchen. Zur Simulation der In-vivo-Bedingungen besteht das Mukus-Chip-System aus einem apikalen und basolateralen Kompartiment. Der primäre porcine Mukus wurde mit einem Mukus-Spatel in ein Metallgitter mit einer Höhe von 200 μm eingebracht und zwischen zwei Filtermembranen mit einer Porengröße von 0,4 μm platziert. Die Filtermembranen verhindern eine Destruktion der Mukus-Barriere beim Aufbringen der Probe auf die apikale Seite und durch den Fluss auf der basolateralen Seite. Das Chip-Modul wurde in die Halterung integriert und die Luer-Adapter wurden mit Lock-Adaptoren mit den Schläuchen verbunden. Das gesamte System wurde dann in einen Wärmeschrank mit 37 °C gestellt. Es wurden je Mukus-Chip 10 mL Akzeptorflüssigkeit (Krebs-Ringer-Lösung; pH 7,3) in ein Becherglas pipettiert und die Schläuche des Mukus-Chips damit verbunden. In die Bechergläser wurden Rührfische gegeben und mittels eines Magnetrührers wurde die Akzeptorflüssigkeit mit 100 rpm durchmischt. Zusätzlich wurden die Bechergläser mit Alufolie abgedeckt. Die Akzeptorflüssigkeit wurde von einer Peristaltikpumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,167 mL / min durch den unteren Kanal gepumpt. Das System wurde vor der Aufbringung der Proben für 20 min erwärmt und äquilibriert. Anschließend wurden 200 μL Probenvolumen auf der apikalen Seite aufgebracht. Die Probenentnahme erfolgte alle 30 min über einen

Testzeitraum von insgesamt 3 h. Die aus dem Akzeptormedium entnommene Probenmenge von 200 μL wurde durch frische Krebs-Ringer-Lösung ersetzt. Dieser Verdünnungsfaktor wurde bei der Berechnung der permeierten Substanzmenge berücksichtigt. Als Positivkontrolle wurde Koffein und als Negativkontrolle FITC-Dextran mit einer Größe von 70 kDa, jeweils mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$, verwendet. Die Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bezieht sich auf das Gesamtvolumen des Mukus-Chip-Systems von 10 mL. Für die freien Photosensibilisatoren und die partikulären Formulierungen wurde eine Testkonzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ gewählt. Die Analyse der permeierten Substanzmenge erfolgte mittels HPLC nach der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Methode. Die Konzentration des permeierten FITC-Dextran wurde mit einem Photometer mit einer Extinktions-Wellenlänge von 495 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 525 nm bestimmt. Die analysierten Messwerte wurden prozentual zur eingesetzten Ausgangskonzentration dargestellt.

3.2.6.2 Fluidisches Darmtumor-Modell

Das fluidische Darmtumor-Modell wurde entwickelt, um die mukoadhäsiven Fähigkeiten von freien und partikulären Photosensibilisatoren in einem dynamischen Modell zu untersuchen. Es sollte ein Modell entwickelt werden, das einen Darmtumor im Gastrointestinaltrakt unter dynamischen Bedingungen simulieren kann. Als Zell-Modell wurde ein 3D-Tumorsphäroid aus HT29-MTX-E12 Zellen ausgewählt. Dieser wurde in ein fluidisches Chip-Modul eingebracht, welches das Darmlumen simulieren soll.

Herstellung des mikrofluidischen Chip-Moduls

Das mikrofluidische Chip-Modul wurde in der Größe eines mikroskopischen Objektträgers gefertigt. Es ist aufgebaut aus drei separaten Fluidik-Kanälen mit einer Länge von jeweils 40 mm, einer Höhe 1 mm und einer Breite von 2 mm. An den Enden des Fluidik-Kanals befinden sich runde Öffnungen mit einem Durchmesser von 3 mm für den Ein- und Auslass der Flüssigkeiten und das Einbringen der Tumorsphäroide. Innerhalb des Fluidik-Kanals wurden Mikrosäulen mit einer Höhe von 1 mm und einer Breite von 0,6 mm definiert, um eine mechanische Barriere für die Tumorsphäroide zu bilden. Der Fluidik-Kanal mit den Mikrosäulen und den Fluidik-Anschlüssen für den Ein- und Auslass wurden in einem Replikationsverfahren mit dem Silikonelastomer Sylgard 184 hergestellt. Die Herstellung der Form für den Replikationsprozess erfolgte durch CNC-Fräsen von Messing (Abbildung 27, A und B). Flüssiges Polydimethylsiloxan (PDMS) wurde in die Form gespritzt und nach dem Aushärten wurde das fertige Modul aus der Form gelöst (Abbildung 27, C).

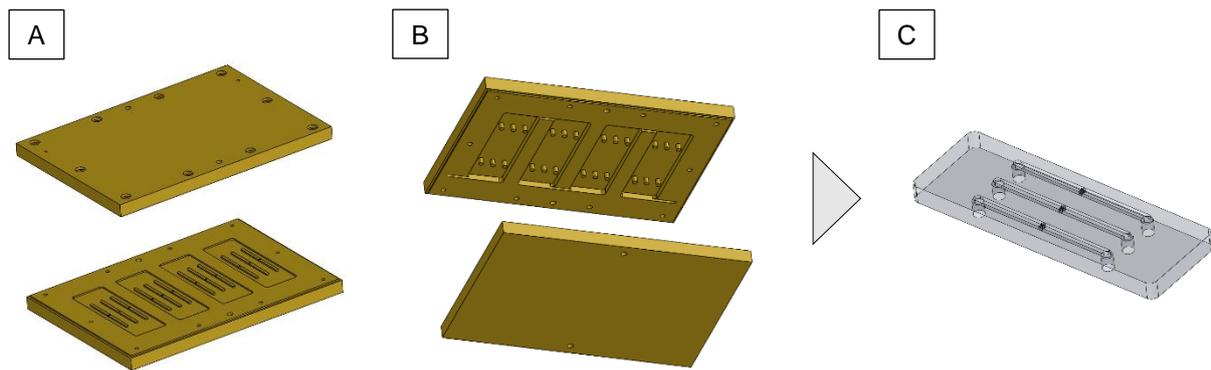


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Messing-Gießform und dem PDMS-Modul

Schematische Zeichnung der mittels CNC-Fräsen hergestellten Messing-Gießform. (A) zeigt das Unterteil und (B) das Oberteil der Gießform. (C) Stellt zeichnerisch das herausgelöste PDMS-Modul dar.

Der Zusammenbau des PDMS-Moduls mit einem Glasobjektträger erfolgte durch plasmagestütztes Verbinden der beiden Komponenten mittels Sauerstoff-Plasmaaktivierung bei 100 W, einem Druck von 1 mbar und einer Plasmabehandlungszeit von 50 s. Hierzu wurden der Glasobjektträger und das hergestellte PDMS-Modul mit Isopropanol gereinigt und getrocknet. Danach wurden sie in die Plasmakammer eingelegt, die Kammer wurde geschlossen und die Sauerstoff-Plasmaaktivierung gestartet. Während der Behandlung werden auf der Glas- und PDMS-Oberfläche funktionelle Gruppen erzeugt (Abbildung 28). Der Prozess wird in der Literatur wie folgt beschrieben:

PDMS als Material besteht vor allem aus sich wiederholenden $-O-Si_2(CH_3)_2-$ Einheiten, die bei einer Exposition mit Sauerstoffplasma unter Abscheidung von Methylgruppen Silanolgruppen bilden. Diese Oberflächen-Oxidation erhöht die Konzentration von Hydroxygruppen ($-OH$), die zu starken, intermolekularen Verbindungen zwischen der Glas- und PDMS-Oberfläche führen. Des Weiteren sind die Silanolgruppen polar, was zu einer stark hydrophilen PDMS-Oberfläche nach der Plasma-Exposition führt. Diese Silanolgruppen kondensieren, wenn sie mit einer weiteren plasmaaktivierten Schicht aufeinandertreffen. Im Falle von PDMS und Glas ergeben diese Reaktionen kovalente $Si-O-Si$ Bindungen, die für die irreversible Verbindung zwischen PDMS und Glas verantwortlich sind [194].

Der Glasobjektträger und das PDMS-Modul wurden vorsichtig aus dem Plasmaofen entnommen und innerhalb von maximal 1 min aufeinander platziert. Es wurde leichter Druck auf die Mitte des PDMS-Moduls ausgeübt, um sicherzustellen, dass eine feste Verbindung zur Oberfläche des Glasobjektträgers entsteht.

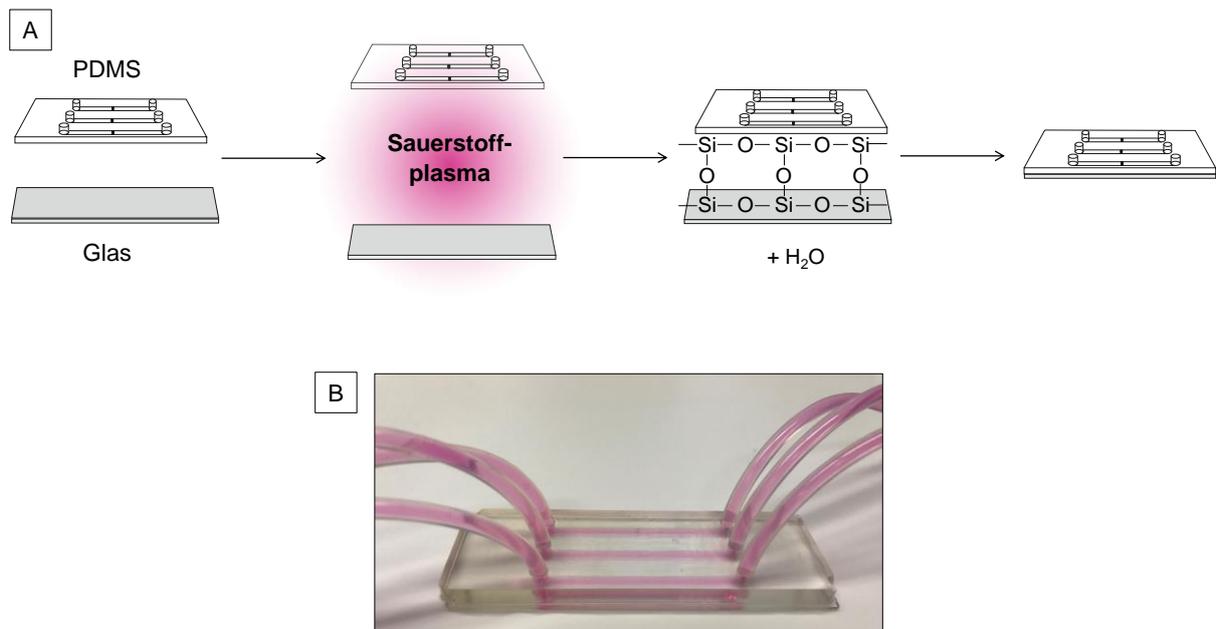


Abbildung 28: Schematische Darstellung der plasmagestützten Verbindung des PDMS-Moduls und des Objektträgers und Bild des fertigen PDMS-Chips

(A) Die Oberflächen des PDMS-Moduls und des Glasobjektträgers bilden nach der Exposition mit Sauerstoffplasma auf der Oberfläche funktionelle Gruppen aus. Durch die Verbindung der beiden Oberflächen entstehen kovalente Bindungen unter Freisetzung von Wasser. (B) Der fertiggestellte PDMS-Chip angeschlossen an das Schlauchsystem und mit Medium befüllt.

Durchführung der Adhäsions-Untersuchungen

Mit dem mikrofluidischen Darmtumor-Modell wurde untersucht, ob freie Photosensibilisatoren und deren partikuläre Formulierungen in einem dynamischen Modell an einer Mukusschicht adhären. Die Versuche wurden in einem Inkubator bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% durchgeführt. Es wurde ein Volumen von 6 mL zellspezifisches Medium in das System eingebracht und mit einer Peristaltik-Pumpe ein Fluss mit einer Geschwindigkeit von $100\text{ }\mu\text{L} / \text{min}$ erzeugt. Diese Flussrate führt im fluidischen Kanal zu einem Scherstress von $0,05\text{ dyn} / \text{cm}^2$, was vergleichbar mit dem erzeugten Scherstress in anderen In-vitro-Darmmodellen ist [195,196]. Zum Erwärmen und Äquilibrieren des Systems wurde der Fluss 30 min vor Beginn der Untersuchungen gestartet. Danach wurden fünf HT29-MTX-E12 Tumorsphäroide, die nach Abschnitt 3.2.3 hergestellt wurden, in den Fluidik-Kanal des Chips eingebracht. Getestet wurden die freien Photosensibilisatoren mTHPC, BLC 2175 und BLC 5152 sowie die vielversprechenden partikulären Formulierungen aus den Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit. Diese wurden mit einer Konzentration von $5\text{ }\mu\text{mol} / \text{L}$ in das Medium-Reservoir pipettiert. Zusätzlich wurden bei jedem Versuchsdurchlauf unbehandelte Tumorsphäroide und eine Lösungsmittelkontrolle analog mitgeführt. Die Tumorsphäroide wurden nach einem Versuchszeitraum von 3 h aus dem Chip entnommen, mit PBS gewaschen und entsprechend der weiteren Analyse präpariert.

Analog wurden Versuche im statischen Modell durchgeführt, um Vergleichswerte zu generieren. Hierzu wurden jeweils fünf HT29-MTX-E12 Tumorsphäroide in 24-Well-Platten

überführt. Zur Vermeidung von Anhaftung der Zellen an die Oberfläche der 24-Well-Platten wurden Suspensions-Zellkulturplatten ausgewählt. Die Behandlung der Tumorsphäroide mit den freien und partikulären Photosensibilisatoren erfolgte in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ für 3 h. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Tumorsphäroide und eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Tumorsphäroide mit PBS gewaschen und analysiert.

Analyse der Adhäsions-Untersuchungen

Zunächst wurde der Einfluss der dynamischen Bedingungen auf die Zellviabilität im Vergleich zu den statischen Bedingungen untersucht. Hierzu wurden nach dem Waschschriff mit PBS jeweils fünf gleich behandelte Tumorsphäroide aus dem Chip in 24-Well-Platten überführt. Zur Messung der Viabilität wurde ein alamarBlue™ Viabilitäts-Test nach Abschnitt 3.2.5.3 durchgeführt. Die Tumorsphäroide, bei denen die Behandlung unter statischen Bedingungen erfolgte, wurden analog getestet. Die Zellkontrolle, die unter statischen Bedingungen generiert wurde, wurde auf 100 % Viabilität gesetzt und die Abweichungen zur statischen Zellkontrolle in Prozent angegeben.

Des Weiteren wurde eine optische Kontrolle mittels Fluoreszenz-Mikroskopie gemacht. Der Photosensibilisator mTHPC hat fluoreszierende Eigenschaften, was eine optische Lokalisation ermöglicht. Dafür wurden jeweils fünf Tumorsphäroide in 96-Well-Platten gesammelt und mikroskopische Aufnahmen gemacht. Entsprechend der vorhandenen Filter des Mikroskops wurden als Extinktions-Wellenlänge 555 nm und als Emissions-Wellenlänge 602 nm verwendet.

Die Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge erfolgte mittels HPLC-Analyse nach Abschnitt 3.2.1. Die detektierten Substanzmengen der unter dynamischen Bedingungen hergestellten Proben wurden mit den Substanzmengen der unter statischen Bedingungen hergestellten Proben verglichen und somit wurde die Fähigkeit der freien und partikulären Photosensibilisatoren in einem dynamischen Modell zu adhären beurteilt.

3.2.6.3 Vaskularisiertes Darmtumor-Modell

Zur Nachbildung eines vaskularisierten In-vivo-Tumors wurde durch Nutzung des HET-CAM-Test ein vaskularisiertes Darmtumor-Modell entwickelt. Mit diesem sollten Untersuchungen der Akkumulation des freien und nanopartikulären Photosensibilisators sowie deren anti-tumorale Wirkung in einem vaskularisierten Tumorsphäroid ermöglicht werden.

Durchführung des HET-CAM-Tests

Für den HET-CAM-Test wurden befruchtete Hühnereier verwendet. Diese wurden nach der Lieferung für drei Tage bei 16 °C gelagert, um sich von den Erschütterungen durch den Transport zu erholen (Abbildung 29). Als Grundlage zur Etablierung der Methode wurde das Protokoll nach Zabielska-Koczywas et al. [197] verwendet und modifiziert. Anschließend

wurde die Bebrütung der Eier durch die Umlagerung in einen Inkubator begonnen. Die Eier wurden mit dem stumpfen Ende nach Oben für drei Tage bei 37,5 °C, 65 % Luftfeuchtigkeit und einer Neigung von 120 Grad bebrütet. Zusätzlich wurden sie 3-mal täglich zur Simulation der natürlichen Brutbedingungen gewendet. Am dritten Tag der Inkubation wurde ein Loch in das stumpfe Ende jedes Eis gebohrt und mit Klebeband verschlossen. Anschließend wurden die Eier für zwei Tage (37,5 °C, 65 % Luftfeuchtigkeit, Neigung 11 Grad alle 2 Stunden) mit den stumpfen Enden nach unten weiter inkubiert. Am 5. Tag der Inkubation wurde ein zweites Loch in das spitze Ende jedes Eis gebohrt, um die Luftblase vom stumpfen Ende zum spitzen Ende zu verschieben. Ein kreisförmiges Fenster mit einem Durchmesser von ca. 1 cm wurde mit einem Dremel vorsichtig in das spitze Ende der Eier gebohrt, ohne dabei die Schalenmembran zu beschädigen. Die Eierschale und die Schalenmembran wurden mit einer Pinzette aus dem Fenster entfernt. Die geöffneten Eier wurden mit Frischhaltefolie verschlossen und 24 Stunden lang in einen Inkubator (37,5 °C, 65% Luftfeuchtigkeit) ohne Kippen inkubiert, bevor am 6. Tag der Inkubation die zuvor nach Abschnitt 3.2.3 produzierten HuTu-80 und HT29-MTX-E12 Tumorsphäroide auf die CAM aufgebracht wurden. In diesem Schritt wurden jeweils fünf Tumorsphäroide pro CAM mit möglichst wenig Flüssigkeit mit einer Pipette auf der CAM appliziert. Die Vitalität und die Entwicklung der Küken-Embryonen sowie die Angiogenese der Tumorsphäroide wurde mikroskopisch überwacht. Die Eier, die eine erfolgreiche Angiogenese und ein Wachstum der applizierten Tumorsphäroide aufwiesen, wurden an Tag 12 mit den freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren behandelt. Diese wurden zuvor mit einer Konzentration von 5 µmol / L im Zell-spezifischen Medium verdünnt. Ein Volumen von 100 µL der Probenlösungen wurden mit einer Pipette langsam auf die Oberfläche des Tumorsphäroids getropft. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h wurde in verschiedenen Versuchsansätzen der induzierte phototoxische Effekt, die Dunkeltoxizität und die im Tumorsphäroid akkumulierte Substanzmenge untersucht. Spätestens am 17. Entwicklungstag wurde der Versuch durch Dekapitation der Embryonen beendet.

Entwicklung einer fokussierten Bestrahlungseinheit

Die Bestimmung des phototoxischen Effekts der freien und partikulären Formulierungen erfordert die Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge. Zur fokussierten Bestrahlung der vaskularisierten Tumorsphäroide wurde daher eine spezielle Bestrahlungseinheit aufgebaut. Zur Aktivierung des Photosensibilisators wird Licht mit einer Wellenlänge von 652 nm benötigt. Hierfür wurde eine kontinuierlich strahlende Laserdiode mit einem Spektralbereich von 635 nm bis 680 nm, einer Peak-Wellenlänge von 635 nm und einer Leistung von 30 mW verwendet. Zum Bündeln des Lichts wurde eine asphärische Linse verwendet mit einem effektiven Fokus von 9 mm. Durch die Verwendung einer Irisblende konnte zudem die zu bestrahlende Fläche variiert werden. Es wurde zudem analog eine

Bestrahlungseinheit aufgebaut, die es ermöglichte, das lichtresponsive Polymer der nanopartikelulären Formulierung LrP-PEG-mTHPC-PLGA zu aktivieren. Hierfür wurde eine Picosekunden-Laserdiode mit einer Peak-Wellenlänge von von 375 nm und einer Leistung von 4 mW verwendet. Auch hier wurde eine UV-Plano-Konvexlinse mit einem effektiven Fokus von 60 mm in Verbindung mit einer Irisblende eingesetzt. Mit Hilfe eines tragbaren Laserstrahl- und Spektralmessgeräts (LaserCheck™) wurde die abstrahlende Lichtleistung (mW) gemessen und die benötigte Zeit zur Erreichung der Bestrahlungsdosis von 50 J / cm² berechnet (siehe Formel 16; Abschnitt 3.2.5.1).

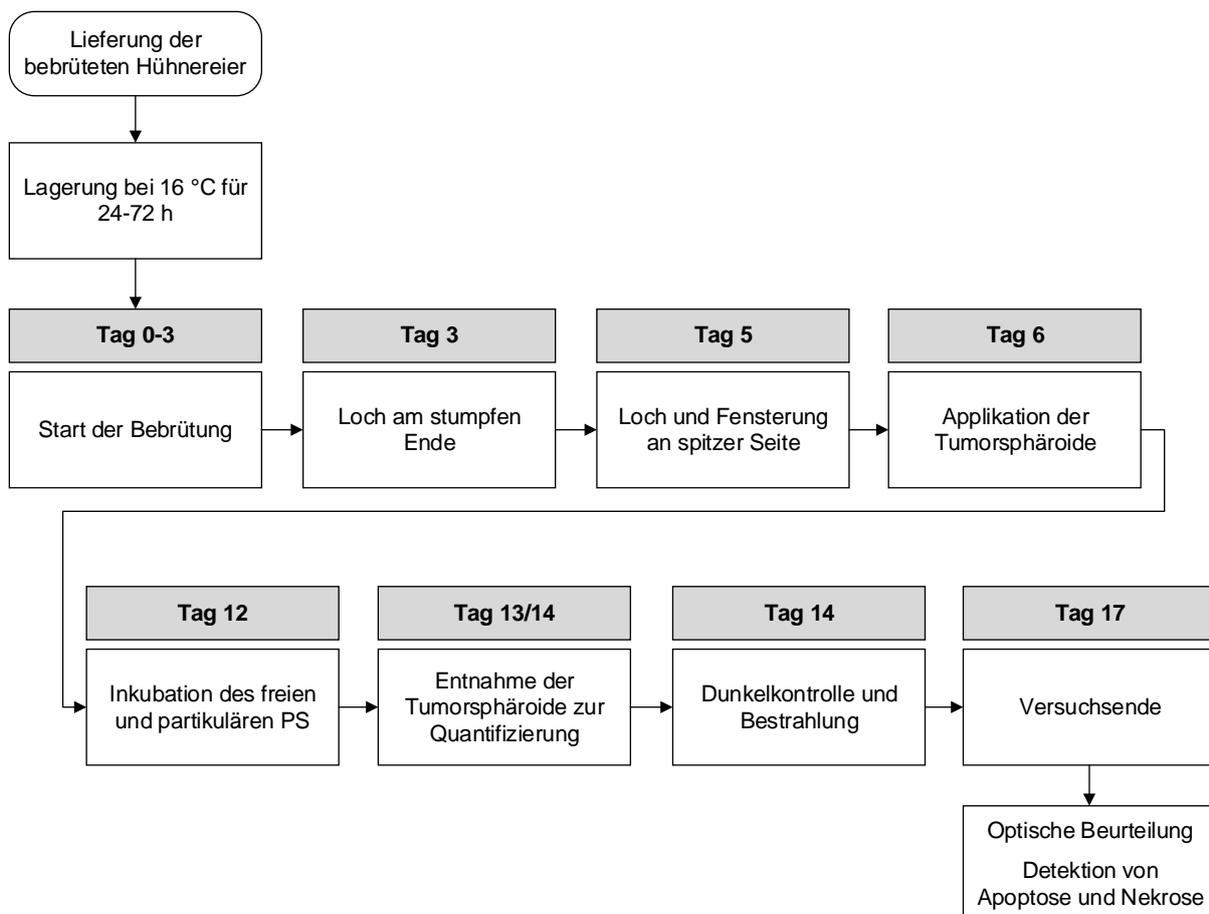


Abbildung 29: Verlaufsdigramm des HET-CAM-Tests

Der HET-CAM-Test zur Untersuchung von vaskularisierten Tumorsphäroiden wurde in einem Zeitraum von 17 Tagen durchgeführt. Die einzelnen Bearbeitungsschritte wurden im Verlaufsdigramm den jeweiligen Bebrütungstagen zugeordnet.

Optische Beurteilung

Die optische Beurteilung wurde bei der Dunkelkontrolle und den bestrahlten Eiern mittels mikroskopischer Aufnahmen durchgeführt. Hierzu wurden vor der Bestrahlung und an Tag 17 Bilder gemacht. Diese wurden miteinander verglichen und optische Veränderung dokumentiert.

Bestimmung der Zellzahl der vaskularisierten Tumorsphäroide

Nach der Behandlung der vaskularisierten Tumorsphäroide wurden diese an Tag 17 von der CAM präpariert und in Reaktionsgefäße überführt. Es wurde 1 mL Trypsin/EDTA zugegeben und auf einen Schüttler bei 37 °C gestellt, um die Zellen des Tumorsphäroid zu vereinzeln. Das Vereinzeln der Zellen dauerte zwischen 5 – 30 min, abhängig von der nach der Bestrahlung verbliebenen Tumorsphäroid-Größe. Danach wurden die Zellen bei 115 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 mL PBS resuspendiert und die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Abschnitt 3.2.2 mittels CASY® TT.

Quantifizierung der akkumulierten Substanzmenge

Zur Quantifizierung der im vaskularisierten Tumorsphäroid akkumulierten Substanzmenge wurden 24 und 48 h nach der Applikation des freien oder partikulären Photosensibilisators der Tumorsphäroid von der CAM präpariert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 mL DMSO in das Reaktionsgefäß pipettiert und der Tumorsphäroid mittels Ultraschall lysiert, um den Photosensibilisator aus den Zellen aufzureinigen. Zur Abtrennung der Zellfragmente wurden die spritzenlosen Filter Mini-UniPrep™ verwendet. Die Substanzmenge in den Proben wurde mittels HPLC-Analyse nach Abschnitt 3.2.1 quantifiziert.

Detektion von apoptotischen und nekrotischen Ereignissen

Die Hauptreaktionen, die durch die PDT in Tumorzellen ausgelöst werden, sind Apoptose und Nekrose. Diese zu detektieren gibt Aufschluss über die zelluläre Zusammensetzung von vaskularisierten Tumorsphäroiden nach der induzierten Phototoxizität. Die Detektion erfolgte mit dem eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit in Kombination mit durchflusszytometrischen Messungen. Bei dieser Messung wird Propidiumiodid in Verbindung mit Annexin V, welches an den grün fluoreszierenden Farbstoff FITC konjugiert ist, verwendet, um die Menge an vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen zu bestimmen. Die Unterscheidung erfolgt durch die Integrität der Zellmembranen, da apoptotische und nekrotische Zellen veränderte Membraneigenschaften aufweisen. Propidiumiodid wirkt als Nukleinsäureninterkalator, der die intakte Zellmembran von vitalen Zellen nicht permeieren kann. Nekrotische Zellen weisen als Merkmal eine beschädigte oder zerstörte Zellmembran auf, daher kann das Propidiumiodid in die Zellen eindringen und mit der DNA des Zellkerns interkalieren. Dies führt zu einer roten Fluoreszenz-Markierung von nekrotischen Zellen. In apoptotischen Zellen findet eine Translokation des Membran-Phospholipids Phosphatidylserin vom Zellinneren zur Zellaußenseite statt. Annexin V ist ein Phospholipidbindendes Protein, welches eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin aufweist und ist folglich ein sensitiver Marker für die Detektion von apoptotischen Zellen. Diese Zellen weisen eine grüne Fluoreszenz-Markierung aufgrund der Verwendung von FITC konjugiertem Annexin V auf. Vitale Zellen mit einer intakten Membran zeigen in den Messungen keine oder nur eine geringe Fluoreszenz.

Durchgeführt wurden die Messungen mit vaskularisierten HuTu-80 und HT29-MTX-E12 Tumorsphäroiden, die mit 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ mTHPC und 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ partikulären Formulierungen behandelt wurden. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die vaskularisierten Tumorsphäroide mit 50 J / cm^2 bestrahlt. Bei jeder Untersuchung wurde eine unbehandelte Zellkontrolle mitgeführt. 72 h nach der Bestrahlung wurden die vaskularisierten Tumorsphäroide von der CAM präpariert und in Reaktionsgefäße überführt. Die Vereinzelnung der Zellen wurde mittels 1 mL Trypsin/EDTA innerhalb von 5 bis 30 min auf einem Schüttler bei 37 °C durchgeführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 115 g und die Resuspension des Zellpellets in 1 mL PBS. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers. Nach den Waschschritten wurden die Zellen mittels CASY[®] TT (siehe Abschnitt 3.2.2) gezählt und mit einer Konzentration von 5×10^6 Zellen / mL im Bindungspuffer des Kits verdünnt. Es wurden 5 μL der FITC-Konjugierten Annexin V-Lösung pro 100 μL Zellsuspension hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und erneut mit 200 μL Bindungs-Puffer resuspendiert. Danach folgte die Zugabe von 5 μL Propidiumiodid Lösung. Die Proben wurden in Probenröhrchen überführt und innerhalb von 4 h mittels Durchflusszytometrie vermessen. Bei der Durchflusszytometrie wird die durch eine Laserquelle induzierte Emission von fluoreszenzmarkierten Zellen gemessen. Hierzu wird die Zellsuspension aus den Probenröhrchen durch eine Kapillare geleitet und einzeln am Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Messungen wurden mit dem Gerät FACSCalibur[™] durchgeführt. Pro Probe wurden 10 000 Zellen gezählt und mit der CellQuest[™] Pro Software analysiert und ausgewertet. Apoptotische Zellen wurden durch grüne Fluoreszenz identifiziert, nekrotische Zellen durch rote Fluoreszenz und vitale Zellen wurden als nicht fluoreszierende Zellen gewertet.

3.2.7 Statistische Auswertung der Untersuchungen

Es wurden Signifikanztests durchgeführt, um zu prüfen, ob die Unterschiede zwischen den generierten Daten zufällig sind oder diese von den Versuchsbedingungen abhängen. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 5\%$ (0,05) gewählt. Der Wert gilt als Standardwert in den Biowissenschaften [174]. In den Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit fand ein Vergleich zwischen den arithmetischen Mittelwerten der gleichbehandelten Dunkelkontrolle und der bestrahlten Probe statt. Zunächst wurden die Werte auf Normalverteilung und die Varianz-Homogenität überprüft. Die Normalverteilung wurde nach David *et al.* [176] geprüft (siehe Formel 1; Abschnitt 3.2.1.1). Zur Prüfung der Homogenität zweier Varianzen wurde der F-Test angewendet. Hierzu wurde der Prüfwert F aus den Varianzen (Formel 17) der Stichproben bzw. Messwertreihen (Formel 18) errechnet [178]. Anschließend wurde zum Vergleich der Mittelwerte der Welch-Test durchgeführt. Hierzu wurde die Prüfgröße nach Welch (Formel 19) und die Anzahl Freiheitsgrade (Formel 20) berechnet [174]. Die errechnete Prüfgröße wird mit dem Tabellenwert verglichen (Anhang: Statistische Tabellen - Tabelle 25).

Ist die Prüfgröße größer als der Tabellenwert liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ein signifikanter Unterschied vor.

Formel 17: Vergleich zweier Varianzen nach dem F-Test [178]

$$PG_F = \frac{s_A^2}{s_B^2}$$

Mit:

PG_F = Prüfgröße berechnet nach dem F-Test

s_A^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe A

s_B^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe B

Formel 18: Berechnung der Varianzen s^2 [178]

$$s_A^2 = \frac{\sum x_A^2 - \frac{(\sum x_A)^2}{n}}{n - 1}$$

$$s_B^2 = \frac{\sum x_B^2 - \frac{(\sum x_B)^2}{n}}{n - 1}$$

Mit:

s_A^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe A

s_B^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe B

x_A bzw. x_B = Werte der Messwertreihen A und B

n = Stichprobenumfang

Formel 19: Berechnung der Prüfgröße nach Welch [174]

$$PG_{Welch} = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_A^2}{n_1} + \frac{s_B^2}{n_2}}}$$

Mit:

PG_{Welch} = Prüfgröße berechnet nach Welch

\bar{x} = Mittelwert Messwertreihe A

\bar{y} = Mittelwert Messwertreihe B

s_A^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe A

s_B^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe B

n_1 = Stichprobenumfang Messwertreihe A

n_2 = Stichprobenumfang Messwertreihe B

Formel 20: Ermittlung der Anzahl der Freiheitsgrade [174]

$$f = \frac{\left(\frac{s_A^2}{n_1} + \frac{s_B^2}{n_2}\right)}{\frac{\left(\frac{s_A^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_B^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

Mit:

f = Anzahl der Freiheitsgrade

\bar{x} = Mittelwert Messwertreihe A

\bar{y} = Mittelwert Messwertreihe B

s_A^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe A

s_B^2 = Varianz der Stichprobe bzw. Messwertreihe B

n_1 = Stichprobenumfang Messwertreihe A

n_2 = Stichprobenumfang Messwertreihe B

4 Ergebnisse

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war der Einsatz der photodynamischen Therapie (PDT) zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen. Die PDT ist ein Verfahren, das zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden kann. Dabei wird dem Patienten ein lichtaktivierbarer Wirkstoff (Photosensibilisator) verabreicht, der in Kombination mit Licht einer spezifischen Wellenlänge und dem in Zellen vorliegenden Sauerstoff Radikale bildet. Diese führen zu einer biologischen Zerstörung der Zellen und zum Zelltod. Für den Transport der Photosensibilisatoren zum Wirkort wurden nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme entwickelt und synthetisiert. Zum spezifischen Targeting am Wirkort wurden Nanopartikel mit mukoadhäsiven und mukopermeablen Eigenschaften entwickelt. Im ersten Schritt fanden Wirkstoff-Screenings statt, um die Effektivität der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren zu überprüfen. Es wurden 2D-Monolayer und 3D-Tumorsphäroide als In-vitro-Modelle aus den Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 etabliert. Als Kriterium zur Überprüfung der Phototoxizität und der Dunkelkontrolle wurden Zellviabilitäts-Tests durchgeführt. Dies ermöglichte eine Auswahl vielversprechender freier und nanopartikulärer Photosensibilisatoren, die in einem zweiten Schritt mit neu entwickelten, spezifischen präklinischen Testsystemen untersucht wurden. Die Quantifizierung der Photosensibilisatoren in den verschiedenen biologischen Proben aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgte mittels HPLC-Analyse.

4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Zur quantitativen Analyse der verwendeten Photosensibilisatoren mTHPC, mTHPP, BLC 2175, BLC 5152 und der Kontrollsubstanz Koffein wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Um sicherzustellen, dass die entwickelte Methode für die gegebene Fragestellung geeignet ist, wurde eine Methodvalidierung nach der ICH-Guideline [198] durchgeführt. Hierfür wurde für jede Substanz eine lineare Verdünnungsreihe (Standard ST A-F) aus vier voneinander unabhängigen Stammlösungen angesetzt und jeweils 2-fach vermessen. Anhand dieser linearen Verdünnungsreihe wurden die Kriterien der Validierungsparameter mit statistischen Methoden überprüft. Im Folgenden sind die Ergebnisse des Validierungsprozesses der Substanz mTHPC dargestellt. Die Substanzen mTHPP, BLC 2175, BLC 5152 und der Kontrollsubstanz Koffein wurden gleichermaßen validiert und erfüllten alle Kriterien der einzelnen Parameter (Kalibrierungsdaten nicht gezeigt).

4.1.1 Beurteilung der Messwertreihe

Die während der Methodvalidierung erzeugten Werte, wurden zunächst nach objektiven Kriterien geprüft. Dies ermöglichte eine Beurteilung der Messwerte. Die Messergebnisse wurden gemäß der beschriebenen HPLC-Methode (siehe Abschnitt 3.2.1) detektiert und sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Messungen der mTHPC-Standardreihen

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Messungen der mTHPC-Standardreihen mit ST = Standard, AUC = Fläche unter der Kurve (Area under the curve), M_n = Messung, \bar{x} = Mittelwert der Standards, $s = \pm$ Standardabweichung

ST	mTHPC $\mu\text{mol} / \text{L}$ $\mu\text{g} / \text{mL}$		AUC [mAU*s]								\bar{x}	s
			Stammlösung 1		Stammlösung 2		Stammlösung 3		Stammlösung 4			
			M_1	M_2	M_1	M_2	M_1	M_2	M_1	M_2		
A	0,025	0,017	0,927	0,919	0,972	0,954	0,955	0,927	0,953	0,948	0,944	$\pm 0,018$
B	0,074	0,050	2,838	2,824	2,840	2,857	2,786	2,773	2,862	2,894	2,834	$\pm 0,040$
C	0,222	0,151	8,359	8,576	8,466	8,539	8,419	8,556	8,422	8,482	8,477	$\pm 0,076$
D	0,667	0,454	25,907	25,157	25,415	25,001	24,869	25,396	25,298	24,958	25,250	$\pm 0,334$
E	2,000	1,361	74,413	74,574	74,285	74,343	74,335	74,215	74,501	74,323	74,374	$\pm 0,117$
F	6,000	4,084	229,030	227,562	228,592	230,437	231,129	227,330	228,918	229,115	229,014	$\pm 1,289$

Die Messwertreihe wurde auf Normalverteilung, auf Ausreißer und auf das Vorliegen eines Trends überprüft (Tabelle 5). Die berechnete Prüfgröße PG_{David} zur Beurteilung der Normalverteilung lag bei allen Standards der Messwertreihe zwischen den Tabellenwerten $a = 2,500$ und $b = 3,399$. Daraus ergab sich, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % die Werte normalverteilt waren. Aufgrund der vorliegenden Normalverteilung konnte der Ausreißertest nach Dean-Dixon durchgeführt werden. Die Prüfung erfolgte nach unten, wobei der kleinste Wert der Messwertreihe geprüft wurde und nach oben, wobei der größte Wert der Messwertreihe geprüft wurde. Die Prüfung ergab, dass kein Ausreißer innerhalb der Messwertreihe vorlag, da der kritische Wert von 0,526 weder bei der Prüfung nach unten noch bei der Prüfung nach oben überschritten wurde. Ein Kriterium zur objektiven Beurteilung der Messwertreihe ist die Prüfung auf Vorliegen eines Trends. Dieser wurde nach dem Trendtest nach Neumann rechnerisch überprüft. Die errechneten Prüfgrößen lagen alle über dem kritischen Wert von 0,983. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Abweichung der benachbarten Werte voneinander geringer war als die Abweichung vom Mittelwert. Somit lag kein Trend vor.

Tabelle 5: Überprüfung der Messwertreihe auf Normalverteilung, Ausreißer und Trends

Die Tabelle enthält die berechneten Prüfgrößen der Normalverteilung, des Ausreißertests und des Trendtests. „Ja“ bei der Überprüfung auf Normalverteilung bedeutet, dass die Werte normalverteilt waren und die Prüfgröße (PG_{David}) zwischen den kritischen Werten a und b lagen. „Nein“ beim Ausreißertest bedeutet, dass die Prüfgrößen ($PG_{Dean-Dixon}$) unterhalb des kritischen Werts lagen und somit kein Ausreißer vorlag. Beim Trendtest nach Neumann bedeutet „Nein“, dass kein Trend vorhanden war und die Prüfgröße ($PG_{Neumann}$) über dem kritischen Wert lag. (mit ST = Standard)

ST	Normalverteilung			Ausreißertest				Trendtest	
	PG_{David}	a	b	Prüfwert nach unten		Prüfwert nach oben		$PG_{Neumann}$	kritischer Wert
		2,500	3,399	$PG_{Dean-Dixon}$	0,526	$PG_{Dean-Dixon}$	0,526		
A	3,118	JA		0,151	NEIN	0,321	NEIN	1,817	NEIN
B	3,270	JA		0,107	NEIN	0,264	NEIN	1,087	NEIN
C	3,056	JA		0,276	NEIN	0,092	NEIN	2,653	NEIN
D	3,316	JA		0,086	NEIN	0,474	NEIN	1,597	NEIN
E	3,264	JA		0,195	NEIN	0,203	NEIN	1,671	NEIN
F	3,150	JA		0,061	NEIN	0,182	NEIN	1,853	NEIN

4.1.2 Richtigkeit (Accuracy)

Die Richtigkeit des analytischen Verfahrens ist das Maß der Übereinstimmung zwischen der rechnerisch ermittelten Substanz-Konzentration und dem Soll-Wert der Substanz-Konzentration. Zur Ermittlung der geeigneten Analyseverfahren, wurden die lineare Analysefunktion und die Analyse mittels Responsefaktor (RF) gegenübergestellt (Tabelle 6). Vergleicht man die Soll- und Ist-Werte der mittels Responsefaktor ermittelten mTHPC-Konzentrationen, wiesen diese innerhalb des Arbeitsbereichs eine Differenz vom Soll-Wert zum Ist-Wert von -2,092 bis 0,740 % auf (Tabelle 6).

Tabelle 6: Prüfung auf Richtigkeit des analytischen Verfahrens

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden die Ist- und Soll-Werte der mTHPC-Konzentrationen gegenübergestellt. Die mTHPC-Konzentration wurden mittels Responsefaktor (RF) berechnet. Die Differenz zum Soll-Wert ist in Prozent [%] angegeben. Mit ST = Standard, AUC = Fläche unter der Kurve (Area under the curve), \bar{x} = Mittelwert der Standards

ST	mTHPC			Berechnung mTHPC-Konzentration		Differenz Soll-Wert zu Ist-Wert
	Soll-Wert		AUC	RF 55,855		
	$\mu\text{mol} / \text{L}$	$\mu\text{g} / \text{mL}$	\bar{x}	$\mu\text{mol} / \text{L}$	$\mu\text{g} / \text{mL}$	
A	0,025	0,017	0,944	0,025	0,017	0,700
B	0,074	0,050	2,834	0,075	0,051	0,740
C	0,222	0,151	8,477	0,223	0,152	0,439
D	0,667	0,454	25,25	0,665	0,452	-0,280
E	2,000	1,361	74,374	1,958	1,332	-2,092
F	6,000	4,084	229,014	6,030	4,100	0,494

Zusätzlich wurden die errechneten Abweichung zum Soll-Wert grafisch dargestellt (Abbildung 30). Diese verdeutlicht den Bereich, in dem die Ist-Werte von den Soll-Werten abwichen. Als obere und untere Grenze wurde ein Wert von $\pm 2,5\%$ gewählt.

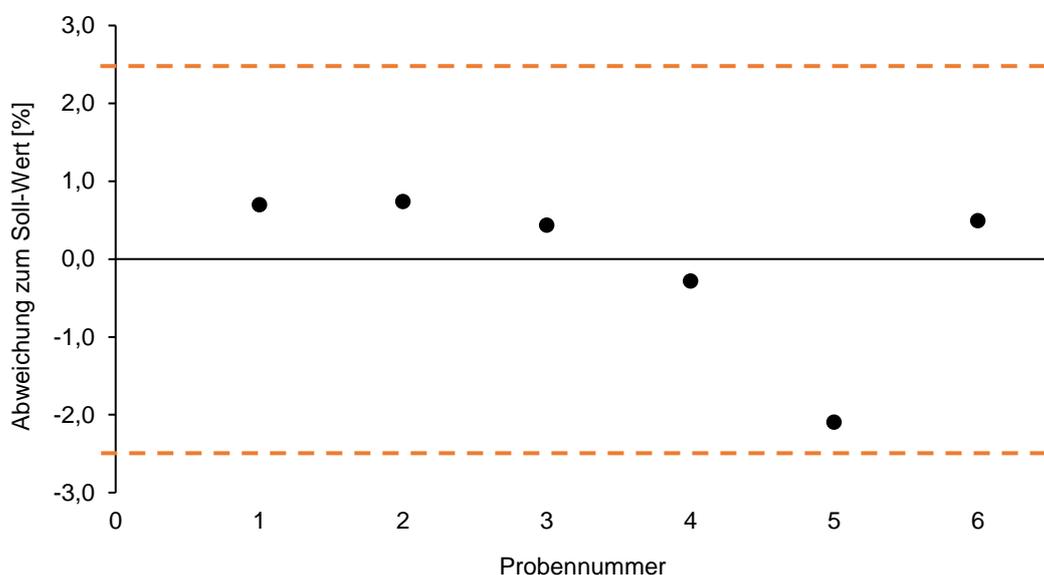


Abbildung 30: Darstellung der errechneten Abweichung zum Soll-Wert

Die Abweichung des errechneten Ist-Wertes ist in Prozent dargestellt. Die Grenzen wurden auf $\pm 2,5\%$ gesetzt.

4.1.3 Präzision (Precision)

Die Präzision ist das Maß für die Streuung der Analyseergebnisse. Die Präzision wurde mit den Unterparametern Wiederholbarkeit und intermediäre Präzision ermittelt.

Wiederholbarkeit (Repeatability)

Die Standards ST B, ST D und ST F derselben Messwertreihe wurden viermal hintereinander unter gleichen Bedingungen injiziert (Tabelle 7). Als Maß für die Richtigkeit wurde der Variationskoeffizient mit einer Grenze von $\leq 2\%$ überprüft. Der Variationskoeffizient von ST B betrug 0,9 %, von ST D 1,6 % und von ST F 0,7 %. Da alle V_k -Werte unterhalb der Grenze von $\leq 2\%$ lagen, wurde die Wiederholbarkeit bewiesen.

Tabelle 7: Prüfung der Methode auf Wiederholbarkeit

Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit, wurde viermal die gleiche Probe unter gleichen Bedingungen vermessen und der Variationskoeffizient (V_k) rechnerisch ermittelt. Als Grenze für eine bewiesene Wiederholbarkeit wurde ein $V_k \leq 2\%$ akzeptiert. Mit ST = Standard, AUC = Fläche unter der Kurve (Area under the curve), M_n = Messung, \bar{x} = Mittelwert der Standards, $s = \pm$ Standardabweichung

ST	mTHPC		AUC [mAU * s]				\bar{x}	s	V_k [%]
	$\mu\text{mol} / \text{L}$	$\mu\text{g} / \text{mL}$	M_1	M_2	M_3	M_4			
B	0,074	0,050	3,062	3,021	3,021	3,085	3,047	$\pm 0,027$	0,9
D	0,667	0,454	26,183	25,907	25,157	25,415	25,665	$\pm 0,402$	1,6
F	6,000	4,084	228,592	230,437	231,129	227,330	229,372	$\pm 1,500$	0,7

Intermediäre Präzision (Intermediate Precision)

Die intermediäre Präzision wurde überprüft, indem drei Konzentrationen (ST B, ST D, ST F) von zwei verschiedenen Personen angesetzt wurden und jeweils an zwei unterschiedlichen Tagen in Doppelbestimmung vermessen wurden (Abschnitt 3.2.1). Da der Variationskoeffizient (V_k) bei allen Standards $\leq 2\%$ war, konnte die intermediäre Präzision bestätigt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Darstellung der intermediären Präzision

Die intermediäre Präzision wurde von zwei Personen (A und B) an zwei verschiedenen Tagen überprüft. Die Messwerte der einzelnen Tage wurden aus einer Doppelbestimmung ermittelt. Der sich daraus ergebende V_k [%] ist das Maß für die intermediäre Präzision. Mit ST = Standard, AUC = Fläche unter der Kurve (Area under the curve), \bar{x} = Mittelwert der Standards, $s = \pm$ Standardabweichung

Person	Tag	AUC [mAU * s]		
		SB	SD	SF
A	1	2,786	25,183	229,115
	2	2,773	24,869	230,437
B	1	2,898	25,143	229,423
	2	2,864	24,950	228,918
Person A	\bar{x}	2,779	25,026	229,776
	s	$\pm 0,006$	$\pm 0,157$	$\pm 0,661$
	V_k [%]	0,232	0,626	0,288
Person B	\bar{x}	2,881	25,047	229,171
	s	$\pm 0,017$	$\pm 0,097$	$\pm 0,253$
	V_k [%]	0,588	0,385	0,110
Person A und B	\bar{x}	2,830	25,036	229,473
	s	$\pm 0,052$	$\pm 0,131$	$\pm 0,585$
	V_k [%]	1,848	0,521	0,255

4.1.4 Detektions- und Quantifizierungslimit (Detection and Quantitation Limit)

Das Detektionslimit ist die geringste Analytmenge, die mit der analytischen Methode detektiert werden kann. Die lineare Verdünnungsreihe zur Ermittlung des Detektionslimits umfasste einen Konzentrationsbereich von 0,002 – 4,080 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ab einer Konzentration von 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konnte ein Signal gemessen werden, welches sich deutlich vom Blindwert unterschied. Daher wurde für das Detektionslimit ein Wert von 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 0,006 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ für die verwendete analytische Methode gewählt.

Das Quantifizierungslimit der analytischen Methode entspricht der kleinsten Substanz-Konzentration, die quantitativ mit einer angemessenen Präzision ermittelt werden kann. Als Maß für die Präzision wurde der Variationskoeffizient (V_k) verwendet. Die Variation der gemessenen AUCs betragen ab einer Konzentration von 0,008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 0,012 $\mu\text{mol}/\text{mL}$

einen V_k von $\leq 2\%$. Diese Werte entsprachen der gewählten V_k -Grenze für eine vorhandene Präzision von $\leq 2\%$. Aufgrund dieses Ergebnisses betrug das Quantifizierungslimit $0,008 \mu\text{g} / \text{mL}$ bzw. $0,012 \mu\text{mol} / \text{mL}$.

4.1.5 Linearität (Linearity)

Die Linearität der Methode bezieht sich auf den Zusammenhang zwischen dem Signal (hier AUC) und der mTHPC-Konzentration der einzelnen Standards innerhalb der Messwertreihe. Aus diesen Messwerten (Tabelle 4) wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abbildung 31).

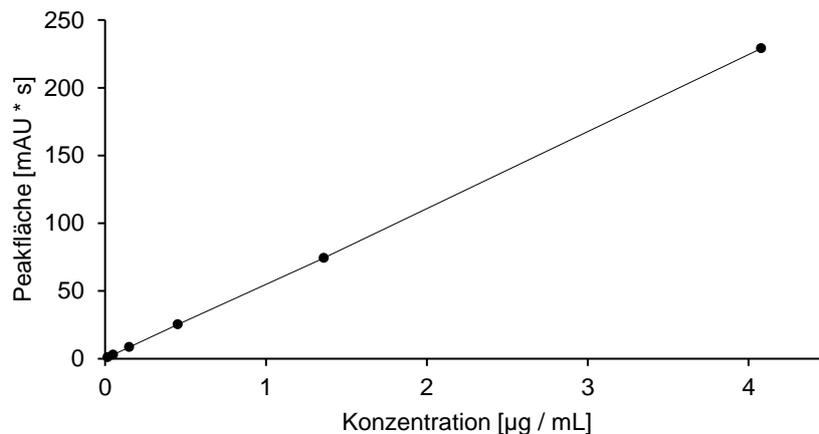


Abbildung 31: Kalibriergerade aus den Daten der Tabelle 4

Zur Erstellung der Kalibrierdaten wurden die gemessenen Werte der Standards der bekannten mTHPC-Konzentration gegenübergestellt.

Zur Beurteilung der Kalibriergeraden wurden die Kenngrößen Korrelationskoeffizient, der y-Achsenabschnitt und die Steigung der Regressionskurve rechnerisch ermittelt (Tabelle 9). Die ermittelten Kenngrößen der Kalibriergerade lagen für den Korrelationskoeffizienten bei 1,000, für den y-Achsenabschnitt bei einem Wert von -0,313 und für die Steigung der Regressionskurve bei 56,086. Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für die Abweichung der Messwerte von der Ausgleichgeraden. Der errechnete Wert von 1,000 sagt aus, dass alle Messwerte auf der Ausgleichgeraden lagen. Somit lag keine rechnerische Abweichung vor. Insgesamt zeigten die Messgrößen einen linearen Zusammenhang und die Linearität der Messwertreihe konnte bestätigt werden.

Tabelle 9: Kenngrößen der linearen Regression

Die Kenngrößen zur Beurteilung der linearen Regression umfassen den Korrelationskoeffizienten (r), den y-Achsenabschnitt (a) die Steigung der Regressionskurve (b).

Kenngröße	Formelzeichen	Ergebnis
Korrelationskoeffizient	r	1,000
y-Achsenabschnitt (Ordinatenabschnitt)	a	-0,313
Steigung der Regressionskurve	b	56,086

4.1.6 Robustheit (Robustness)

Durch die Überprüfung der Robustheit konnte bewertet werden, ob die Einflussfaktoren Flussrate und Temperatur einen Einfluss auf die Analyse von mTHPC haben. Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurden die Einflussfaktoren Flussrate und Temperatur überprüft. Eine Veränderung der Flussrate um $\pm 5\%$ hatte keinen Einfluss auf die Peakfläche und Retentionszeit. Somit war eine Veränderung der Flussrate um $\pm 5\%$ als nicht kritisch einzustufen. Des Weiteren wurde die Säulentemperatur um $\pm 5\%$ verändert. Auch diese Änderung hatte keinen Einfluss auf die Peakfläche und Retentionszeit und galt daher ebenfalls als nicht kritische Änderung.

4.1.7 Spezifität (Specificity)

Die Spezifität wurde überprüft, um sicherzustellen, dass die zu analysierende Substanz nicht durch Matrix-Bestandteile beeinflusst wurde. In Abbildung 32 ist ein Chromatogramm (A) der Probenmatrix gezeigt und ein Chromatogramm (B) der Probenmatrix in der sich der Analyt mTHPC befand. Diese zeigten, dass die zu untersuchende Substanz mTHPC von den Bestandteilen der Probenmatrix gut separiert wurden. Daher konnte ein Einfluss der Probenmatrix auf den Peak des Analyten ausgeschlossen werden.

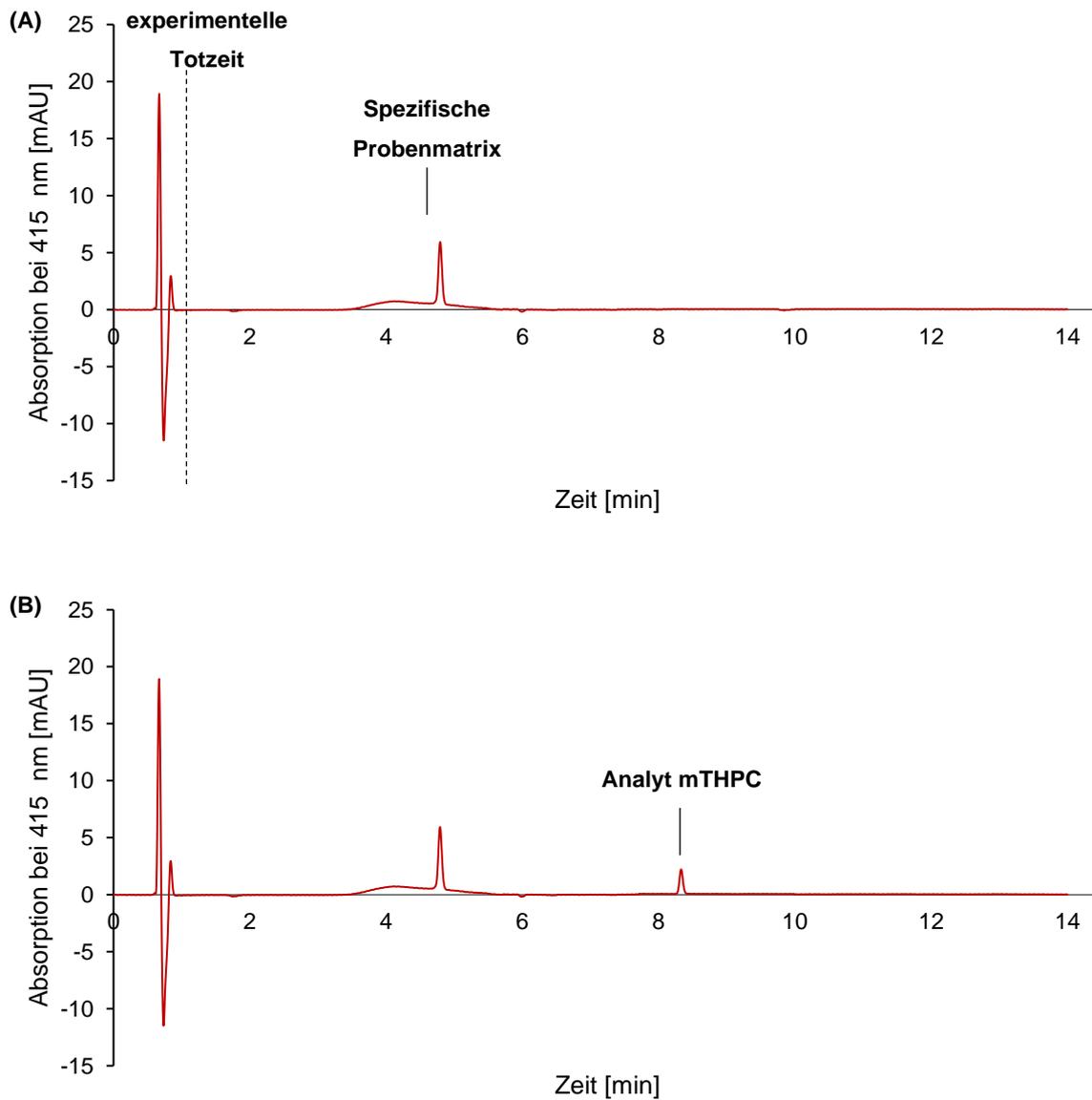


Abbildung 32: Spezifität der analytischen Methode

Gezeigt sind die Chromatogramme der Probenmatrix (A) und der Messung der Substanz mTHPC (B). (A) Im Chromatogramm zu sehen ist die experimentelle Totzeit und die spezifische Probenmatrix. (B) Darstellung des Analyten mTHPC in einer realen Probe mit spezifischer Probenmatrix.

4.2 Entwicklung mukoadhäsiver und mukopermeabler Nanopartikel

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung nanopartikulärer Arzneistoffträgersysteme für die Behandlung von Dünndarmkarzinomen mit der photodynamischen Therapie. Der zu inkorporierende Photosensibilisator weist hydrophobe Eigenschaften auf, was zu einer schlechten Bioverfügbarkeit führt [199]. Des Weiteren gilt eine gesteigerte kutane Lichtempfindlichkeit als die häufigste Nebenwirkung, die durch die systemische Verteilung des freien Photosensibilisators ausgelöst wird. Durch die Verwendung von nanopartikulären Formulierungen soll eine verbesserte Löslichkeit und eine gezielte Freisetzung des Photosensibilisators im Zielgewebe erreicht werden. Anforderungen an das nanopartikuläre System ist die hydrophoben Eigenschaften des Photosensibilisators zu maskieren und die gezielte Anreicherung im Tumorgewebe zu verbessern. Als Basismaterial für die Herstellung der Nanopartikel wurde PLGA gewählt. PLGA ist ein von der FDA für die Arzneimittelherstellung zugelassenes Polymer, das eine hohe Biokompatibilität aufweist. Ausgehend von diesem Basismaterial sollten zwei unterschiedliche Synthesemethoden zur Herstellung der Nanopartikel entwickelt werden. In einem zweiten Schritt sollten die Oberflächen der Nanopartikel so modifiziert werden, dass sie mukoadhäsive bzw. mukopermeable Eigenschaften aufweisen. Anschließend sollten die Eigenschaften der Nanopartikel charakterisiert werden.

Die Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung der „IBMT-Nanopartikel“ mit den Bezeichnungen CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA waren Teil der vorliegenden Arbeit. Weitere verwendete nanopartikuläre Systeme mit der Gruppen-Bezeichnung „Nanopartikel-WWU“ wurden am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster von Frau Dr. Juliane Anderski unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Langer entwickelt, hergestellt und physikochemisch charakterisiert. Die Entwicklung, Herstellung und physikochemische Charakterisierung der verwendeten liposomalen Partikel mit der Bezeichnung „Nanopartikel biolitec®“ wurde von der biolitec® research GmbH durchgeführt. Die physikochemischen Eigenschaften, der Durchmesser, PDI und das Zetapotential, dieser nanopartikulären Formulierungen wurden extern und intern charakterisiert, um diese zu bestätigen.

Nanopartikel WWU

Das erste Nanopartikelsystem basierte auf PLGA und wurde in zwei Größen, 100 und 200 nm, hergestellt. Die Herstellung der Nanopartikel mit einer Größe von 100 nm erfolgte nach der Lösungsmittel-Verdrängungsmethode (Tabelle 10). Daraus ergab sich für die Nanopartikel PLGA_100 eine Größe von $106,2 \pm 1,2$ nm, ein PDI von $0,10 \pm 0,02$ und ein Zetapotential von $-34,6 \pm 1,1$ mV. Die Nanopartikel mit einer angestrebten Größe von 200 nm wurden nach der Emulsions-Diffusions-Methode hergestellt. Die Größe dieser PLGA_200 Nanopartikel betrug $242,7 \pm 4,3$ nm, mit einem PDI von $0,046 \pm 0,01$ und einem Zetapotential von $-37,2 \pm 2,8$ mV. Die Nanopartikel wurden zusätzlich mit dem Photosensibilisator mTHPP beladen. Die physikochemische Charakterisierung der beladenen mTHPP-PLGA_100 ergaben eine Größe von $113,4 \pm 2,2$ nm, einen PDI von $0,108 \pm 0,03$ und ein Zetapotential von $-30,4 \pm 1,9$ mV. Die Ergebnisse der mTHPP-PLGA_200 zeigten eine Größe von $232,3 \pm 2,4$ nm, einen PDI von $0,046 \pm 0,01$ und ein Zetapotential von $-36,8 \pm 3,9$ mV. Insgesamt konnten durch die Verwendung der Lösungsmittel-Verdrängungsmethode und der Emulsions-Diffusions-Methode zwei nanopartikuläre Systeme mit einer Nanopartikelgröße von 100 und 200 nm hergestellt werden. Dies galt sowohl für das unbeladenen als auch für das mit dem Photosensibilisator mTHPP beladene nanopartikuläre Arzneistoffträgersystem.

Tabelle 10: Physikochemische Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel

Die physikochemische Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel mit einem Größenbereich von 100 nm und 200 nm wurde mittels ZetaSizer durchgeführt. Es wurden Leerpartikel (PLGA_100 und PLGA_200) und mit dem Photosensibilisator mTHPP beladenen Nanopartikel (mTHPP-PLGA_100 und mTHPP-PLGA_200) vermessen. Folgende Werte wurden bestimmt: Durchmesser ($\bar{\varnothing}$ in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential (ZP in mV). (Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s); n = 3, k = 9)

Nanopartikel	Parameter					
	$\bar{\varnothing}$ [nm]		PDI		ZP [mV]	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
PLGA_100	106,2	$\pm 1,2$	0,100	$\pm 0,02$	-34,6	$\pm 1,1$
mTHPP-PLGA_100	113,4	$\pm 2,2$	0,108	$\pm 0,03$	-30,4	$\pm 1,9$
PLGA_200	242,7	$\pm 4,3$	0,046	$\pm 0,01$	-37,2	$\pm 2,8$
mTHPP-PLGA_200	232,3	$\pm 2,4$	0,046	$\pm 0,01$	-36,8	$\pm 3,9$

Der PLGA-Nanopartikel wurde zudem mit Chitosan modifiziert, um dem Nanopartikel mukoadhäsive Eigenschaften zu geben. Es wurden erneut zwei Nanopartikelgrößen von 100 und 200 nm sowie unbeladene und mit dem Photosensibilisator mTHPP beladene Nanopartikel hergestellt (Tabelle 11). Die physikochemische Charakterisierung ergab für die Leerpartikel CS-PLGA_100 einen Durchmesser von $129,8 \pm 3,4$ nm, einen PDI von $0,156 \pm 0,03$ und ein Zetapotential von $21,8 \pm 1,5$ mV und für die Leerpartikel CS-PLGA_200 einen Durchmesser von $226,9 \pm 2,8$ nm, einen PDI von $0,156 \pm 0,03$ und ein Zetapotential von $21,8 \pm 1,5$ mV. Nach der Beladung des mit Chitosan modifizierten PLGA-Nanopartikels mit dem Photosensibilisator mTHPP ergaben sich für CS-mTHPP-PLGA_100 eine Größe von

119,0 ± 1,6 nm, ein PDI von 0,195 ± 0,03 und ein Zetapotential von - 8,5 ± 4,2 mV. Für die Nanopartikel mit der Bezeichnung CS-mTHPP-PLGA_200 konnte eine Größe von 241,2 ± 2,9 nm, ein PDI von 0,109 ± 0,02 und ein Zetapotential von 3,8 ± 1,8 mV ermittelt werden.

Insgesamt führte die Oberflächenmodifikation mit Chitosan zu einem positiven Zetapotential mit einem durchschnittlichen Wert von 9,5 mV. Im Vergleich dazu, wies der unmodifizierte Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Zetapotential von - 34,8 mV eine negative Oberflächenladung auf. Die Größe der unmodifizierten Nanopartikel PLGA_100 und mTHPP-PLGA_100 lag bei 106,2 ± 1,2 nm und 113,4 ± 2,2 nm (Tabelle 10) nach der Modifizierung mit Chitosan änderte sich die Nanopartikelgröße von CS-PLGA_100 auf 129,8 ± 3,4 nm und von CS-mTHPP-PLGA_100 119,0 ± 1,6 nm. Dies entsprach einer durchschnittlichen Vergrößerung der Nanopartikel um

Tabelle 11: Physikochemische Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel mit Chitosan-Oberflächenmodifizierung

Die physikochemische Charakterisierung der mit Chitosan modifizierten PLGA-Nanopartikel mit einem Größenbereich von 100 nm und 200 nm wurde mittels ZetaSizer durchgeführt. Es wurden Chitosan-Leerpartikel (CS-PLGA_100 und CS-PLGA_200) und mit dem Photosensibilisator mTHPP beladenen Nanopartikel (CS-mTHPP-PLGA_100 und CS-mTHPP-PLGA_200) vermessen. Folgende Werte wurden bestimmt: Durchmesser (Ø in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential (ZP in mV). (Mittelwert (\bar{x}) ± Standardabweichung (s); n = 3, k = 9)

Nanopartikel	Parameter					
	Ø [nm]		PDI		ZP [mV]	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
CS-PLGA_100	129,8	± 3,4	0,156	± 0,03	21,8	± 1,5
CS-mTHPP-PLGA_100	119,0	± 1,6	0,195	± 0,03	8,5	± 4,2
CS-PLGA_200	226,9	± 2,8	0,052	± 0,01	3,7	± 4,0
CS-mTHPP-PLGA_200	241,2	± 2,9	0,109	± 0,02	3,8	± 1,8

Eine zweite Oberflächenmodifizierung zur Mukopermeation des nanopartikulären Arzneistoffträgersystems PLGA wurde mit PEG durchgeführt. Es wurden ein weiteres Mal Nanopartikel mit einer Größe im Bereich von 100 und 200 nm und sowohl unbeladene als auch mit mTHPP beladene Nanopartikel synthetisiert (Tabelle 12). Die unbeladenen Nanopartikel PEG-PLGA_100 haben eine Größe von 90,8 ± 0,8 nm, einen PDI von 0,195 ± 0,03 und ein Zetapotential von - 8,5 ± 4,2 mV. Die unbeladenen Nanopartikel PEG-PLGA_200 haben eine Größe von 261,2 ± 3,4 nm, einen PDI von 0,138 ± 0,02 und ein Zetapotential von - 43,1 ± 2,1 mV. Für die mit mTHPP beladenen Nanopartikel ergab sich eine Größe von 98,1 ± 1,2 nm, ein PDI von 0,041 ± 0,01 und ein Zetapotential von - 32,8 ± 4,2 mV und für die Nanopartikel PEG-mTHPP-PLGA_200 eine Größe von 206,7 ± 2,4 nm, ein PDI von 0,022 ± 0,01 und ein Zetapotential von - 39,3 ± 3,6 mV. Insgesamt konnte ein Einfluss der Oberflächenmodifizierung auf die Nanopartikel im Größenbereich von 100 nm ermittelt

werden. Die durchschnittliche Größe der PLGA-Nanopartikel ohne Oberflächenmodifizierung betrug 109,8 nm. Im Vergleich dazu betrug die Größe der Nanopartikel mit einer PEGylierten Oberfläche 94,5 nm. Daraus ergab sich einer Verringerung der Nanopartikelgröße um durchschnittlich 13,9 %.

Tabelle 12: Physikochemische Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel mit PEG-Oberflächenmodifizierung

Die physikochemische Charakterisierung der PEG-modifizierten PLGA-Nanopartikel mit einem Größenbereich von 100 nm und 200 nm wurde mittels ZetaSizer durchgeführt. Es wurden PEG-Leerpartikel (PEG-PLGA_100 und PEG-PLGA_200) und mit dem Photosensibilisator mTHPP beladene Nanopartikel (PEG-mTHPP-PLGA_100 und PEG-mTHPP-PLGA_200) vermessen. Folgende Werte wurden bestimmt: Durchmesser (\bar{x} in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential (ZP in mV). (Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s); n = 3, k = 9)

Nanopartikel	Parameter					
	$\bar{\varnothing}$ [nm]		PDI		ZP [mV]	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
PEG-PLGA_100	90,8	$\pm 0,8$	0,067	$\pm 0,01$	-28,7	$\pm 4,3$
PEG-mTHPP-PLGA_100	98,1	$\pm 1,2$	0,041	$\pm 0,01$	-32,8	$\pm 3,9$
PEG-PLGA_200	261,2	$\pm 3,4$	0,138	$\pm 0,02$	-43,1	$\pm 2,1$
PEG-mTHPP-PLGA_200	206,7	$\pm 2,4$	0,022	$\pm 0,01$	-39,3	$\pm 3,6$

Zudem wurde ein zweites Nanopartikelsystem, basierend auf PLGA mit einem Polycarbonat-basierten lichtresponsiven Polymer (LrP) und einer PEG-Modifizierung, untersucht (Tabelle 13). Das lichtresponsive Polymer ermöglicht eine gezielte Freisetzung des Photosensibilisators aus der Nanopartikelmatrix aufgrund von lichtaktivierbarer Freisetzung. Die Modifizierung mit PEG verleiht dem nanopartikulären Arzneistoffträgersystem mukopermeierende Eigenschaften. Die physikochemische Charakterisierung der unbeladenen LrP-PEG-PLGA Nanopartikel ergab eine Größe von $84,9 \pm 3,9$ nm, einen PDI von $0,123 \pm 0,02$ und ein Zetapotential von $-12,3 \pm 3,6$ mV. Die Nanopartikel wurden zudem mit dem Photosensibilisator mTHPC beladen. Daraus ergab sich für die Nanopartikel LrP-PEG-mTHPC-PLGA eine Größe von $90,2 \pm 2,2$ nm, ein PDI von $0,095 \pm 0,01$ und ein Zetapotential von $-21,7 \pm 3,4$ mV.

Tabelle 13: Physikochemische Charakterisierung der LrP-PLGA-Nanopartikel mit PEG-Oberflächenmodifizierung

Die physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel mit lichtresponsivem Polymer und PEG-Modifizierung wurde mittels ZetaSizer durchgeführt. Es wurden LrP-PEG_PLGA Leerpartikel und mit dem Photosensibilisator mTHPC beladene Nanopartikel LrP-PEG-mTHPC-PLGA vermessen. Folgende Werte wurden bestimmt: Durchmesser (\bar{x} in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential (ZP in mV). (Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s); n = 3, k = 9)

Nanopartikel	Parameter					
	$\bar{\varnothing}$ [nm]		PDI		ZP [mV]	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
LrP-PEG-PLGA	84,9	$\pm 3,9$	0,123	$\pm 0,02$	-12,3	$\pm 3,6$
LrP-PEG-mTHPC-PLGA	90,2	$\pm 2,2$	0,095	$\pm 0,01$	-21,7	$\pm 3,4$

Nanopartikel biolitec®

Die nanopartikelulären Arzneistoffträgersysteme Nanopartikel biolitec® basieren auf liposomalen Formulierungen, die aus DPPC und DPPG hergestellt wurden. Die physikochemische Charakterisierung der Leerpartikel LP-Leer ergab eine Größe von $152,6 \pm 1,8$ nm, einen PDI von $0,180 \pm 0,01$ und ein Zetapotential von $-62,4 \pm 3,2$ mV (Tabelle 14). Die liposomalen Formulierungen wurden mit den Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 beladen. Für die Nanopartikel LP-BLC 2175 konnte eine Größe von $151,6 \pm 2,3$ nm, ein PDI von $0,189 \pm 0,03$ und ein Zetapotential von $-57,2 \pm 4,6$ mV und für die Nanopartikel LP-BLC 5152 konnte eine Größe von $144,3 \pm 1,9$ nm, ein PDI von $0,175 \pm 0,02$ und ein Zetapotential von $-59,2 \pm 1,8$ mV gemessen werden. Insgesamt haben die liposomalen Formulierungen eine durchschnittliche Größe von $149,5$ nm und ein Zetapotential von rund $-59,6$ mV.

Tabelle 14: Physikochemische Charakterisierung der liposomalen Nanopartikel

Die Charakterisierung der liposomalen Nanopartikel LP-Leer, LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 wurden mittels ZetaSizer durchgeführt. Es wurde der Durchmesser ($\bar{\varnothing}$ in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential (ZP in mV) gemessen. (Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s); n = 4, k = 12)

Nanopartikel	Parameter					
	$\bar{\varnothing}$ [nm]		PDI		ZP [mV]	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
LP-Leer	152,6	$\pm 1,8$	0,180	$\pm 0,01$	-62,4	$\pm 3,2$
LP-BLC 2175	151,6	$\pm 2,3$	0,189	$\pm 0,03$	-57,2	$\pm 4,6$
LP-BLC 5152	144,3	$\pm 1,9$	0,175	$\pm 0,02$	-59,2	$\pm 1,8$

4.2.1 Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel

Die Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung der auf PLGA-basierenden Nanopartikel mit den Oberflächenmodifizierungen Carbopol® (CP) und Pluronic® F127 (F127) waren Teil dieser Arbeit. Carbopol® wurde eingesetzt, um mukoadhäsive Eigenschaften zu erreichen und Pluronic® F127, um mukopermeable Eigenschaften zu erreichen. Für die Herstellung der Nanopartikel wurden zwei Syntheseverfahren etabliert. Diese wurden bezeichnet als Nanopräzipitation und Doppelemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungs-Verfahren. Bevor die nanopartikulären Systeme einer In-vitro-Testung unterzogen wurden, wurde zunächst eine physikochemische Charakterisierung mittels ZetaSizer durchgeführt. Hierbei wurde der Durchmesser, der Polydispersitätsindex und das Zetapotential vermessen. Ergänzend wurde die inkorporierte Substanzmenge analytisch ermittelt.

Die physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel, die mittels Nanopräzipitation hergestellt wurden, ergaben für die Leerpartikel einen Durchmesser von $124,5 \pm 3,1$ nm, einen PDI von $0,06 \pm 0,01$ und ein Zetapotential von $-40,4 \pm 2,3$. Nach der Inkorporation des Photosensibilisators mTHPC ergab sich eine durchschnittliche Größe von $124,1 \pm 2,8$ nm, ein PDI von $0,03 \pm 0,01$ und ein Zetapotential von $-52,8 \pm 1,5$ mV (Tabelle 15).

Tabelle 15: Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel, die mittels Nanopräzipitation hergestellt wurden

Zur Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel mit einer Carbopol® (CP) Oberflächenmodifizierung, die mittels Nanopräzipitation hergestellt wurden, wurde mittels ZetaSizer der Durchmesser (\varnothing in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential (ZP in mV) gemessen. (Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s); n = 4, k = 12)

Nanopartikel	Parameter					
	\varnothing [nm]		PDI		ZP [mV]	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
CP-PLGA	124,5	$\pm 3,1$	0,060	$\pm 0,01$	-50,4	$\pm 2,3$
CP-mTHPC-PLGA	124,1	$\pm 2,8$	0,031	$\pm 0,01$	-52,8	$\pm 1,5$

Die Messungen der physikochemischen Eigenschaften der nach dem Doppelemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungs-Verfahren hergestellten Nanopartikel ergaben für die Leerpartikel einen Durchmesser von $114,7 \pm 2,1$ nm, einen PDI von $0,05 \pm 0,01$ und ein Zetapotential von $-36,8 \pm 2,0$. Nach der Inkorporation des Photosensibilisators mTHPC ergab sich eine durchschnittliche Größe von $115,4 \pm 0,8$ nm, ein PDI von $0,09 \pm 0,01$ und einem Zetapotential von $-46,5 \pm 4,5$ mV (Tabelle 16).

Tabelle 16: Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel, die nach dem Doppelemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungsverfahren hergestellt wurden

Die PLGA-Nanopartikel mit einer Pluronic® F127-Modifizierung (F127) wurden nach dem Doppelemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungsverfahren hergestellt und mittels ZetaSizer wurde ihr Durchmesser ($\bar{\varnothing}$ in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential (ZP in mV) gemessen. (Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s); n = 4, k = 12)

Nanopartikel	Parameter					
	$\bar{\varnothing}$ [nm]		PDI		ZP [mV]	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
F127-PLGA	114,7	$\pm 2,1$	0,052	$\pm 0,01$	-36,8	$\pm 2,0$
F127-mTHPC-PLGA	115,4	$\pm 0,8$	0,093	$\pm 0,01$	-46,5	$\pm 4,5$

4.2.2 Untersuchung der Verkapselungseffizienz und Ladungskapazität

Bei der Synthese von wirkstoffbeladenen Nanopartikeln wurde der Photosensibilisator mTHPC inkorporiert. Entscheidend für die Beurteilung der beladenen nanopartikulären Trägersystems war die Menge des inkorporierten Wirkstoffes. Hierzu wurden die Verkapselungseffizienz und Ladungskapazität ermittelt (Tabelle 17). Die mittels Nanopräzipitation hergestellten Nanopartikel, wiesen eine Verkapselungseffizienz von $13,80 \pm 1,82$ % und eine Ladungskapazität von $1,45 \pm 0,16$ auf. Für die nach dem Doppelemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungsverfahren hergestellten Nanopartikel lag die Verkapselungseffizienz bei $31,23 \pm 3,52$ % und die Ladungskapazität bei $1,86 \pm 0,21$. Daraus ergab sich eine um 17,43 % verringerte Verkapselungseffizienz und eine um 0,41 % verringerte Ladungskapazität der mittels Nanopräzipitation hergestellten Nanopartikel CP-mTHPC-PLGA, im Vergleich zu den Nanopartikeln F127-mTHPC-PLGA hergestellt nach Doppelemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungsverfahren.

Tabelle 17: Verkapselungseffizienz und Ladungskapazität

Die Ergebnisse der ermittelten Verkapselungseffizienz und Ladungskapazität der Nanopartikel sind in Prozent (%) angegeben. (Mittelwert \pm Standardabweichung (s); n = 4, k = 12)

Nanopartikel	Parameter			
	Verkapselungseffizienz		Ladungskapazität	
	%	s	%	s
CP-mTHPC-PLGA	13,80	$\pm 1,73$	1,450	$\pm 0,16$
F127-mTHPC-PLGA	31,23	$\pm 3,52$	1,86	$\pm 0,21$

4.3 Untersuchung der biologischen Wirksamkeit

In einem ersten Schritt wurden die freien Photosensibilisatoren und die nanopartikulären Formulierungen auf ihren anti-tumoralen Effekt und unerwünschte toxische Effekte untersucht, um vielversprechende Photosensibilisatoren und nanopartikuläre Formulierungen zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen zu identifizieren. Hierfür wurde ein Screening zur Untersuchung der biologischen Effektivität von freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren durchgeführt. Als Screening-Modelle wurden 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide aus den Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 verwendet. Die Beurteilung der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren erfolgte nach Durchführung des Zellviabilitäts-Tests und einer auf den Messdaten basierenden statistischen Analyse, bei der ein Vergleich zwischen den jeweiligen Messwerten der einzelnen Konzentrationen aus der Dunkelkontrolle und den bestrahlten Zellen durchgeführt wurde. Ein **dunkeltoxischer Effekt** lag vor, wenn nach der Inkubation mit den freien oder nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren eine Verringerung der Zellviabilität ohne Bestrahlung um $\geq 25\%$ gemessen wurde. Als Grenzwert für einen nachweisbaren **phototoxischen Effekt** wurde eine Verringerung der Zellviabilität auf $\leq 70\%$ bzw. ab einer Verringerung um -30% nach den Angaben der DIN EN ISO 10993-5 eingesetzt. Untersucht wurden die freien Photosensibilisatoren mTHPC, mTHPP, BLC 1157, BLC 2175, BLC 5152, BLC 6151, BLC 6166 und BLC 6167. Des Weiteren wurden Nanopartikel der Gruppierung „Nanopartikel WWU“ untersucht. Zu diesen zählen die Leerpartikel PLGA_100 und PLGA_200; CS-PLGA_100 und CS-PLGA_200; PEG-PLGA_100 und PEG-PLGA_200; und der Leerpartikel LrP-PEG-PLGA sowie die Nanopartikel mit inkorporiertem mTHPP mTHPP-PLGA_100 und mTHPP-PLGA_200; CS-mTHPP-PLGA_100 und CS-mTHPP-PLGA_200; PEG-mTHPP-PLGA_100 und PEG-mTHPP-PLGA_200 und mit inkorporiertem mTHPC PEG-mTHPC-PLGA und LrP-PEG-mTHPC-PLGA. Ebenfalls untersucht wurden die Nanopartikel der Gruppierung „Nanopartikel biolitec®“ mit dem Leerpartikel LP-Leer und den mit BLC 2175 und BLC 5152 beladenen liposomalen Partikel LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152. Des Weiteren wurden die nanopartikulären Formulierungen der Gruppe „Nanopartikel IBMT“ mit den Leerpartikeln CP-PLGA und F127-PLGA sowie die mit mTHPC beladenen Nanopartikel CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA untersucht (Tabelle 18).

Tabelle 18: Übersicht der untersuchten, freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Photosensibilisatoren (freie PS) und die nanopartikel-inkorporierten Formulierungen (Leerpartikel und mit inkorporiertem PS), die in einem ersten Schritt hinsichtlich ihrer Dunkeltoxizität und induzierten Phototoxizität untersucht wurden. Die Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden als 2D-Monolayer und 3D-Tumorsphäroide für das Screening verwendet.

Gruppierung	HuTu-80 HT29 HT29-MTX-E12	Bezeichnung	Modifizierung	Substanz bzw. Formulierung
Photosensibilisator (PS)		mTHPC	keine	freier PS
Neu synthetisierte PS		mTHPP BLC 1157 BLC 2175 BLC 5152 BLC 6151 BLC 6166 BLC 6167	keine	freier PS
Nanopartikel WWU		PLGA_100 PLGA_200	keine	Leerpartikel
		CS-PLGA_100 CS-PLGA_200	Chitosan (CS)	
		PEG-PLGA_100 PEG-PLGA_200	Polyethylenglycol (PEG)	
		LrP-PEG_PVA-PLGA	PEG + LrP	
		mTHPP-PLGA_100 mTHPP-PLGA_200	keine	mTHPP inkorporiert in NP
		CS-mTHPP-PLGA_100 CS-mTHPP-PLGA_200	Chitosan (CS)	
		PEG-mTHPP-PLGA_100 PEG-mTHPP-PLGA_200	Polyethylenglycol (PEG)	
		PEG-mTHPC-PLGA	PEG	mTHPC inkorporiert in NP
		LrP-PEG-mTHPC-PLGA	PEG + LrP	
	Liposomen biolitec®		LP-Leer	keine
		LP-BLC 2175	keine	BLC 2175 und BLC 5152 inkorporiert in NP
		LP-BLC 5152		
Nanopartikel IBMT		CP-PLGA	Carbopol (CP)	Leerpartikel
		F127-PLGA	Pluronic F127 (F127)	
		CP-mTHPC-PLGA	Carbopol (CP)	mTHPC inkorporiert in NP
		F127-mTHPC-PLGA	Pluronic F127 (F127)	

4.3.1 Untersuchung des Photosensibilisators mTHPC

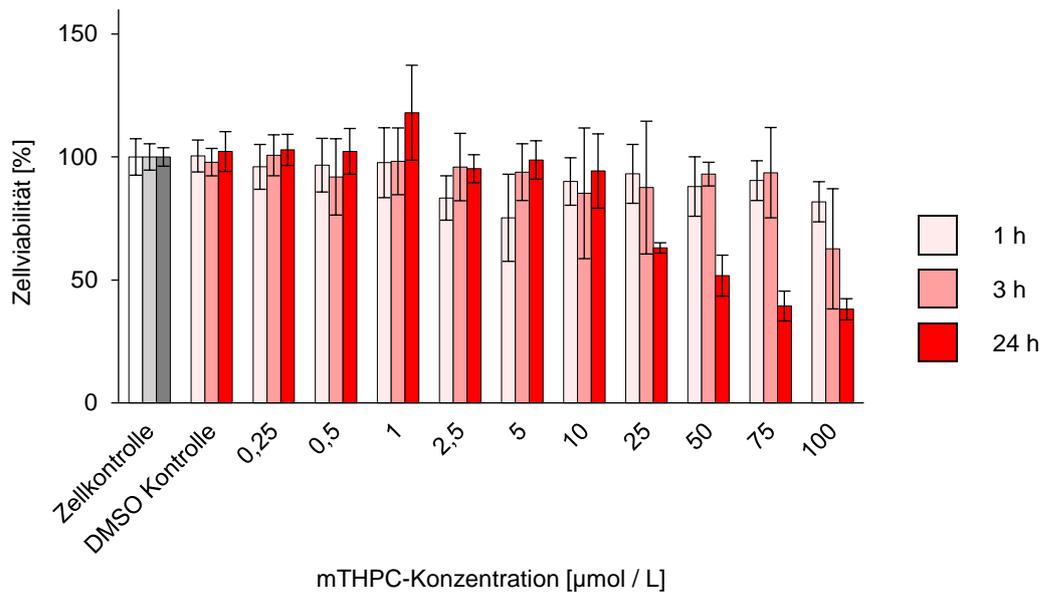
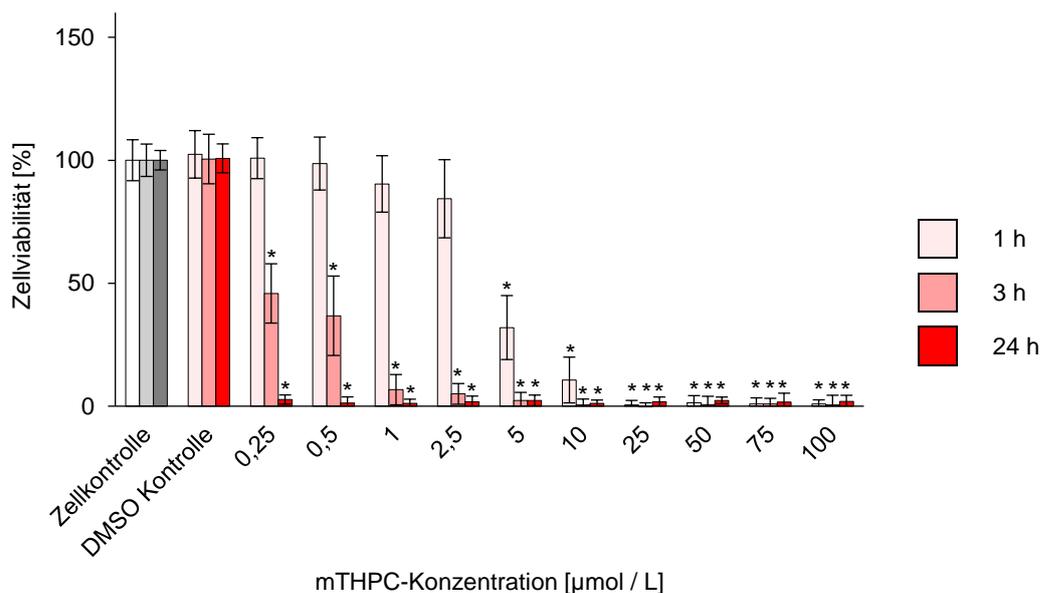
Der Wirkstoff mTHPC gilt als hoch effizienter Photosensibilisator der zweiten Generation [2,3]. Um dessen Wirksamkeit auf die verwendeten 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 Screening-Modelle zu untersuchen, wurde zu Beginn eine aufsteigende Konzentrationsreihe (0,25 – 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$) des Photosensibilisator mTHPC verwendet. Als Inkubationszeiten wurden 1 h, 3 h und 24 h gewählt, anschließend wurde ein Teil der Zellen bestrahlt (652 nm, 5 J / cm^2) und ein anderer Teil ohne Bestrahlung für die Untersuchung des dunkeltoxischen Effekts verwendet.

Die Ergebnisse der HuTu-80 2D-Monolayer-Zellkulturen zeigten keinen **dunkeltoxischen Effekt** nach einer Inkubationszeit von 1 h, unabhängig von der eingesetzten Wirkstoffkonzentration (Abbildung 33, A). Ein dunkeltoxischer Effekt konnte ab einer mTHPC-Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ nach 3 h Inkubation gemessen werden. Dieser lag bei einer Verringerung der Zellviabilität um 37 %. Bei einer Inkubationszeit von 24 h war eine Verringerung der Zellviabilität ab 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ um 48 % detektierbar. Die Messwerte der Dunkeltoxizitäts-Untersuchung der HT29 2D-Monolayer-Zellkulturen zeigten keinen toxischen Effekt nach 1 und 3 h Inkubation mit der mTHPC-Konzentrationsreihe (Abbildung 34, A). Nach einer 24 h-Inkubation war ein dunkeltoxischer Effekt ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol} / \text{L}$ mit einer Verringerung der Zellviabilität um 47 % messbar. Die HT29-MTX-E12 2D-Monolayer-Zellkulturen zeigten eine Verringerung der Zellviabilität um 47 % und somit einen dunkeltoxischen Effekt nach einer 24 h-Inkubation ab einer mTHPC-Konzentration von 75 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (Abbildung 35, A). Die Ergebnisse der Messungen des dunkeltoxischen Effekts auf 2D-Monolayer-Zellkulturen zeigten insgesamt keinen toxischen Effekt nach 1 h-Inkubationszeit unabhängig von der verwendeten Zelllinie. Insgesamt konnte jedoch ein dunkeltoxischer Effekt in Zusammenhang mit einer steigenden mTHPC-Konzentration und der Inkubationszeit gemessen werden. Im Gegensatz zur unerwünschten Dunkeltoxizität steht der induzierte phototoxische Effekt. Dieser ist ausschlaggebend für die Wirksamkeit des Photosensibilisators.

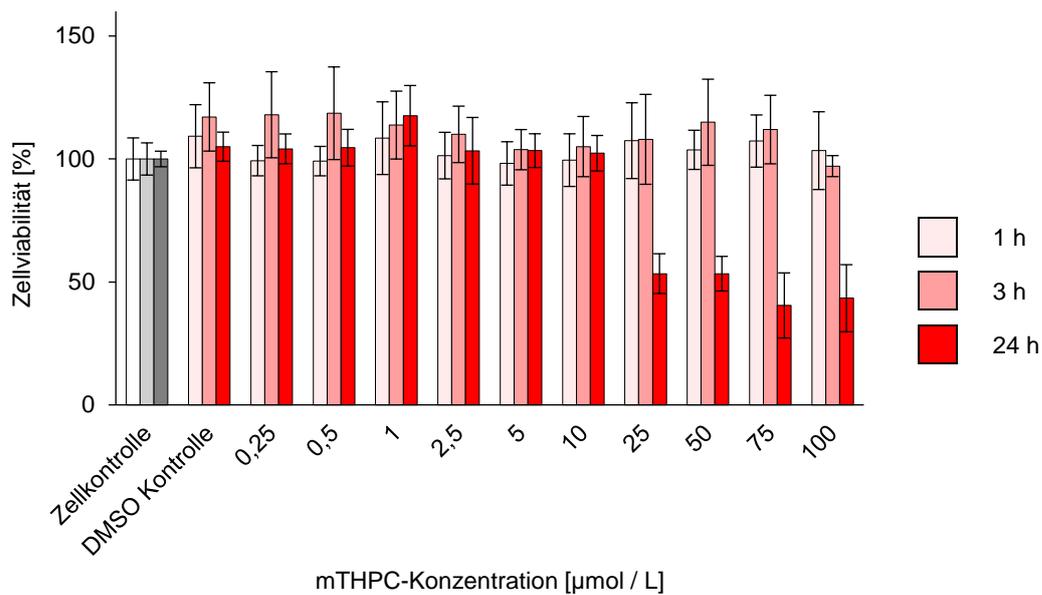
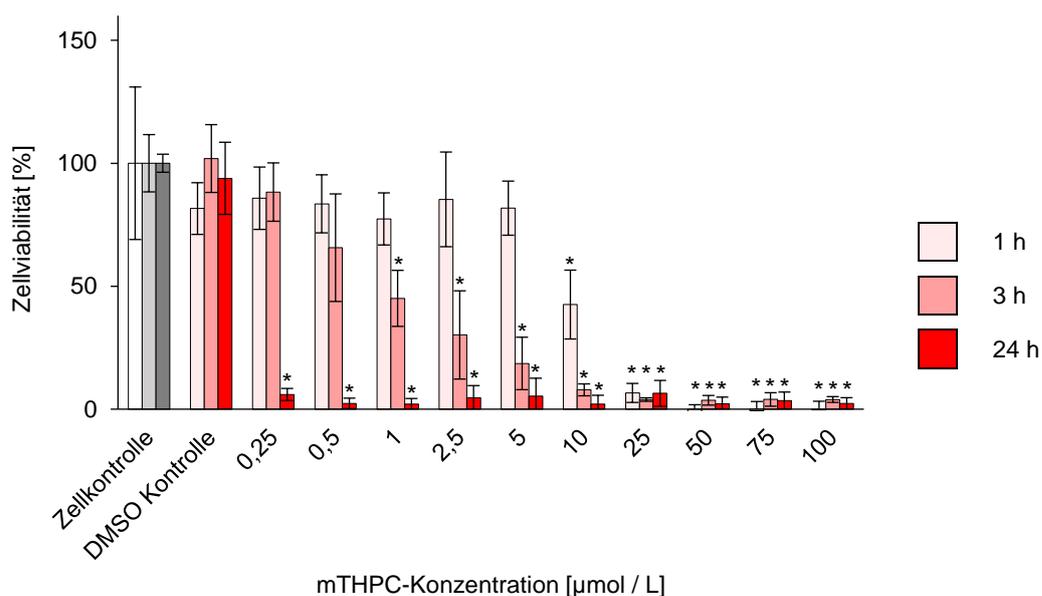
Ein **phototoxischer Effekt** konnte bei den HuTu-80 2D-Monolayer-Zellkulturen bei einer Inkubationszeit von 1 h, ab einer mTHPC-Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ mit einer Zellviabilität 32 ± 13 % detektiert werden (Abbildung 33, B). Bei einer Inkubationszeit von 3 h und 24 h war ein induzierter phototoxischer Effekt bereits ab einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{mol} / \text{L}$ messbar. Diese lag bei einer Zellviabilität von 46 ± 12 % nach 3 h und von 3 ± 2 % nach 24 h. Die Ergebnisse der induzierten Phototoxizität zeigten, dass eine Wirksamkeit des Photosensibilisators mTHPC in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der gemessenen Dunkeltoxizität, bei der Zelllinie HuTu-80 ab einer mTHPC Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ nach 3 h und von 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ nach 24 h, bei der Zelllinie HT29 ab einer mTHPC Konzentration von 25 $\mu\text{mol} / \text{L}$ nach 24 h sowie

bei der Zelllinie HT29-MTX-E12 ab einer mTHPC Konzentration von 75 $\mu\text{mol} / \text{L}$ nach 24 h, war der phototoxische Effekt in diesen Fällen auf die Dunkeltoxizität zurückzuführen. Insgesamt zeigte die Zelllinie HuTu-80 eine höhere Sensitivität im Vergleich zu den Zelllinien HT29 und HT29-MTX-E12 (Abbildung 34, B und Abbildung 35, B). Zum Vergleich der Ergebnisse der Dunkeltoxizität und induzierten Phototoxizität wurde ein Welch-Test durchgeführt. Dieser gab Aufschluss darüber, ob eine signifikante Abweichung zwischen den Mittelwerten der voneinander unabhängigen Messwertreihen vorlag. Die Ergebnisse zeigten, dass alle gemessenen und als phototoxisch deklarierten Effekte sich signifikant von den Werten der Dunkeltoxizität unterschieden.

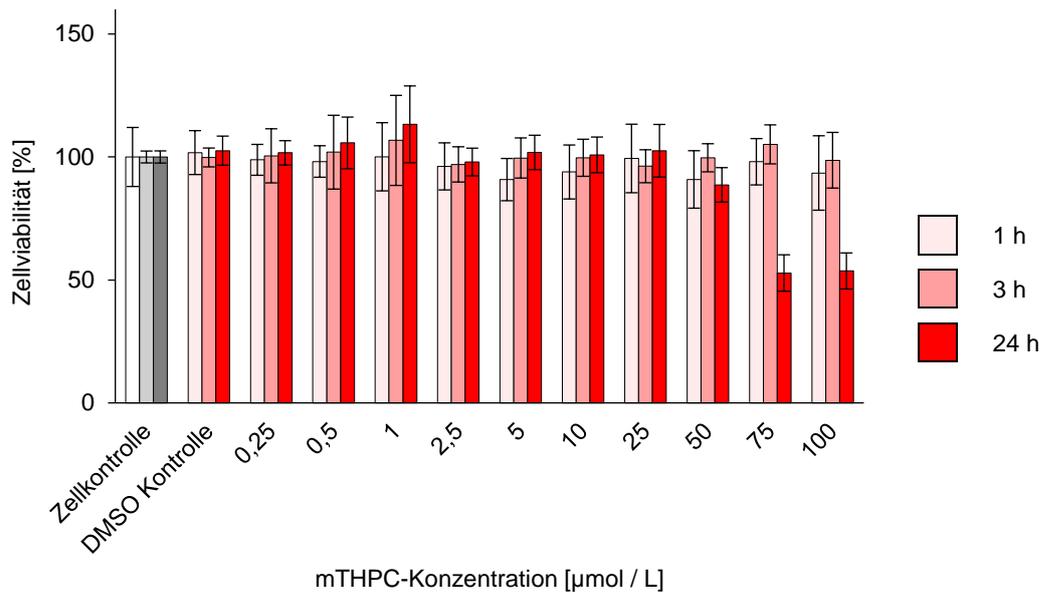
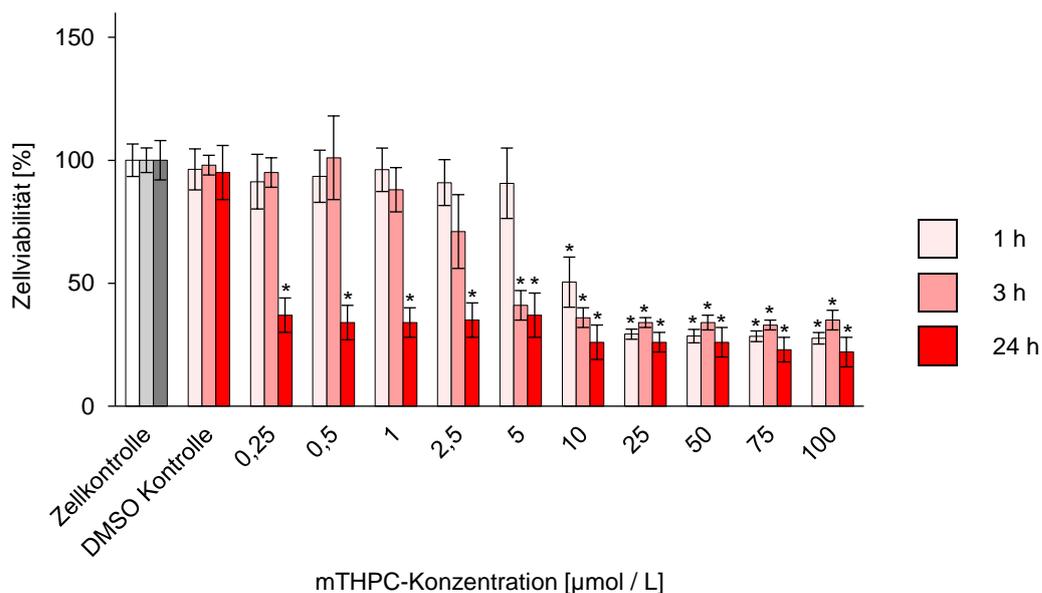
Analog zu den Untersuchungen der 2D-Monolayer-Zellkulturen wurden 3D-Tumorsphäroide mit der mTHPC-Konzentrationsreihe inkubiert und die Zellviabilität gemessen. Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 wiesen bei einer mTHPC-Konzentration ab 75 $\mu\text{mol} / \text{L}$ einen **dunkeltoxischen Effekt** bei den Inkubationszeiten 3 und 24 h auf (Abbildung 36, A). Die gemessene Zellviabilität lag hierbei bei $73 \pm 4 \%$ und $73 \pm 17 \%$. Bei einer Inkubationszeit von 1 h konnte keine Dunkeltoxizität detektiert werden. Die Ergebnisse der dunkeltoxischen Untersuchung der 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29 und HT29-MTX-E12 zeigten keine dunkeltoxischen Effekte unabhängig von der mTHPC-Konzentration und der Inkubationszeit (Abbildung 37, A und Abbildung 38, A). Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 zeigten nach der Bestrahlung einen **phototoxischen Effekt** nach 1 h Inkubationszeit mit 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ mit einer verringerten Zellviabilität von $56 \pm 5 \%$ (Abbildung 36, B). Bei einer Inkubationszeit von 3 h konnte ab einer mTHPC-Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ eine Verringerung der Zellviabilität auf $70 \pm 4 \%$ und somit ein phototoxischer Effekt gemessen werden. Die 24 h-Inkubation des Photosensibilisators und anschließender Bestrahlung ergab einen phototoxischen Effekt ab 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ mit einer Zellviabilität von $40 \pm 2 \%$. Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinien HT29 und HT29-MTX-E12 zeigten nach einer Inkubationszeit von 1 h und einer anschließenden Bestrahlung keinen phototoxischen Effekt (Abbildung 37, B und Abbildung 38, B). Ab einer mTHPC-Konzentration von 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ und einer Inkubation von 3 h konnte ein induzierter phototoxischer Effekt für die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinien HT29, durch eine Verringerung der Zellviabilität auf $69 \pm 7 \%$ gemessen werden. Die 24 h-Inkubation der mTHPC-Konzentrationsreihe ergab einen induzierten phototoxischen Effekt ab 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ mTHPC mit einer gemessenen Zellviabilität von $69 \pm 16 \%$. 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12 hatten nach der Behandlung mit 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ für 3 h und mit 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ für 24 h einen induzierten phototoxischen Effekt, der zu einer Verringerung der Zellviabilität auf $67 \pm 5 \%$ und $68 \pm 5 \%$ führte. Die Auswertung der 3D-Tumorsphäroide ergab beim Vergleich der Dunkelkontrolle mit den bestrahlten Untersuchungen, dass es sich im Falle eines deklarierten induzierten phototoxischen Effekts, um einen signifikanten Effekt handelte.

(A) 2D-Monolayer Zelllinie HuTu-80: Dunkelkontrolle**(B) 2D-Monolayer Zelllinie HuTu-80: Bestrahlung****Abbildung 33: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 2D-Monolayer der Zelllinie HuTu-80**

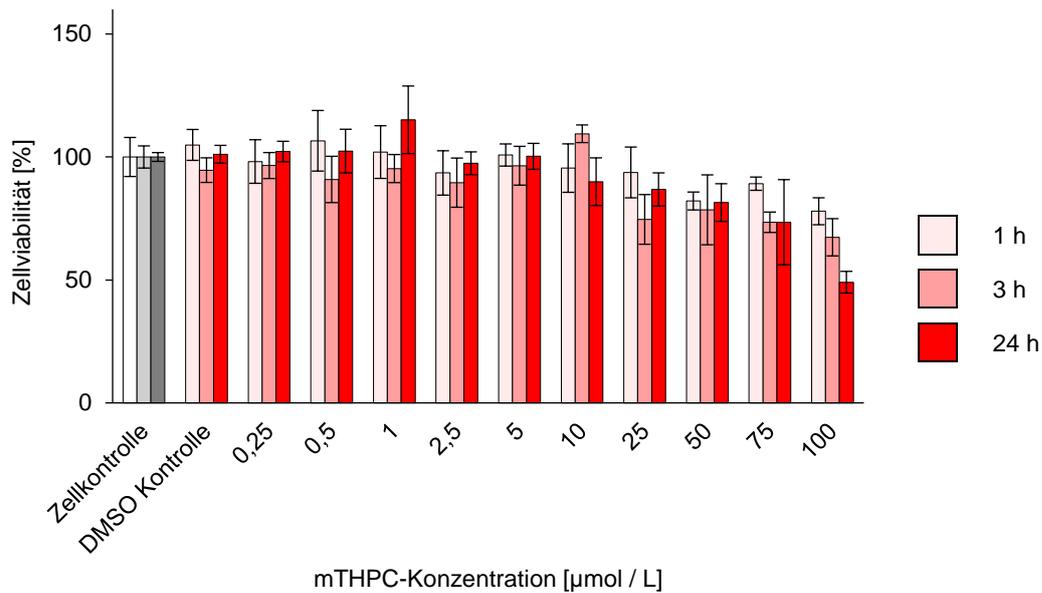
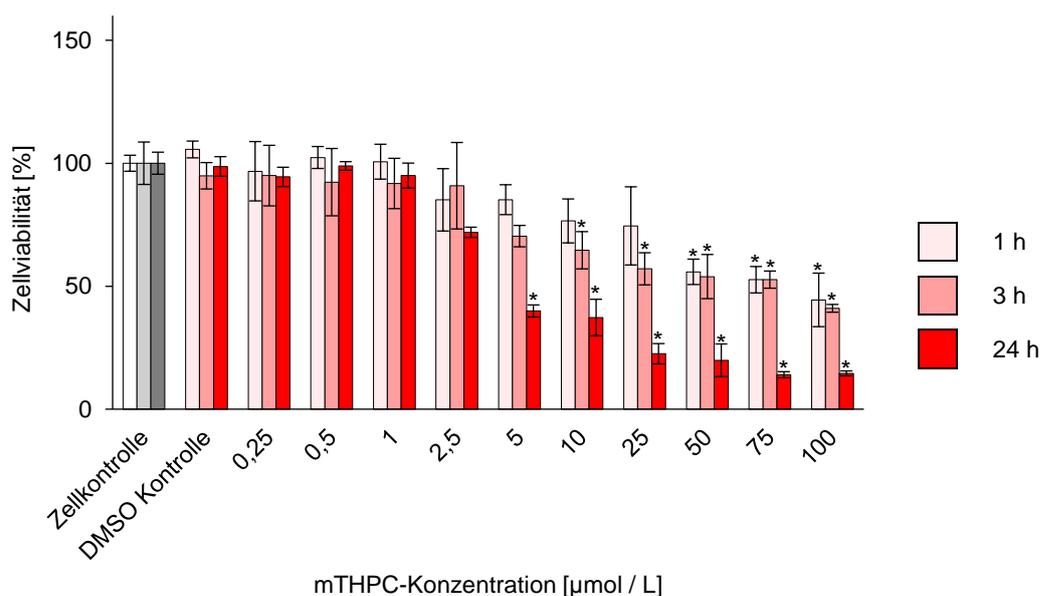
Die Zelllinie HuTu-80 wurde mit einer ansteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe (0-100 µmol / L) für 1 h, 3 h und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO Kontrolle) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm²) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt. Zur Ermittlung der Dunkeltoxizität (A) und Phototoxizität (B) wurde die Zellviabilität ermittelt. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung (s) dar. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 3, k = 9)

(A) 2D-Monolayer Zelllinie HT29: Dunkelkontrolle**(B) 2D-Monolayer Zelllinie HT29: Bestrahlung****Abbildung 34: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 2D-Monolayer der Zelllinie HT29**

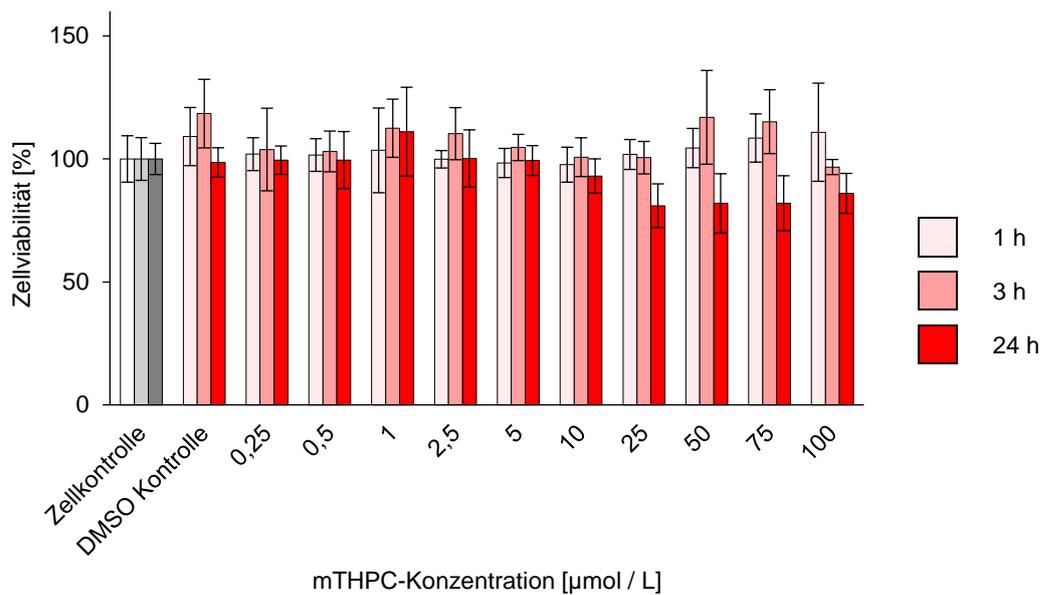
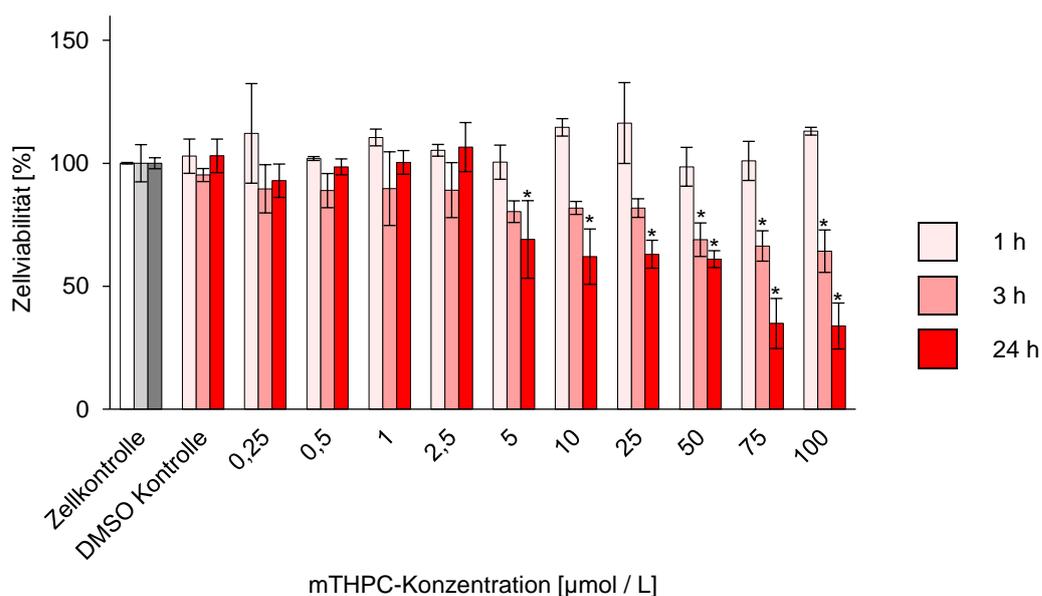
Die Zelllinie HT29 wurde mit einer ansteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe (0-100 µmol / L) für 1 h, 3 h und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO Kontrolle) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm²) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt. Zur Ermittlung der Dunkeltoxizität (A) und Phototoxizität (B) wurde die Zellviabilität ermittelt. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung (s) dar. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 3, k = 9)

(A) 2D-Monolayer Zelllinie HT29-MTX-E12: Dunkelkontrolle**(B) 2D-Monolayer Zelllinie HT29-MTX-E12: Bestrahlung****Abbildung 35: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 2D-Monolayer der Zelllinie HT29-MTX-E12**

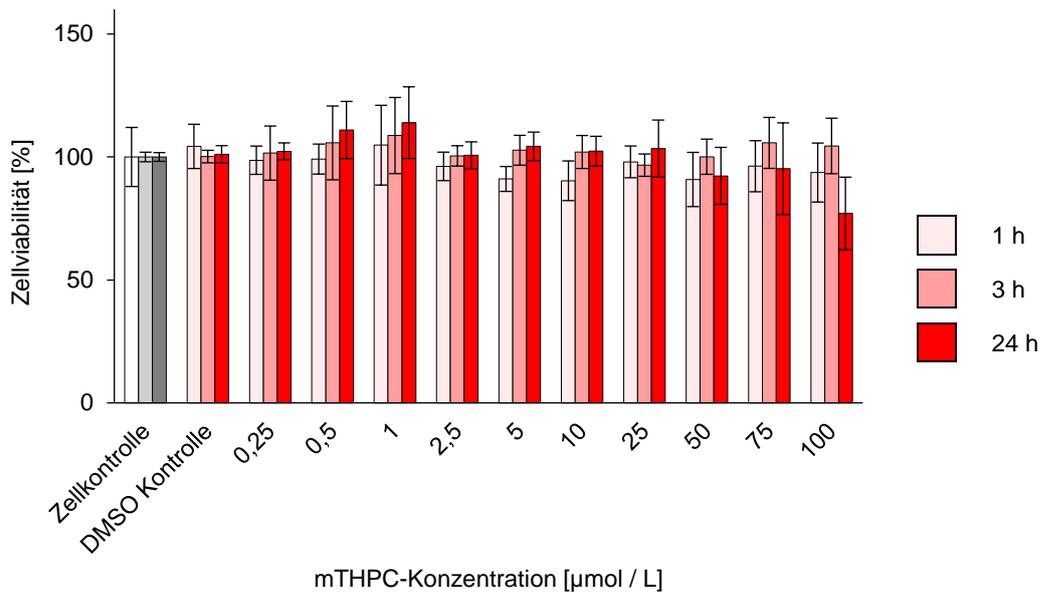
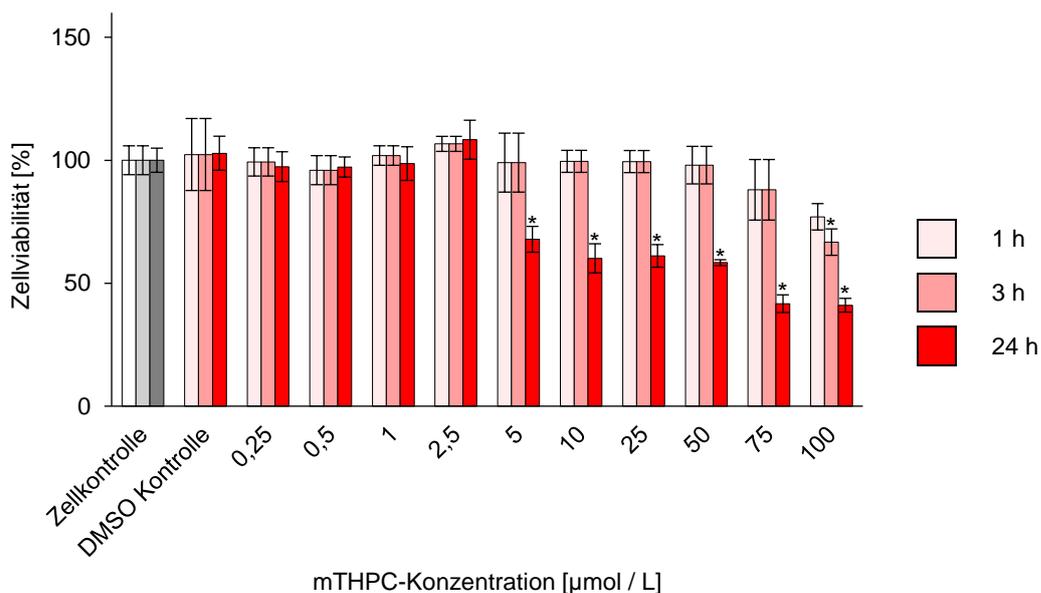
Die Zelllinie HT29-MTX-E12 wurde mit einer ansteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe (0-100 $\mu\text{mol} / \text{L}$) für 1 h, 3 h und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO Kontrolle) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm^2) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt. Zur Ermittlung der Dunkeltoxizität (A) und Phototoxizität (B) wurde die Zellviabilität ermittelt. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung (s) dar. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 3, k = 9)

(A) 3D-Tumorsphäroide Zelllinie HuTu-80: Dunkelkontrolle**(B) 3D-Tumorsphäroide Zelllinie HuTu-80: Bestrahlung****Abbildung 36: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80**

Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 wurden mit einer ansteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe (0-100 $\mu\text{mol} / \text{L}$) für 1 h, 3 h und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte 3D-Tumorsphäroide und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO Kontrolle) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm^2) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt. Zur Ermittlung der Dunkeltoxizität (A) und Phototoxizität (B) wurde die Zellviabilität ermittelt. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung (s) dar. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 3, k = 9)

(A) 3D-Tumorsphäroide Zelllinie HT29: Dunkelkontrolle**(B) 3D-Tumorsphäroide Zelllinie HT29: Bestrahlung****Abbildung 37: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29**

Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29 wurden mit einer ansteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe (0-100 µmol / L) für 1 h, 3 h und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte 3D-Tumorsphäroide und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO Kontrolle) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm²) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt. Zur Ermittlung der Dunkeltoxizität (A) und Phototoxizität (B) wurde die Zellviabilität ermittelt. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung (s) dar. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 3, k = 9)

(A) 3D-Tumorsphäroide Zelllinie HT29-MTX-E12: Dunkelkontrolle**(B) 3D-Tumorsphäroide Zelllinie HT29-MTX-E12: Bestrahlung****Abbildung 38: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12**

Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12 wurden mit einer ansteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe (0-100 $\mu\text{mol / L}$) für 1 h, 3 h und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte 3D-Tumorsphäroide und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO Kontrolle) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm^2) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt. Zur Ermittlung der Dunkeltoxizität (A) und Phototoxizität (B) wurde die Zellviabilität ermittelt. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung (s) dar. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 3, k = 9)

Zusammenfassend konnte die zum Auslösen eines phototoxischen Effektes benötigte mTHPC-Konzentration und Inkubationszeit unter Ausschluss eines dunkeltoxischen Effektes aus den Messergebnissen abgeleitet werden. Wie aus der Zusammenstellung (Tabelle 19) entnommen werden kann, ergab sich für die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinie HuTu-80 ein phototoxischer Effekt ab 5 µmol / L bei 1 h, ab 0,25 µmol / L bei 3 h und 24 h Inkubationszeit. Für die Zelllinie HT29 ab 10 µmol / L bei 1 h, ab 0,5 µmol / L bei 3 h und ab 0,25 µmol / L bei 24 h Inkubation. Die Zelllinie HT29-MTX-E12 wies einen phototoxischen Effekt ab 50 µmol / L bei 1 h, ab 5 µmol / L bei 3 h und ab 0,25 µmol / L bei 24 h auf. Für die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80, lag ein phototoxischer Effekt ab 50 µmol / L bei 1 h, ab 10 µmol / L bei 3 h und ab 5 µmol / L bei 24 h vor. Bei den 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29 lag der phototoxische Effekt ab 50 µmol / L bei 3 h und ab 5 µmol / L bei 24 h vor. Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12 wiesen einen phototoxischen Effekt ab 100 µmol / L nach 3 h und ab 5 µmol / L bei 24 h-Inkubation auf. Sowohl bei den 2D-Monolayer-Zellkulturen als auch bei den 3D-Tumorsphäroiden lag eine höhere Sensitivität bei der Zelllinie HuTu-80 im Vergleich zu den anderen Zelllinien vor. Aus den Messergebnissen der Untersuchung der aufsteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe wurde für die folgenden Screening-Versuche der neu synthetisierten und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren eine Behandlungskonzentration von 5 µmol / L und die Inkubationszeiten 3 h und 24 h gewählt.

Tabelle 19: Zusammenstellung der zum phototoxischen Effekt benötigten mTHPC-Konzentration und Inkubationszeit aus den Messergebnissen der Untersuchung des Photosensibilisators mTHPC

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden mit einer ansteigenden mTHPC-Konzentrationsreihe (0-100 µmol / L) für 1 h, 3 h und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Phototoxizität wurden die Zellen nach der Inkubationszeit bestrahlt (652 nm, 50 J / cm²) und die Zellviabilität ermittelt. Die Werte in der Tabelle zeigen ab welcher mTHPC-Konzentration in µmol / L und Inkubationszeit in h ein phototoxischer Effekt gemessen wurde. Die Werte leiten sich als Zusammenfassung aus den Untersuchungen des Photosensibilisators mTHPC ab.

Zelllinie	phototoxischer Effekt			
	2D-Monolayer-Zellkulturen		3D-Tumorsphäroide	
	mTHPC Konzentration [µmol / L]	Inkubationszeit [h]	mTHPC Konzentration [µmol / L]	Inkubationszeit [h]
HuTu-80	5	1	50	1
	0,25	3	10	3
	0,25	24	5	24
HT29	10	1	kein Effekt	1
	0,5	3	50	3
	0,25	24	5	24
HT29-MTX-E12	50	1	kein Effekt	1
	5	3	100	3
	0,25	24	5	24

4.3.2 Untersuchung neu synthetisierter Photosensibilisatoren

Die Photosensibilisatoren mit den Bezeichnungen BLC 1157, BLC 2175, BLC 5152, BLC 6151, BLC 6166 und BLC 6167 wurden durch die biolitec® research GmbH neu synthetisiert. Zur Überprüfung der Dunkeltoxizität und des induzierten phototoxischen Effekts wurden diese für 3 h und 24 h mit einer Konzentration von 5 µmol / L inkubiert. Danach erfolgte die Bestrahlung mit 50 J / cm² bzw. keine Bestrahlung bei der Dunkelkontrolle und die Durchführung eines Zellviabilitäts-Tests (Abbildung 39). Es wurde eine unbehandelte Zellkontrolle und der Photosensibilisator mTHPC als Vergleichssubstanz mitgeführt, da der Photosensibilisator mTHPC sich bereits in der photodynamischen Therapie etabliert hat. Bei den verwendeten Screening-Modellen konnte bei allen drei Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 ein induzierter phototoxischer Effekt nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass die neu synthetisierten Photosensibilisatoren bei einer Inkubationszeit von 3 h und 24 h keinen dunkeltoxischen Effekt aufwiesen (Abbildung 39, A und C). Ein induzierter phototoxischer Effekt konnte für die neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 für beide Inkubationszeiten nachgewiesen werden (Abbildung 39, B und D). Dieser unterschieden sich signifikant von den Ergebnissen der analog behandelten Dunkelkontrolle. Beim Vergleich des phototoxischen Effekts nach 3 h zwischen mTHPC und den neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 ergab sich eine verminderten Zellviabilität auf 21 ± 8 % für mTHPC, auf 26 ± 5 % für BLC2175 und auf 32 ± 6 % für BLC5152 nach 3 h Inkubation und auf 15 ± 3 % für mTHPC, auf 18 ± 6 % für BLC2175 und auf 15 ± 3 % für BLC5152 nach 24 h Inkubation. Dies war ein Hinweis auf einen mit mTHPC vergleichbaren phototoxischen Effekt der neue synthetisierten Photosensibilisatoren. Die Photosensibilisatoren BLC 1157, BLC 6151, BLC 6166 und BLC 6167 zeigten keinen phototoxischen Effekt in den durchgeführten Tests. In den hier gezeigten Untersuchungen konnten die neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 als potenzielle neue Wirkstoffe für die PDT von intestinalen Dünndarmkarzinomen identifiziert werden.

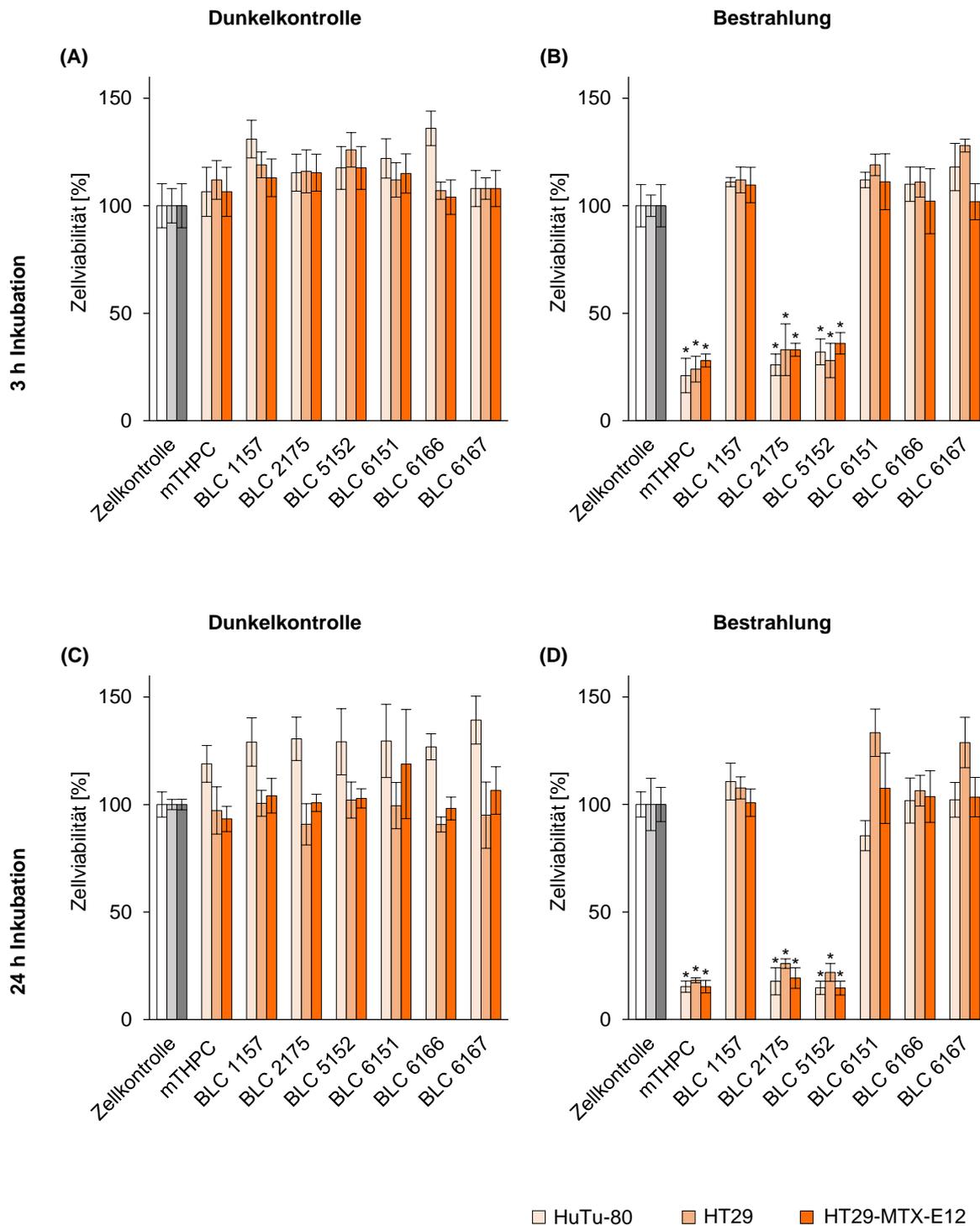


Abbildung 39: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der neu synthetisierten Photosensibilisatoren

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit 5 $\mu\text{mol/L}$ der neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 1157, BLC 2175, BLC 5152, BLC 6151, BLC 6166 und BLC 6167 inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J/cm^2 , B und D) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt (A und C). Zur Prüfung der Dunkel- und Phototoxizität wurde die Zellviabilität gemessen. Jeder Messwert ist als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. ($n = 4$, $k = 12$)

4.3.3 Untersuchung von nanopartikulären Formulierungen

Die Untersuchungen des freien Photosensibilisators mTHPC und den neu entwickelten Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 zeigten eine effektive anti-tumorale Wirkung. Daher wurden diese ausgewählt für die Inkorporation in verschiedene nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme. Für die Screening-Untersuchungen wurden diese unterteilt in PLGA-basierte Nanopartikel WWU, liposomale Formulierungen biolitec® und PLGA-basierte Nanopartikel IBMT. Diese wurden auf Dunkeltoxizität und den induzierten phototoxischen Effekt untersucht, um die anti-tumorale Wirksamkeit zu ermitteln. Des Weiteren wurden Leerpartikel auf einen potenziellen zytotoxischen Effekt geprüft.

PLGA-basierte Nanopartikel WWU

Zunächst wurde der Leerpartikel basierend auf PLGA in den Größen 100 nm und 200 nm sowie mit den Modifizierungen Chitosan (CS) und Polyethylenglycol (PEG) untersucht, um einen zytotoxischen Effekt auszuschließen. Hierfür wurden die Leerpartikel für 3 h bzw. 24 h auf den 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Versuchsansätze bestrahlt, der andere Teil blieb unbestrahlt als Dunkelkontrolle. Die Messungen zeigten, dass die Leerpartikel keinen zytotoxischen Effekt unabhängig von der Inkubationszeit und der Bestrahlung aufwiesen (Abbildung 40). Die Durchführung des Welch-Tests zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Dunkelkontrolle und den bestrahlten Proben konnte diesen ausschließen. Die neu entwickelten Nanopartikel, basierend auf PLGA und den entsprechenden Modifizierungen, wiesen in den durchgeführten Untersuchungen keinen zytotoxischen Effekt auf.

Die mit dem Photosensibilisator mTHPP beladenen Nanopartikel, basierend auf PLGA und den Modifizierungen mit Chitosan (CS) und Polyethylenglycol (PEG), wurden auf ihre Dunkeltoxizität und den induzierten phototoxischen Effekt mit einer mTHPP-Konzentration von 5 µmol / L geprüft (Abbildung 41). Die freien Photosensibilisatoren mTHPC und mTHPP wurden zum Vergleichen der Effektivität mitgeführt. Es wurde der Unterschied der Zellviabilität zwischen der Dunkelkontrolle und den bestrahlten Zellen mittels Welch-Test statistisch überprüft. Es konnte ein signifikanter Unterschied nach der Bestrahlung gemessen werden. Die Zellviabilität verringerte sich nach 3 h Inkubation auf 25 % bis 63 % und nach 24 h Inkubation auf 11 % bis 21 %. Demnach konnte ein induzierter phototoxischer Effekt der nanopartikulären Formulierungen mit inkorporiertem mTHPP nachgewiesen werden.

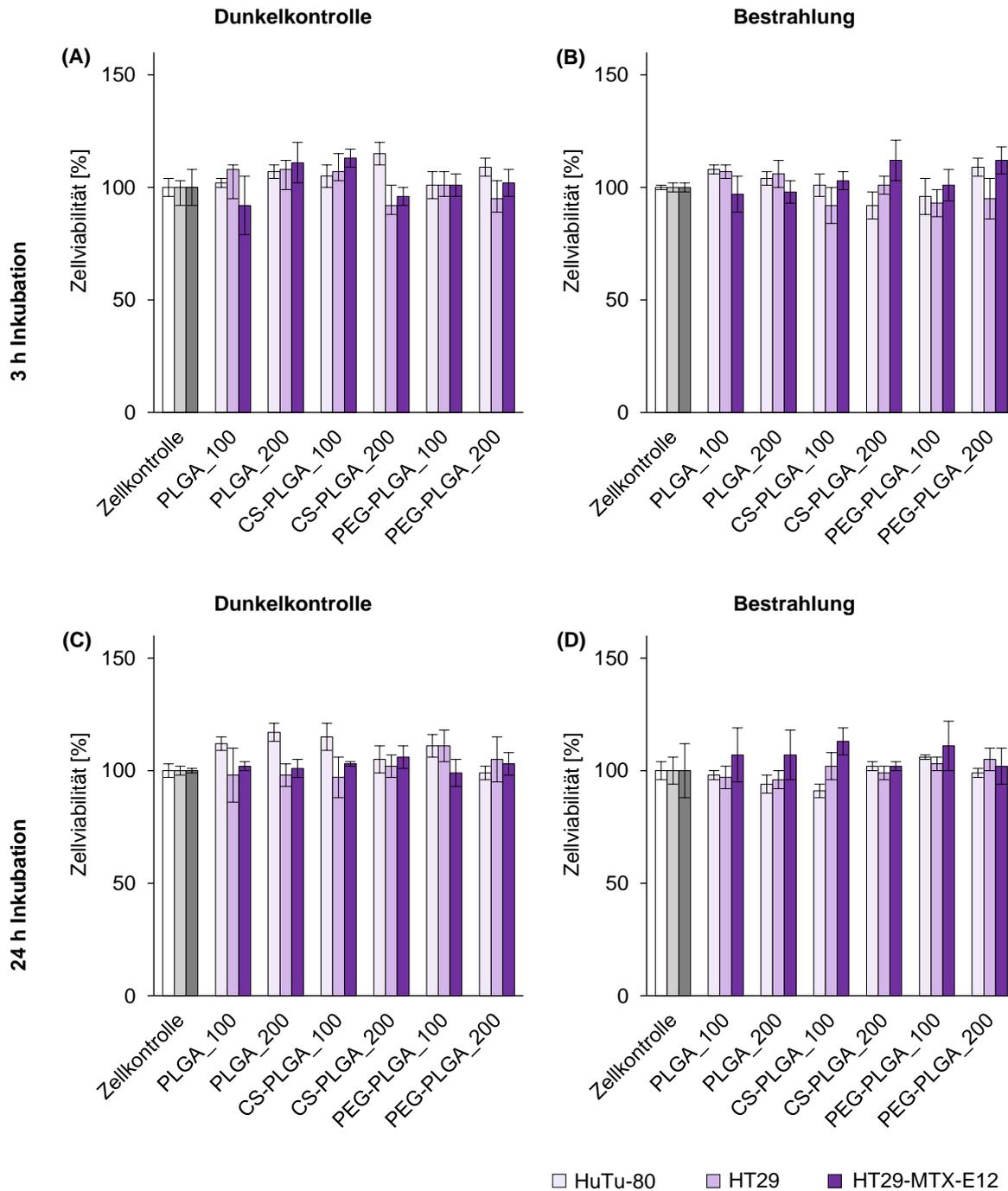


Abbildung 40: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität von Leertpartikeln mit verschiedenen Größen und Modifizierungen

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit den Leertpartikeln PLGA, CS-PLGA und PEG-PLGA in den Größen 100 nm und 200 nm für 3 h und 24 h inkubiert. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Zellkontrolle mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J/cm², B und D). Zur Bestimmung der Dunkeltoxizität fand keine Bestrahlung statt (A und C). Die Zellviabilität wurde als Kenngröße gemessen. Jeder Messwert ist als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4, k = 12)

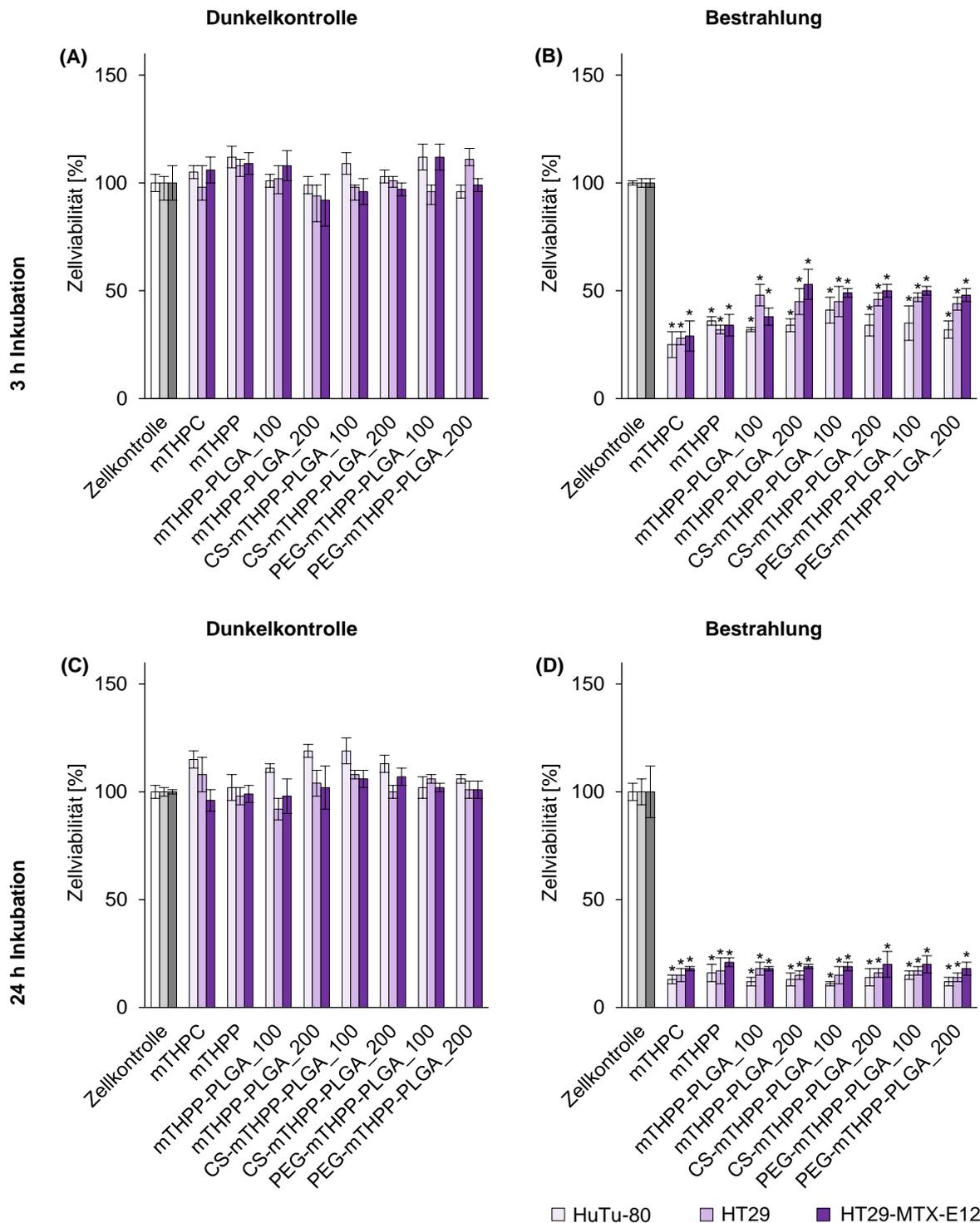


Abbildung 41: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der nanopartikulären Formulierungen mit dem inkorporierten Photosensibilisator mTHPP

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit den Nanopartikeln mTHPP-PLGA, CS-mTHPP-PLGA und PEG-mTHPP-PLGA in den Größen 100 und 200 nm für 3 h und 24 h inkubiert. Die Nanopartikel enthielten inkorporiert den Photosensibilisator mTHPP. Die freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ eingesetzt. Als Kontrollen wurde eine unbehandelte Zellkontrolle und der Photosensibilisator mTHPC mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm^2 , B und D). Zur Bestimmung der Dunkeltoxizität fand keine Bestrahlung statt (A und C). Es wurde eine Messung der Zellviabilität durchgeführt. Jeder Messwert ist als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4, k = 12)

Liposomale Formulierungen

Die neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 konnten als potenzielle Wirkstoffe für die Behandlung von intestinalen Dünndarntumoren identifiziert werden. Diese wurden daher in eine liposomale Formulierung inkorporiert und im Vergleich zu mTHPC und den freien Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 getestet (Abbildung 42). Hierzu wurden die Leerpartikel, der freie Photosensibilisator mTHPC und die beladenen Nanopartikel LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 für 3 h und 24 h auf den 2D-Monolayer-Zellkulturen inkubiert. Danach erfolgte die Bestrahlung mit einer Bestrahlungsdosis von 50 J / cm^2 mit einer Wellenlänge von 652 nm. Die Dunkelkontrollen wurden nicht bestrahlt. Die Beurteilung des induzierten phototoxischen Effektes und der Dunkeltoxizität erfolgte mittels Zellviabilitäts-Tests. Die liposomalen Formulierungen zeigten keinen dunkeltoxischen Effekt unabhängig von der Inkubationszeit. Die Inkubation und Bestrahlung zeigte bei den Proben, die mit freiem und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren inkubiert wurden, einen phototoxischen Effekt. Dieser zeigte sich in einer Verringerung der Zellviabilität auf 27 % bis 44 % nach 3 h Inkubation und 28 % bis 14 % nach 24 h Inkubation. Die Unterschiede der Zellviabilität der Dunkelkontrolle und der bestrahlten Zellen konnte mittels Welch-Test als signifikant eingestuft werden. Zusammenfassend konnte eine Dunkeltoxizität der neuen liposomalen Formulierungen ausgeschlossen werden und ein induzierter phototoxischer Effekt erwiesen werden.

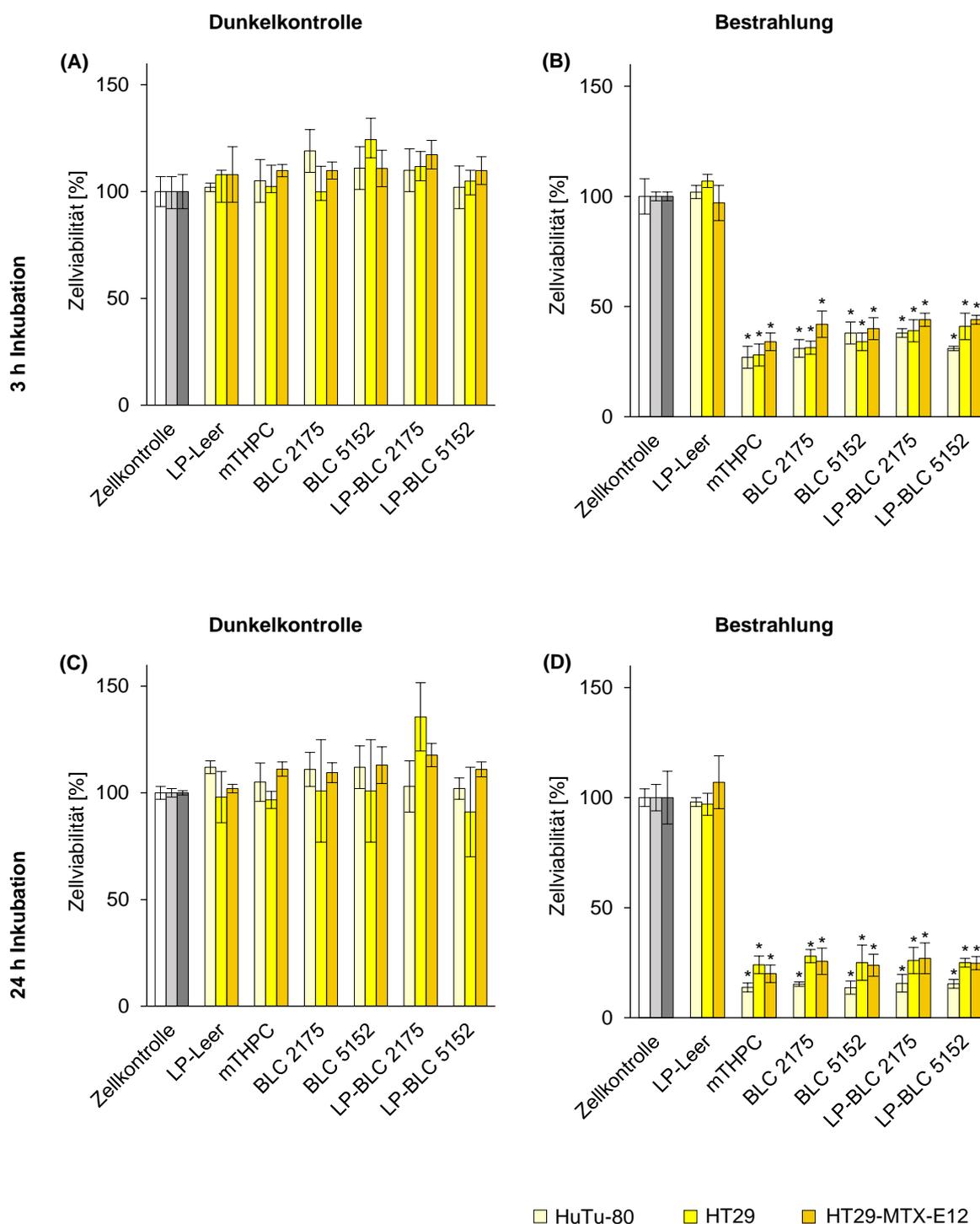


Abbildung 42: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der liposomalen Formulierungen

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit 5 µmol / L der freien und liposomalen Formulierungen (LP) mit den Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm², B und D) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt (A und C). Es wurde zusätzlich die Zellkontrolle, der leere liposomale Partikel (LP-Leer) und der Photosensibilisator mTHPC vermessen. Es wurde ein Test zur Ermittlung der Zellviabilität durchgeführt. Jeder Messwert ist als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4, k = 12)

Untersuchung der IBMT-Nanopartikel

Bei der Untersuchung der biologischen Wirksamkeit lag der Fokus auf dem induzierten phototoxischen Effekt, um einen Nachweis über die anti-tumorale Wirkung des freien und nanopartikulären Photosensibilisators zu erhalten. Des Weiteren wurde der dunkeltoxische Effekt untersucht, um Photosensibilisatoren und nanopartikuläre Formulierungen, die einen unerwünschten dunkeltoxischen Effekt auslösen, ausschließen zu können. Hierfür wurden die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 mit dem freien Photosensibilisator mTHPC, mit den Leertpartikeln CP-PLGA und F127-PLGA und den beladenen Nanopartikeln CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA für 3 h und 24 h inkubiert. Danach erfolgte für die Bestrahlungsuntersuchungen eine Bestrahlung bei 652 nm und einer Dosis von $50 \text{ J} / \text{cm}^2$. Die Dunkelkontrolle wurde nicht bestrahlt. Die Untersuchung des dunkeltoxischen und induzierten phototoxischen Effektes erfolgte mit einem Zellviabilitätstest (Abbildung 43). Die Leertartikel CP-PLGA und F127-PLGA zeigten weder in der Dunkelkontrolle noch bei den bestrahlten Untersuchungen einen toxischen Effekt. Die Dunkelkontrolle zeigte auch, unabhängig von den Inkubationszeiten von 3 h und 24 h, keinen toxischen Effekt bei den mit dem Photosensibilisator mTHPC beladenen Nanopartikeln CP—mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA. Die Bestrahlung nach 3 h und 24 h zeigte einen deutlichen phototoxischen Effekt bei dem freien Photosensibilisator mTHPC und den beladenen Nanopartikeln CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA mit einer Verminderung der Zellviabilität auf 31 % bis 44 % nach 3 h Inkubation und 14 bis 28 % nach 24 h Inkubation. Der induzierte phototoxische Effekt zeigte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Dunkelkontrolle. Insgesamt löste eine Inkubationszeit von 24 h einen höheren phototoxischen Effekt im Vergleich zur Inkubationszeit von 3 h aus.

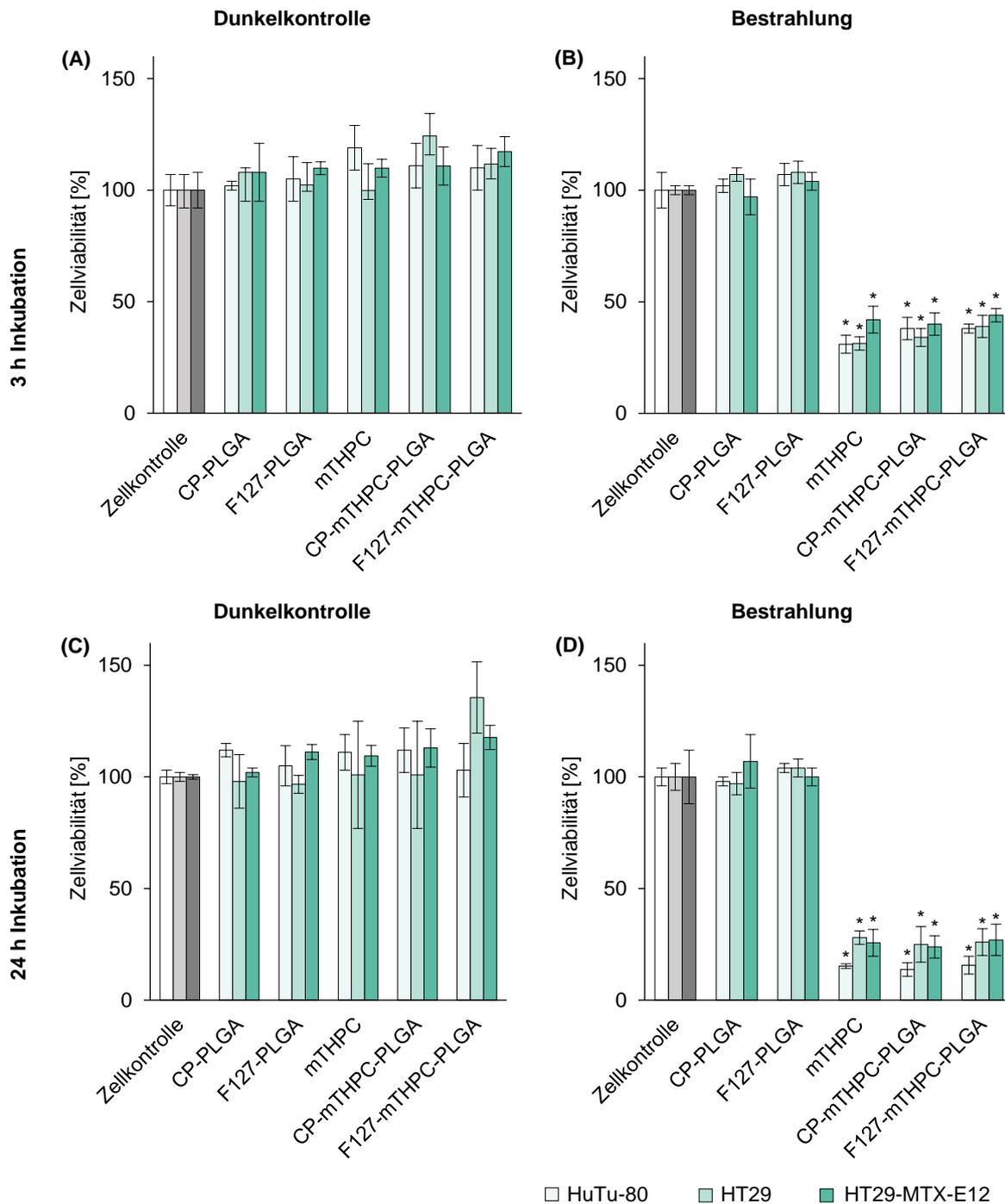


Abbildung 43: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der IBMT-Nanopartikel

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit dem freien Photosensibilisator mTHPC, den Leerpartikeln CP-PLGA und F127-PLGA und den mit mTHPC beladenen Nanopartikeln CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA inkubiert. Die freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm^2 , B und D) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt (A und C). Es wurde ein Test zur Ermittlung der Zellviabilität durchgeführt. Jeder Messwert ist als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4, k = 12)

4.3.4 Finale Formulierungen

Ziel der Untersuchungen der finalen Formulierungen war es, vielversprechende neu synthetisierte Photosensibilisatoren und deren nanopartikuläre Formulierungen zu identifizieren. Die Kriterien hierbei waren, dass die freien Photosensibilisatoren nach der Bestrahlung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge einen toxischen Effekt aufweisen, jedoch keinen dunkeltoxischen Effekt zeigen. Analog galt dies für die nanopartikulären Formulierungen, in die der Photosensibilisator inkorporiert wurde. Zusätzlich sollten durch die nanopartikulären Formulierungen keine toxischen Effekte auftreten. Aufgrund der vorrausgehenden Untersuchungen wurden die folgenden freien Photosensibilisatoren und nanopartikulären Systeme ausgewählt:

- Photosensibilisator: mTHPC
- Neu synthetisierte Photosensibilisatoren: BLC 2175, BLC 5152
- Liposomale Formulierungen biolitec®: LP-BLC 2175, LP-BLC 5152
- Nanopartikuläre Formulierungen WWU: PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA
- Nanopartikuläre Formulierungen IBMT: CP-mTHPC-PLGA, F127-mTHPC-PLGA

Die Prüfung der Dunkel- und Phototoxizität wurde vergleichend für die ausgewählten finalen Formulierungen mit den Screening-Modellen 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide durchgeführt. Neben dem dunkeltoxischen Effekt und dem induzierten phototoxischen Effekt wurde die Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge analysiert. Die Untersuchungen der 2D-Monolayer-Zellkulturen zeigten, dass die freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren keinen dunkeltoxischen Effekt aufwiesen. Des Weiteren konnte nach der Bestrahlung ein signifikanter phototoxischer Effekt detektiert werden. Dabei lag die Verringerung der Zellviabilität nach einer Inkubationszeit von 3 h durchschnittlich zwischen 31 bis 52 % und nach 24 h bei 18 bis 27 %. Somit wurden die Ergebnisse des Vorscreenings bestätigt (Abbildung 44). Im nächsten Schritt wurden die finalen Formulierungen auf den 3D-Tumorsphäroiden für 3 h und 24 h inkubiert und die Dunkeltoxizität bzw. Phototoxizität untersucht (Abbildung 45). Es konnte im Rahmen der Untersuchungen kein dunkeltoxischer Effekt der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren auf die 3D-Tumorsphäroide gemessen werden. Ein Nachweis des induzierten phototoxischen Effekts konnte bei den verwendeten Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 nach einer 3 h Inkubation und anschließender Bestrahlung nicht nachgewiesen werden. Erst nach einer Inkubationszeit von 24 h und anschließender Bestrahlung konnte ein phototoxischer Effekt detektiert werden. Dieser lag bei den 3D-Tumorsphäroiden der Zelllinie HuTu-80 zwischen 26 bis 50 % verringerter Zellviabilität. Bei den 3D-Tumorsphäroiden bestehend aus der Zelllinie HT29 lag dieser Wert bei 50 bis 79 % und bei der Zelllinie HT29-MTX-E12 bei 50 bis 64 %. Diese Werte wurden mittels Welch-Test

auf ihren Unterschied gegenüber der Dunkelkontrolle getestet und konnten als signifikant unterschiedlich eingestuft werden.

Die Quantifizierung der **aufgenommenen Wirkstoffmenge** wurde durchgeführt, um Aufschluss über die Substanzmenge zu erhalten, die von der Zelle aufgenommen wurde. Hierzu wurden analog zu den Untersuchungen der Dunkeltoxizität und induzierten Phototoxizität die 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide für 3 h und 24 h mit den freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und mittels Lyse und Zentrifugation aufgereinigt. Der so extrahierte Photosensibilisator wurde anschließend mittels HPLC-Analyse detektiert. Die mitgeführte Zellkontrolle zeigte in allen durchgeführten Untersuchungen zur Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge keine Messwerte, da diese ohne Zugabe des Photosensibilisators mitgeführt wurde (Abbildung 46). Die 2D-Monolayer-Zellkulturen zeigten eine Aufnahme des Photosensibilisators nach 3 h und 24 h Inkubation. Die aufgenommene Menge lag nach 3 h Inkubationszeit zwischen 0,019 bis 0,080 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bei der Zelllinie HuTu-80, 0,013 bis 0,062 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bei der Zelllinie HT29 und 0,012 bis 0,046 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bei der Zelllinie HT29-MTX-E12. Nach 24 h Inkubationszeit betrug die aufgenommene Menge zwischen 0,001 bis 0,006 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bei der Zelllinie HuTu-80, 0,014 bis 0,055 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bei der Zelllinie HT29 und 0,012 bis 0,028 $\mu\text{mol} / \text{L}$ bei der Zelllinie HT29-MTX-E12. Daraus ließ sich schließen, dass die Aufnahme des Photosensibilisators in die Zellen der 2D-Monolayer-Zellkultur nach einer Inkubationszeit von 3 h höher war als nach 24 h. Bei den 3D-Tumorsphäroiden lag die aufgenommene Menge des Photosensibilisators nach 3 h Inkubation bei der Zelllinie HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 unterhalb des Quantifizierungslimits von 0,012 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Daher konnten die Werte der 3 h Inkubation der 3D-Tumorsphäroide nicht für eine quantitative Auswertung der aufgenommenen Wirkstoffmenge verwendet werden. Im Vergleich zu den 2D-Monolayer-Zellkulturen war die aufgenommene Menge bei den 3D-Tumorsphäroiden nach 24 h deutlich höher (Abbildung 47). Diese lag bei einer aufgenommenen Menge des Photosensibilisators bei der Zelllinie HuTu-80 zwischen 0,019 bis 0,050 $\mu\text{mol} / \text{L}$, bei der Zelllinie HT29 zwischen 0,013 bis 0,033 $\mu\text{mol} / \text{L}$ und bei der Zelllinie HT29-MTX-E12 zwischen 0,012 bis 0,032 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Die Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge zeigte, dass sowohl die 2D-Monolayer-Zellkulturen als auch die 3D-Tumorsphäroide in der Lage waren, den Photosensibilisator in freier und formulierter Form aufzunehmen. Insgesamt war bei den HuTu-80 Zellen unabhängig vom Modell und der Inkubationszeit eine höhere Aufnahme des Photosensibilisators detektierbar als bei den Zelllinien HT29 und HT29-MTX-E12. Zudem konnte eine signifikant erhöhte Aufnahme der nanopartikulären Formulierungen CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA gegenüber des freien Photosensibilisators mTHPC für die 2D-Monolayer Zellkulturen HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 für die Inkubationszeiten 3 h und 24 h sowie und für die 3D-Tumorsphäroide

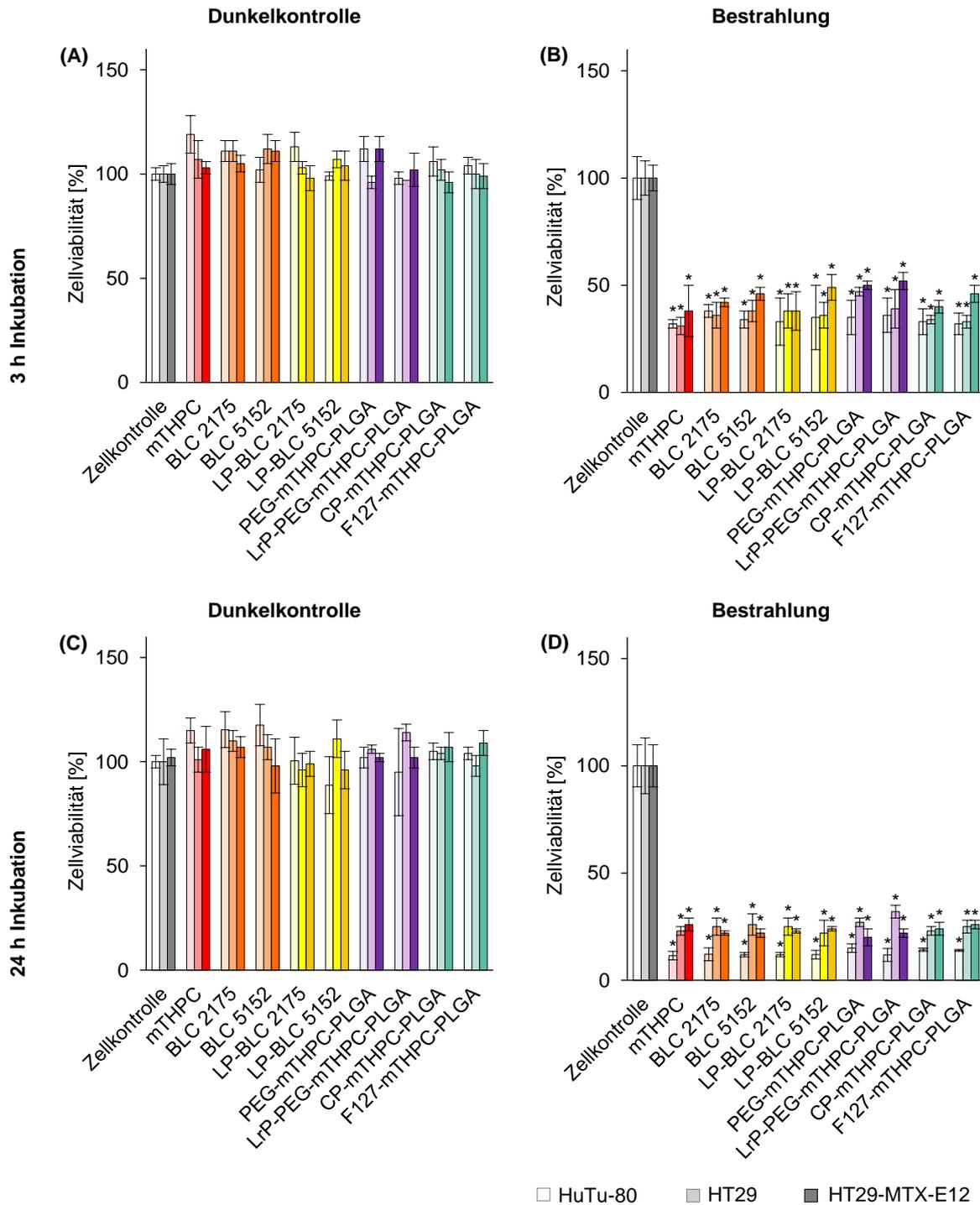


Abbildung 44: Übersicht der 2D-Monolayer-Zellkulturen-Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der finalen PS und Formulierungen

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit den freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175, BLC 5152), den liposomalen beladenen Formulierungen (LP-BLC 2175, LP-BLC 5152) und den mit mTHPC-beladenen Nanopartikeln (PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) inkubiert. Die freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm^2 , B und D) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt (A und C). Es wurde ein Test zur Ermittlung der Zellviabilität durchgeführt. Jeder Messwert ist als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. ($n = 4$, $k = 12$)

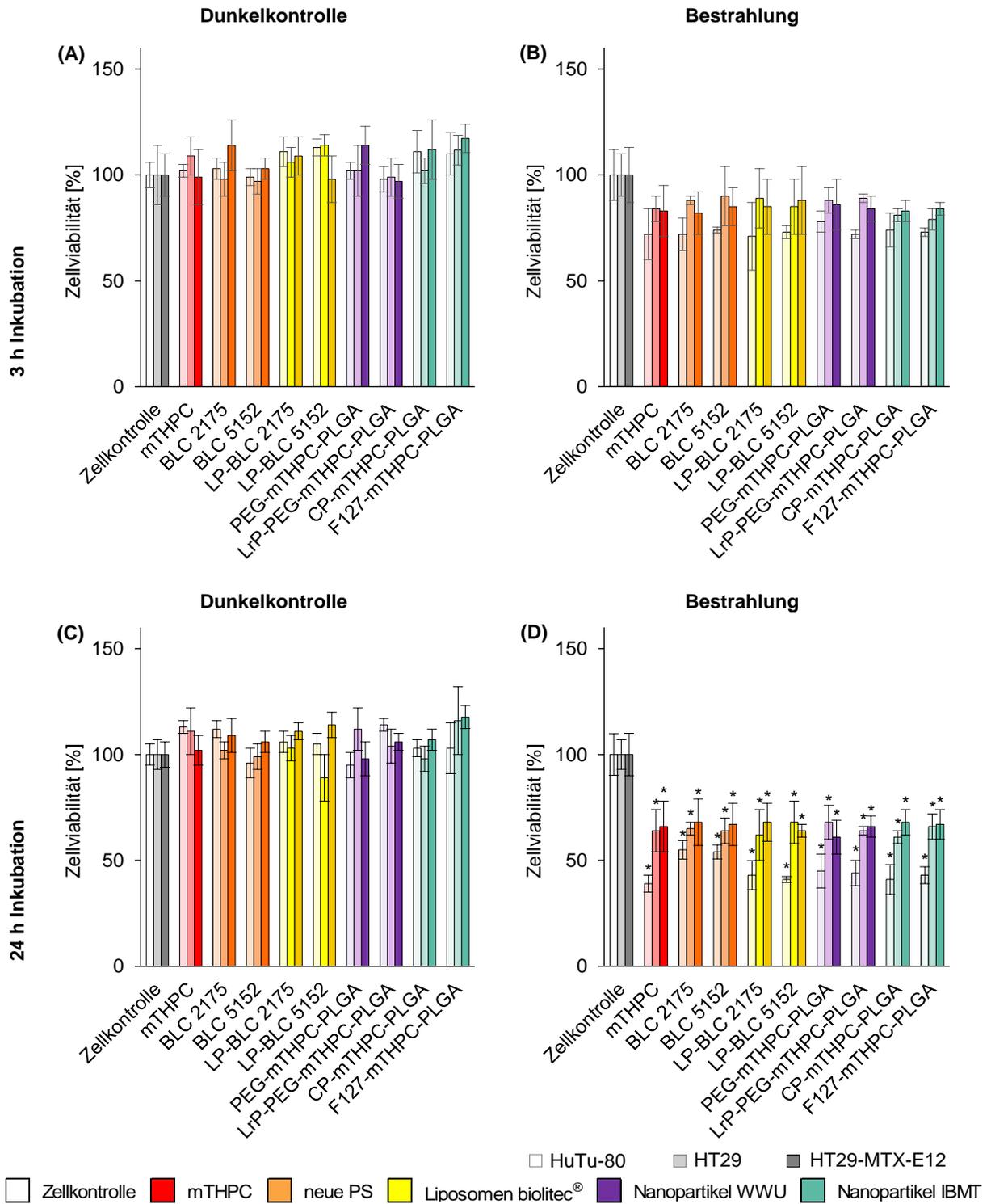
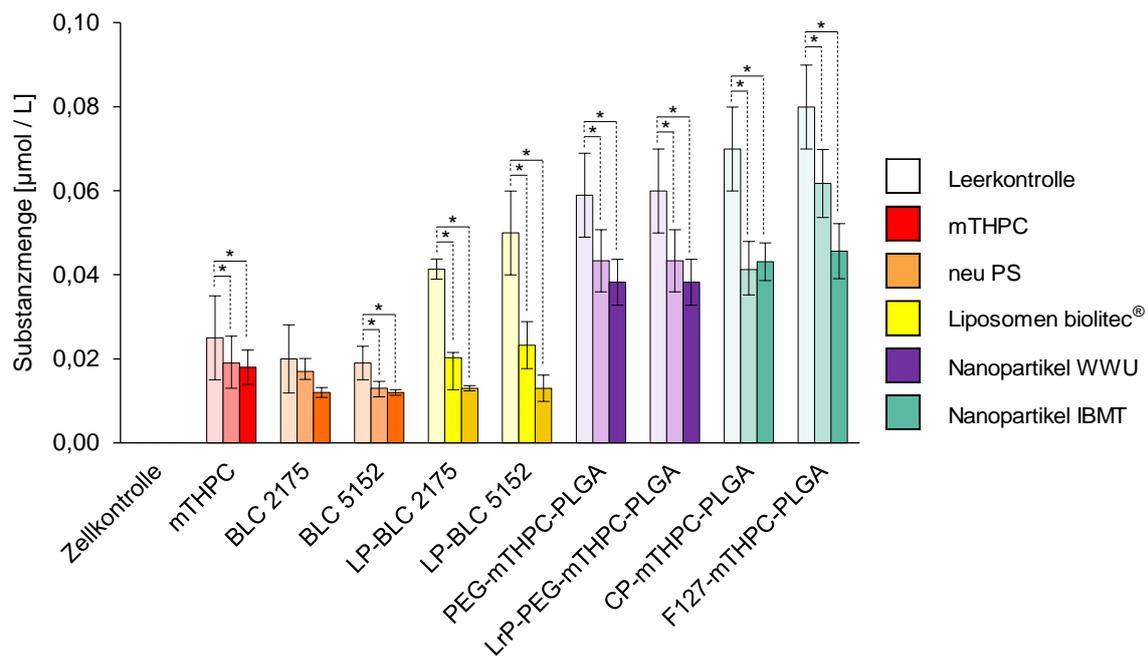
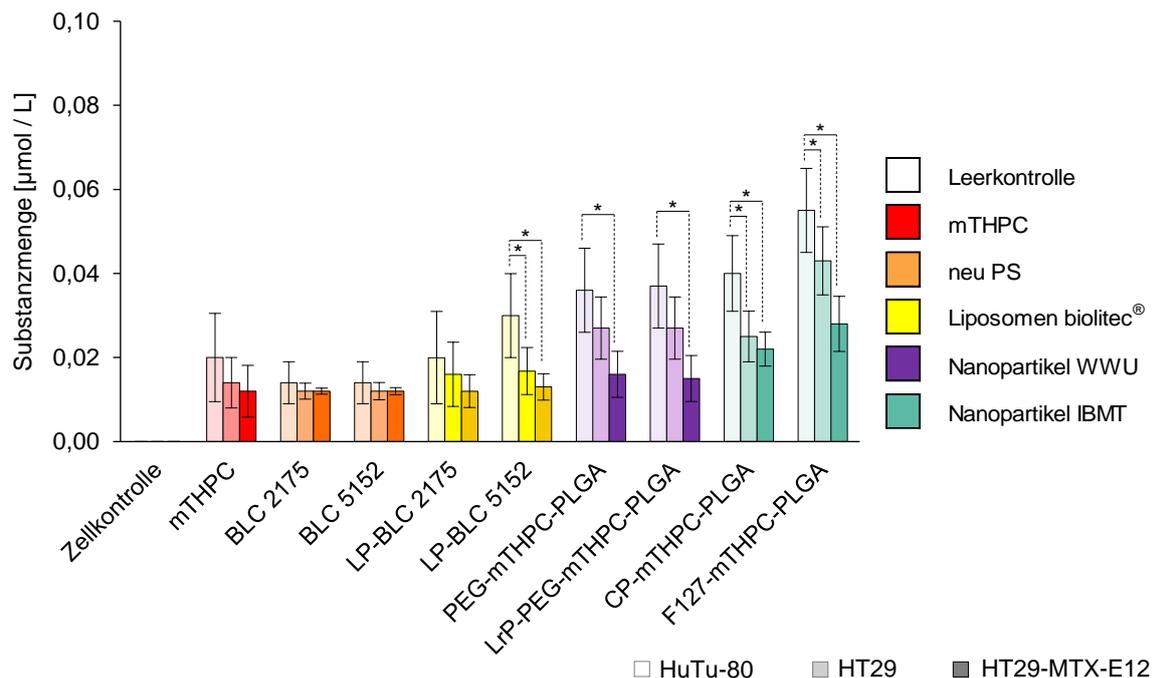
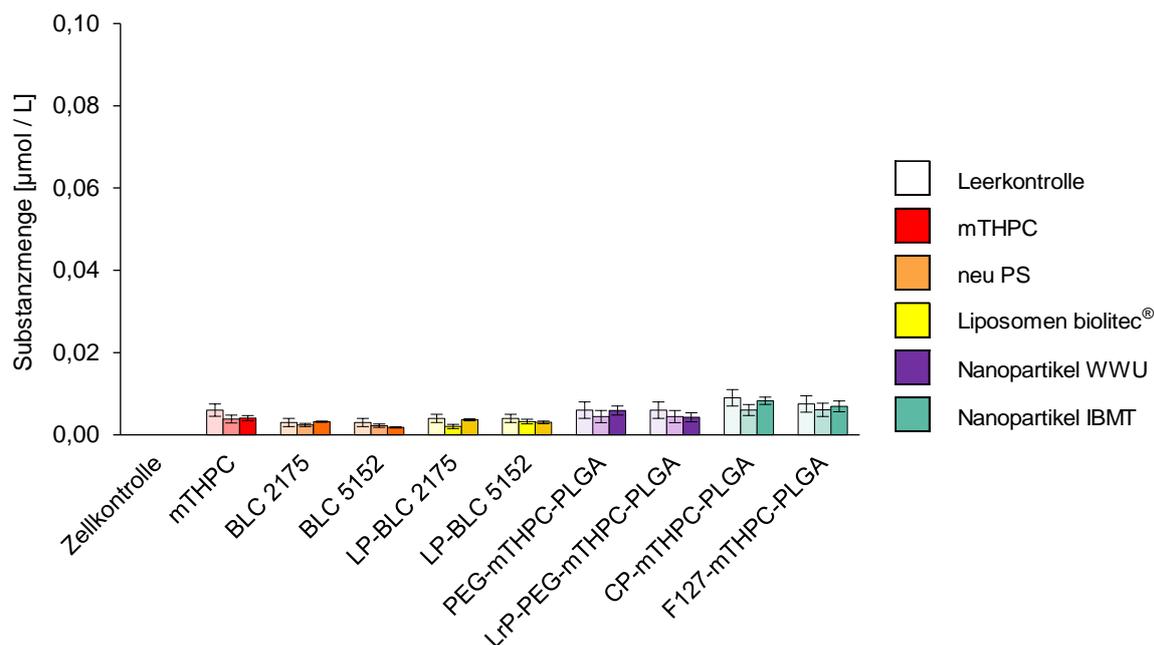
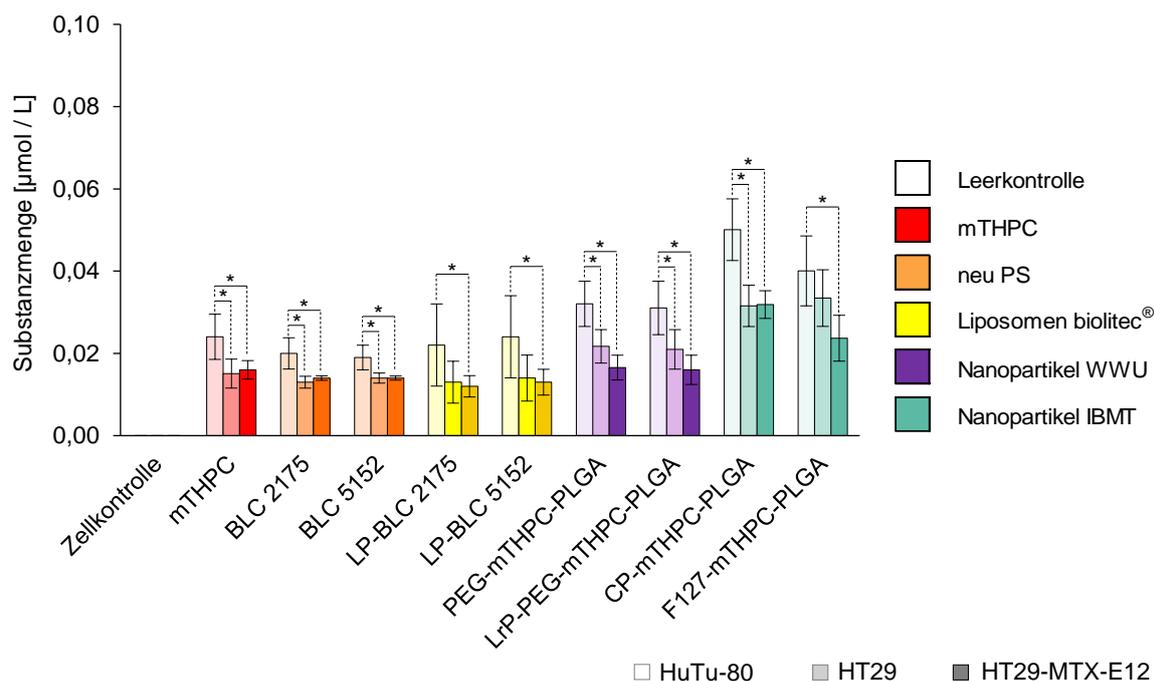


Abbildung 45: Übersicht der 3D-Tumorsphäroid-Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der finalen PS und Formulierungen

Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit den freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175, BLC 5152), den liposomalen beladenen Formulierungen (LP-BLC 2175, LP-BLC 5152) und den mit mTHPC-beladenen Nanopartikeln (PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) inkubiert. Die freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden mit einer Konzentration von 5 µmol / L eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bestrahlt (652 nm, 50 J / cm², B und D) bzw. für die Bestimmung der Dunkeltoxizität nicht bestrahlt (A und C). Es wurde ein Test zur Ermittlung der Zellviabilität durchgeführt. Jeder Messwert ist als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Bestrahlung gegenüber den Messwerten der Dunkelkontrolle nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4, k = 12)

(A) 2D-Monolayer: Inkubationszeit 3 h**(B) 2D-Monolayer: Inkubationszeit 24 h****Abbildung 46: Quantifizierung der aufgenommenen Menge der finalen freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren in 2D-Monolayer Zellkulturen**

Die 2D-Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit den freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175, BLC 5152), den liposomalen beladenen Formulierungen (LP-BLC 2175, LP-BLC 5152) und den mit mTHPC-beladenen Nanopartikeln (PEG-mTHPC-PLGA, LP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) inkubiert. Die freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden mit einer Konzentration von 5 µmol / L eingesetzt. Die Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge erfolgte mittels HPLC Analyse. Jeder Messwert ist als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Zelllinie HuTu-80 (Duodenum Adenocarcinoma) gegenüber den Messwerten der Zelllinien HT29 und HT29-MTX-E12 (Colorectale Adenocarcinoma) nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4, k = 12)

(A) 3D-Tumorsphäroide: Inkubationszeit 3 h**(B) 3D-Tumorsphäroide: Inkubationszeit 24 h****Abbildung 47: Quantifizierung der aufgenommenen Menge der finalen freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren in 3D-Tumorsphäroide**

Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 wurden für 3 h und 24 h mit den freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175, BLC 5152), den liposomalen beladenen Formulierungen (LP-BLC 2175, LP-BLC 5152) und den mit mTHPC-beladenen Nanopartikeln (PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) inkubiert. Die freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden mit einer Konzentration von 5 µmol / L eingesetzt. Die Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge erfolgte mittels HPLC Analyse. Jeder Messwert ist als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der Zelllinie HuTu-80 (Duodenum Adenocarcinoma) gegenüber den Messwerten der Zelllinien HT29 und HT29-MTX-E12 (Colorectale Adenocarcinoma) nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4, k = 12)

4.4 Untersuchungen mit spezifischen präklinischen Testsystemen

Von der Entwicklung eines neuen Arzneistoffes bis zu dessen Einsatz in der Therapie von Patienten muss dieser eine Vielzahl von Untersuchungen bestehen. Nach der chemischen Charakterisierung werden präklinische Studien zur Toxizität und Untersuchungen zur Wirksamkeit durchgeführt. Diese geben Aufschluss darüber, ob der Arzneistoff unerwünschte toxische Effekte aufweist und ob die gewünschte Wirkung erzielt werden kann. Ein Teil der präklinischen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit als „Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit“ durchgeführt. Es wurden sowohl die freien als auch die nanopartikulär formulierten Photosensibilisatoren auf ihre Dunkeltoxizität und ihren induzierten phototoxischen Effekt geprüft. Hierfür wurden 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide verwendet. In diesen Untersuchungen konnten vielversprechende neu synthetisierte und nanopartikuläre Photosensibilisatoren identifiziert werden. Diese sollten in den „Untersuchungen mit spezifischen präklinischen Testsystemen“ näher charakterisiert werden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren die in den Untersuchungen mit spezifischen präklinischen Testsystemen verwendet wurden

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Photosensibilisatoren (freie PS) und die nanopartikulären Formulierungen (Leerpartikel und mit inkorporiertem PS), die im zweiten Schritt mit speziellen präklinischen Testsystemen untersucht wurden.

Gruppierung	Legende	Bezeichnung	Modifizierung	Substanz
Photosensibilisator (PS)		mTHPC	keine	freier PS
neu synthetisierte PS		BLC 2175	keine	freier PS
		BLC 5152		
Nanopartikel WWU		PEG-mTHPC-PLGA	PEG	mTHPC inkorporiert
		LrP-PEG-mTHPC-PLGA	PEG + LrP	
Liposomen biolitec®		LP-BLC 2175	keine	neue PS inkorporiert
		LP-BLC 5152		
Nanopartikel IBMT		CP-mTHPC-PLGA	Carbopol (CP)	mTHPC inkorporiert
		F127-mTHPC-PLGA	Pluronic F127 (F127)	

Ziel war es, nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme zu entwickeln, die in der Lage sind den Wirkstoff zum Wirkort zu transportieren. Der Wirkort, das Dünndarmkarzinom, befindet sich im Gastrointestinaltrakt. Die Oberfläche des Dünndarms ist mit einer Mukusschicht vom Darmlumen getrennt. Zusätzlich finden peristaltische Bewegungen statt, die für den Transport von Nahrung durch den Gastrointestinaltrakt verantwortlich sind. Um zu untersuchen, ob die freien und nanopartikulären Formulierungen in der Lage sind unter diesen Bedingungen am

Wirkort anzukommen, wurden spezielle präklinische Testsysteme entwickelt und die vielversprechenden Photosensibilisatoren und deren Formulierungen getestet.

4.4.1 Mikrofluidisches Mukusbarriere-Modell

Zur Untersuchung der Mukoadhäsion und Mukopermeation der freien Substanzen und nanopartikulären Formulierungen wurde ein mikrofluidisches Mukusbarriere-Modell entwickelt. Der sogenannte Mukus-Chip besteht aus einem apikalen und einem basolateralen Kompartiment, welche durch eine Mukusschicht voneinander getrennt sind. Im unteren Kompartiment befindet sich ein Kanal, durch den mit einer Peristaltik-Pumpe der Puffer transportiert wurde. Die Probe wurde in das apikale Kompartiment pipettiert und über einen Zeitraum von drei Stunden der Transport über die Mukus-Barriere untersucht (Abbildung 48).

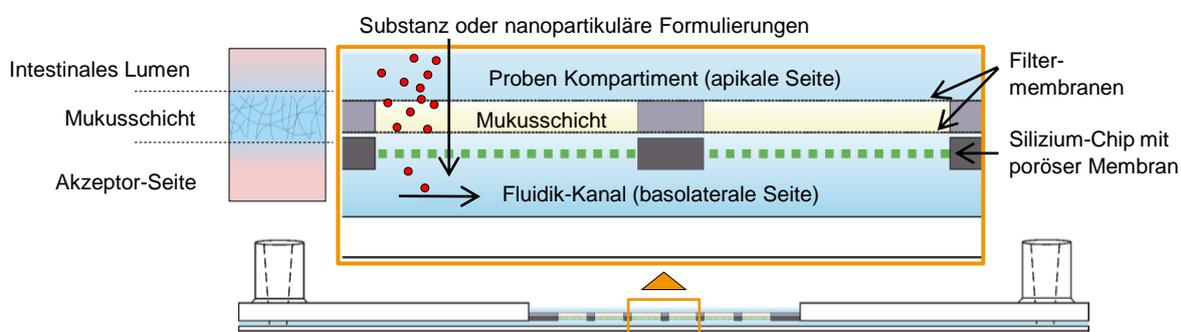


Abbildung 48: Schematischer Aufbau der Mukus-Chip Untersuchungen

Die schematische Abbildung zeigt einen Querschnitt des mikrofluidischen Chip-Moduls. Es ist aufgebaut aus einem Proben-Kompartiment und einem fluidischen Kanal, die durch eine Mukusschicht voneinander getrennt sind. Die Mukusschicht ist von zwei Membranen umgeben. Substanzen oder nanopartikuläre Formulierungen können in das Proben-Kompartiment auf der apikalen Seite appliziert werden. Auf der basolateralen Seite befindet sich ein Fluidik-Kanal, durch den der Puffer mit einer Peristaltikpumpe transportiert wird.

Das Mukus-Chip-Modell wurde für den Versuchszeitraum in einen Wärmeschrank integriert. Der experimentelle Aufbau wurde so konstruiert, dass vier Mukus-Chips parallel genutzt werden konnten. Das Schlauchsystem wurde an die Mukus-Chips angeschlossen und aus dem Wärmeschrank heraus über eine Peristaltikpumpe und ein Flüssigkeitsreservoir geführt. Der verwendete Magnetrührer ermöglichte eine konstante Durchmischung der Akzeptorflüssigkeit (Abbildung 49).

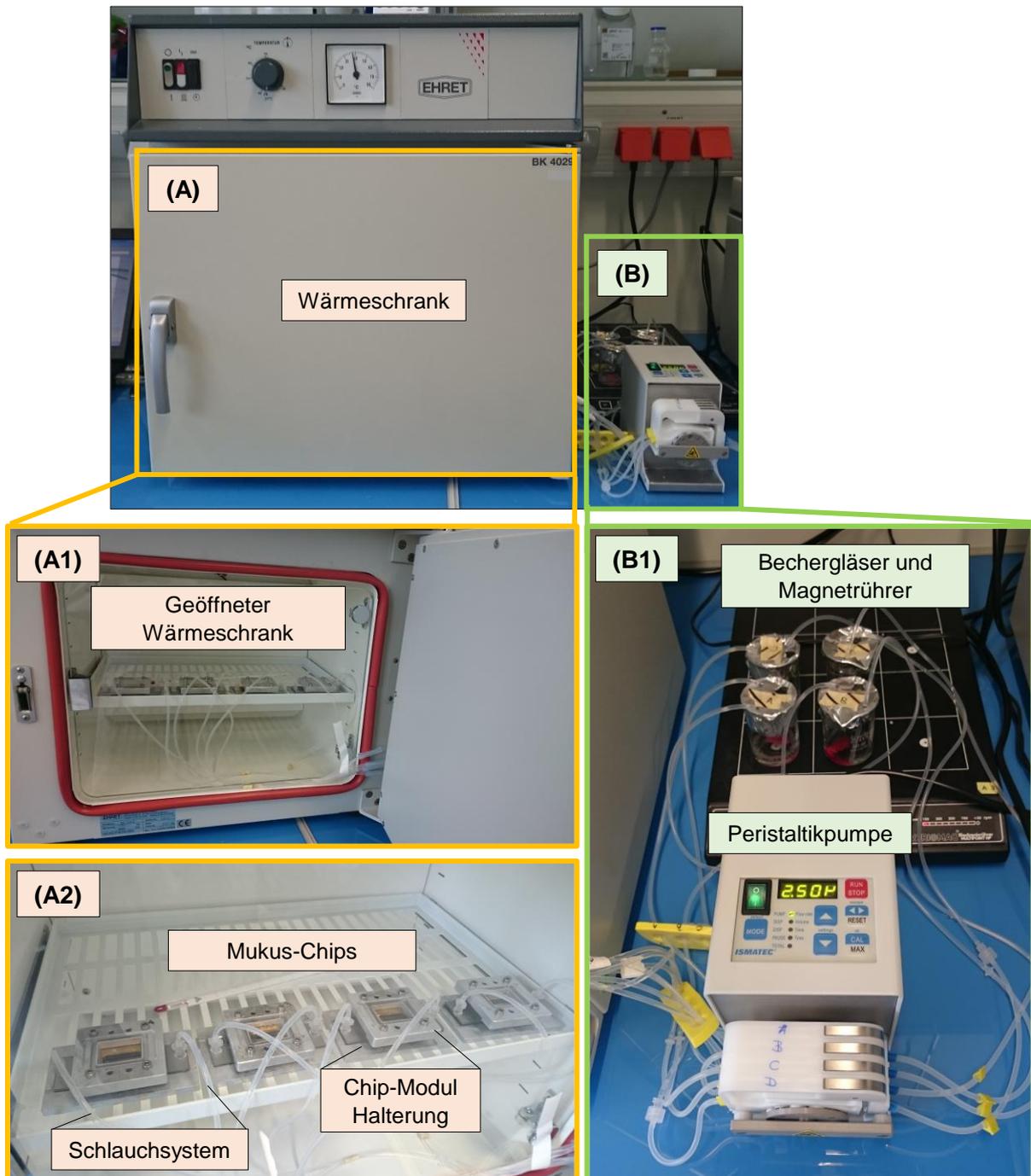


Abbildung 49: Experimenteller Aufbau der Mukus-Chip Untersuchungen

Der experimentelle Aufbau des Mukus-Chips zeigt den Wärmeschrank (A), in den das mikrofluidische Mukus-Chip-Modell für den Versuchszeitraum gestellt wurden. (A1) Für die Versuchsdurchführung konnten vier Mukus-Chips parallel betrieben werden. (A2) Die Mukus-Chips wurden in die Chip-Modul Halterung eingebaut und das Schlauchsystem angeschlossen. (B) Das Schlauchsystem verlief durch eine Peristaltikpumpe und ein Flüssigkeitsreservoir (Becherglas). (B1) Die Peristaltikpumpe pumpte die Akzeptorflüssigkeit durch das System und der Magnetrührer durchmischte die Akzeptorflüssigkeit.

Validierung des Mukus-Chips ohne Mukusschicht

Bevor die Permeation über die Mukusschicht getestet wurde, wurde zunächst untersucht, ob die freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren in der Lage sind über die Membranen des Mukus-Chips ungehindert zu permeieren. Im Versuchsaufbau wurde die Mukusschicht in ein Metallgitter eingebracht, dass zum Schutz der Mukusschicht von zwei Filtermembranen umgeben war. Des Weiteren war der Fluidik-Kanal auf der basolateralen Seite durch eine poröse Silizium-Chip-Membran von der Mukusschicht getrennt. Die verschiedenen verwendeten Membranen des Mukus-Chip-Moduls können einen Einfluss auf die Permeation der apikal applizierten Proben haben. Um dies zu untersuchen, wurde die Permeation der Kontrollsubstanzen sowie der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren über die Membranen des Mukus-Chips ohne Mukus-Applikation untersucht. Hierzu wurden die freien Photosensibilisatoren und deren nanopartikel-inkorporierte Formulierungen mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ auf die apikale Seite des Mukus-Chips appliziert und die Permeation nach 3 h Inkubationszeit mittels HPLC-Analytik untersucht (Abbildung 50). Analog wurde eine Leerkontrolle, FITC-Dextran als Negativkontrolle mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ und Koffein als Positivkontrolle mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ mitgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die getesteten Substanzen und nanopartikel-inkorporierten Formulierungen über die Membranen permeieren können. Die permeierte Substanzmenge der Negativkontrolle FITC-Dextran lag nach 3 h bei $85,2 \pm 4,4 \%$ und der Positivkontrolle Koffein bei $95,1 \pm 0,1 \%$. Die freien Photosensibilisatoren zeigten eine Permeationsrate von $92,7 \pm 0,7 \%$ bei mTHPC, $95,7 \pm 0,9 \%$ bei BLC 2175 und $90,1 \pm 3,2 \%$ bei BLC 5152. Für die liposomalen Formulierungen (Liposomen biolitec®) der Photosensibilisatoren BLC 2175 und 5152 lag der permeierte Wert bei $89,2 \pm 5,1 \%$ für LP-BLC 2175 und bei $90,1 \pm 3,2 \%$ für LP-BLC 5152. Die PLGA-basierten Nanopartikel mit einer PEG und LrP-PEG Modifizierung (Nanopartikel WWU) zeigten nach der Inkubation eine permeierten Substanzmenge von $97,1 \pm 0,9 \%$ bei PEG-mTHPC-PLGA und $96,7 \pm 1,2 \%$ bei LrP-PEG-mTHPC-PLGA. Die PLGA-Nanopartikel mit einer Carbopol®- und Pluronic® F127-Oberflächenmodifizierung (Nanopartikel IBMT) zeigten für CP-mTHPC-PLGA eine permeierte Substanzmenge von $91,2 \pm 2,0 \%$ und für F127-mTHPC-PLGA von $97,3 \pm 0,7 \%$. Die untersuchten Kontrollsubstanzen sowie freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren waren in der Lage, über einen Versuchszeitraum von 3 h mit einem Wert von 89,2 bis 97,1 % über die Membranen des Mukus-Chip-Modells zu permeieren. Daraus wurde geschlossen, dass die Konstruktion des Mukus-Chips für die Untersuchung der Permeation der in der Arbeit verwendeten Kontrollsubstanzen sowie freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren, geeignet war.

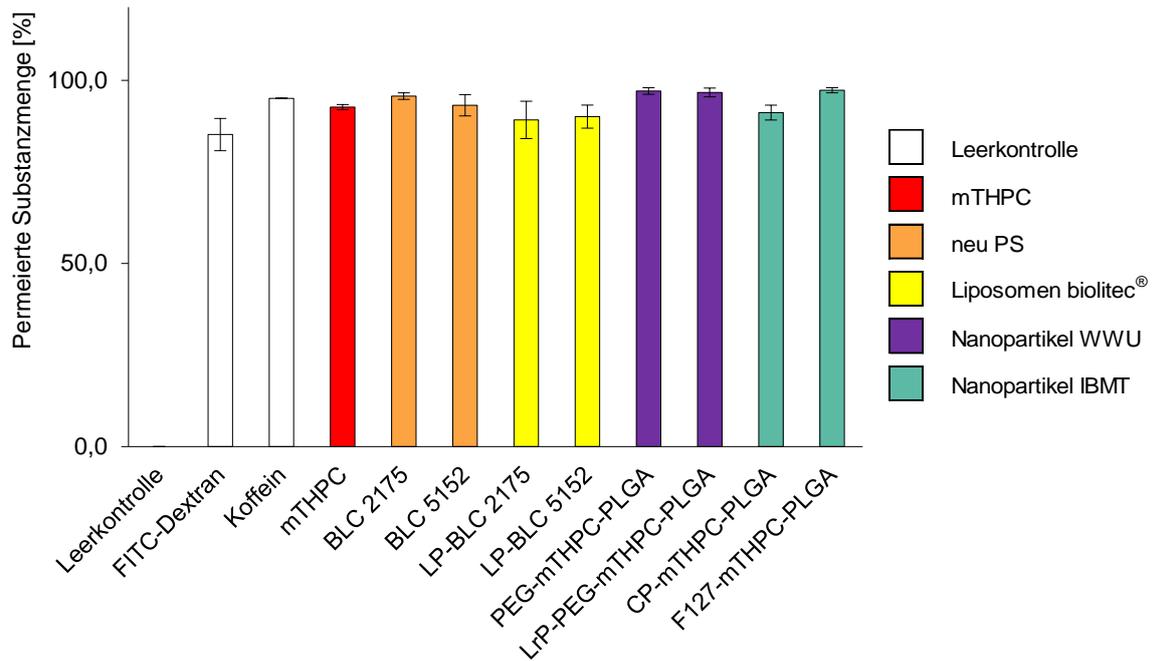


Abbildung 50: Permeierte Substanzmenge über die Filtermembranen des Mukus-Chips ohne Mukusschicht

Die Permeation der Negativkontrolle FITC-Dextran, der Positivkontrolle Koffein, der freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175, BLC 5152), der liposomalen beladenen Formulierungen (LP-BLC 2175, LP-BLC 5152) und der mit mTHPC-beladenen Nanopartikel (PEG-mTHPC-PLGA, LP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) über die Membranen des Mukus-Chips ohne Mukus-Applikation wurde nach 3 h untersucht. Die eingesetzte Konzentration der Kontrollen betrug $100 \mu\text{mol/L}$ und die Konzentration der freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren $5 \mu\text{mol/L}$. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Die permeierte Substanzmenge nach 3 h ist in Prozent [%] angegeben. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. ($n = 3$, $k = 6$)

Für die Untersuchungen der Permeation der freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren über den Mukus-Chip wurde ein Versuchszeitraum von 3 h und eine Probenahme zu den Zeitpunkte 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min festgelegt. Daher wurde zusätzlich zur Endpunktkontrolle nach 3 h zu den einzelnen Messpunkten Zeitpunkten 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min Proben entnommen. Für die Negativkontrolle FITC-Dextran und Positivkontrolle Koffein sowie für die freien Photosensibilisatoren mTHPC, BLC 2175 und BLC 5152 konnte eine Permeation von 78,0 bis 82,5 % nach einer Versuchszeit von 30 min ermittelt werden (Abbildung 51). Die liposomalen Formulierungen (Liposomen biolitec®) LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152, die PLGA-Nanopartikel mit den Modifizierungen PEG und LrP-PEG (Nanopartikel WWU) PEG-mTHPC-PLGA und LrP-PEG-mTHPC-PLGA sowie die PLGA-Nanopartikel mit den Modifizierungen Carbopol® und Pluronic® F127 CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA zeigten Werte im Bereich von 80,2 bis 90,2 % nach 30 min (Abbildung 52). Danach erreichten die Werte ein Plateau bis zum Endpunkt von 3 h. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kontrollsubstanzen sowie die freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren bereits nach der Applikation über die Membranen des Mukus-Chips permeieren konnten. Des Weiteren konnte ermittelt werden, dass sich bereits nach einem Versuchszeitraum von 30 min 78,0 bis 90,2 % der apikal applizierten Substanzmengen im Akzeptormedium befanden. Nach 3 h betrug die Permeation in Abhängigkeit von der verwendeten Substanz zwischen 89,2 bis 97,1 %. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Permeation der verwendeten Kontrollsubstanzen sowie der freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren über die Membranen des Mukus-Chips möglich war.

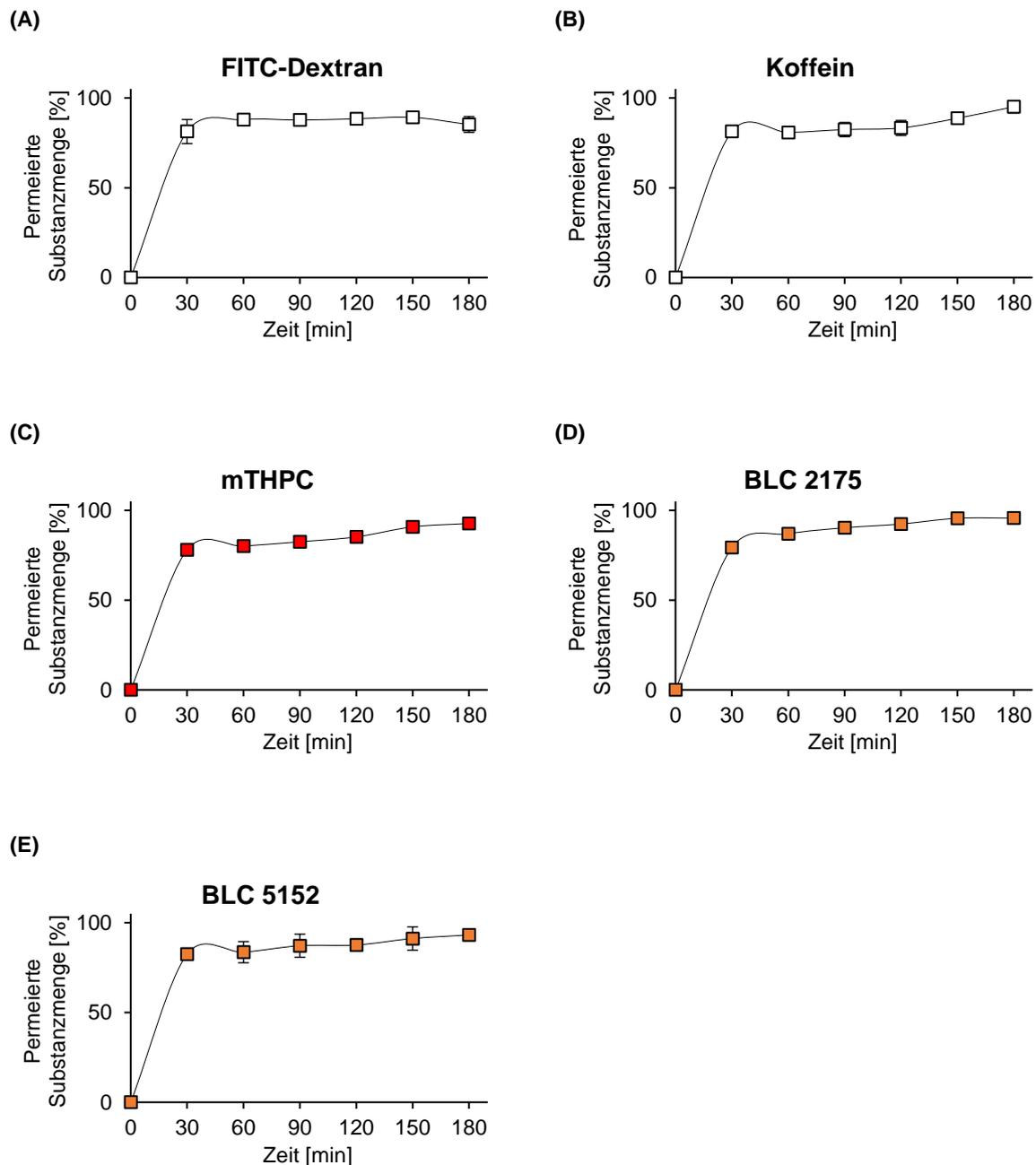


Abbildung 51: Bestimmung der Permeation der Kontrollsubstanzen und freien Photosensibilisatoren über die Membranen des Mukus-Chips ohne Mukusschicht

Die Kontrollsubstanzen (A) FITC-Dextran und (B) Koffein sowie die freien Photosensibilisatoren (C) mTHPC, (D) BLC 2175 und (E) BLC 5152 wurden apikal auf die Membranen des Mukus-Chips appliziert. Die eingesetzte Konzentration der Kontrollen betrug $100 \mu\text{mol} / \text{L}$ und die Konzentration der freien Photosensibilisatoren $5 \mu\text{mol} / \text{L}$. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Zu den Zeiten 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min wurden Proben aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und der Substanzgehalt mittels HPLC-Analyse gemessen. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert der permeierten Substanzmenge in % \pm Standardabweichung (s) dar. ($n = 3$, $k = 9$)

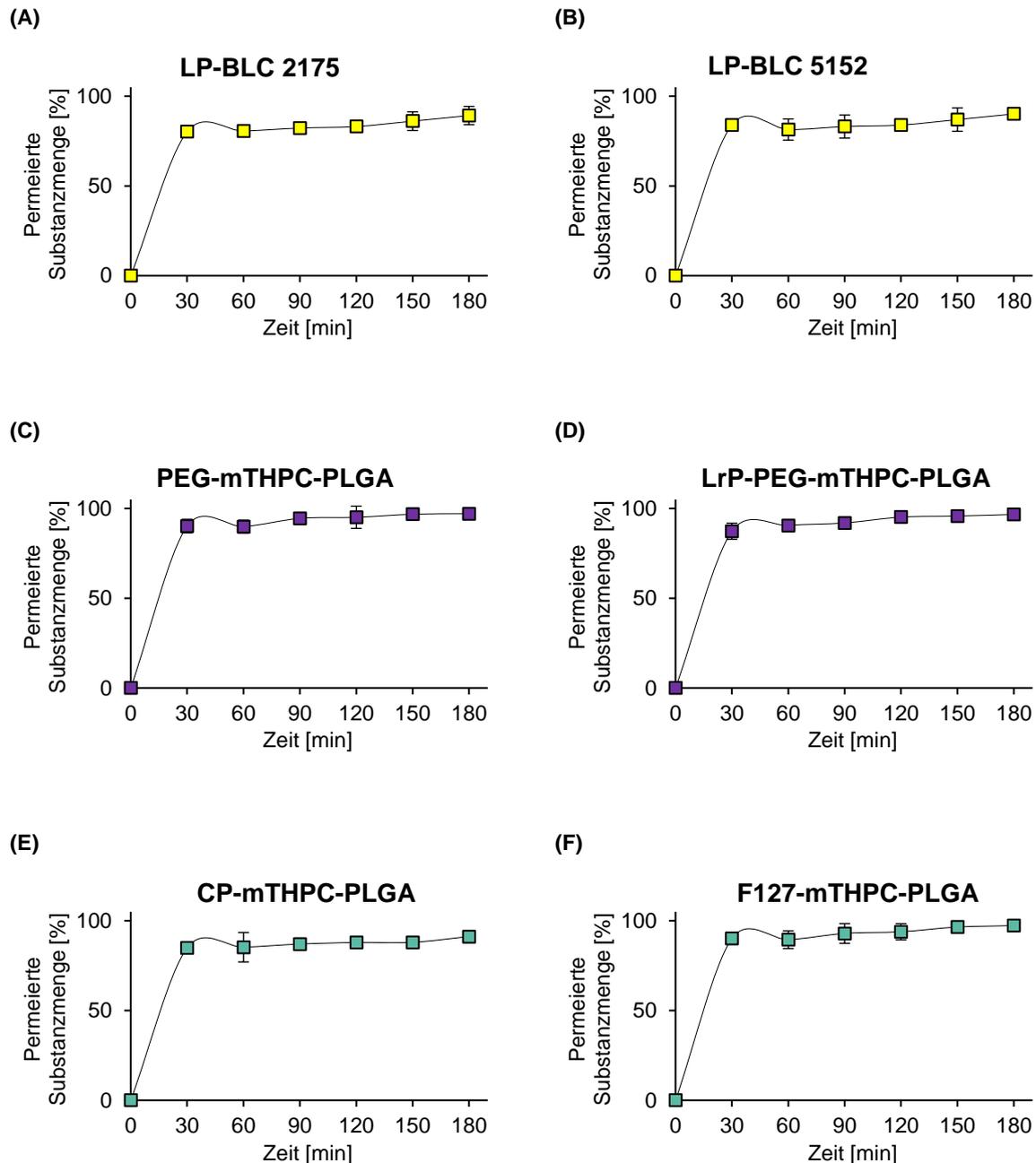


Abbildung 52: Permeationsuntersuchungen der nanopartikulären Formulierungen über die Membranen des Mukus-Chips ohne Mukusschicht

Die liposomalen Formulierungen A) LP-BLC 2175, (B) LP-BLC 5152, (C) PEG-mTHPC-PLGA, (D) LrP-PEG-mTHPC-PLGA, (E) CP-mTHPC-PLGA und (F) F127-mTHPC-PLGA wurden apikal auf die Membranen des Mukus-Chips appliziert. Die Konzentration der nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren betrug $5 \mu\text{mol} / \text{L}$. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Zu den Zeiten 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min wurden Proben aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und der Substanzgehalt mittels HPLC-Analyse gemessen. Die gezeigten Messwerte stellen den Mittelwert der permeierten Substanzmenge in % \pm Standardabweichung (s) dar. ($n = 3$, $k = 9$)

Rheologie der porcinen Mukusproben

Als Mukus-Modell wurde nativer porciner Mukus verwendet. Aufgrund der Herkunft sind die Mukusproben natürlichen Schwankungen unterlegen, die einen Einfluss auf die Beschaffenheit des Mukus haben. Als Kriterium zur Beurteilung von nativen Mukusproben wurde die Viskosität ausgewählt. Auf der Grundlage von rheologischen Messungen sollte die Viskosität von 24 nativen porcinen Mukusproben ausgewertet werden (Abbildung 53, A) [192]. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen zeigten eine Variabilität im Bereich von 4,17 bis 60,34 Pa·s mit einem Mittelwert von $36,23 \pm 13,10$ Pa·s. Zur Ermittlung eines Häufigkeitsbereiches wurden fünf Klassen mit den Werte-Bereichen 0-15, 15-30, 30-45, 45-60 und 60-75 gebildet (Abbildung 53, B). Dadurch konnte eine Häufigkeit der Viskositätsmesswerte der 24 porcine Mukusproben in einem Wertebereich von 30-45 Pa·s ermittelt werden. Um einen Einfluss der großen Schwankungen der Viskosität der nativen porcinen Mukusproben auf die Mukus-Permeabilität der freien und nanopartikelinkorporierten Photosensibilisatoren auszuschließen, wurden für die folgenden Versuche nur Mukusproben verwendet, die eine Viskosität im Bereich von 30-45 Pa·s aufwiesen.

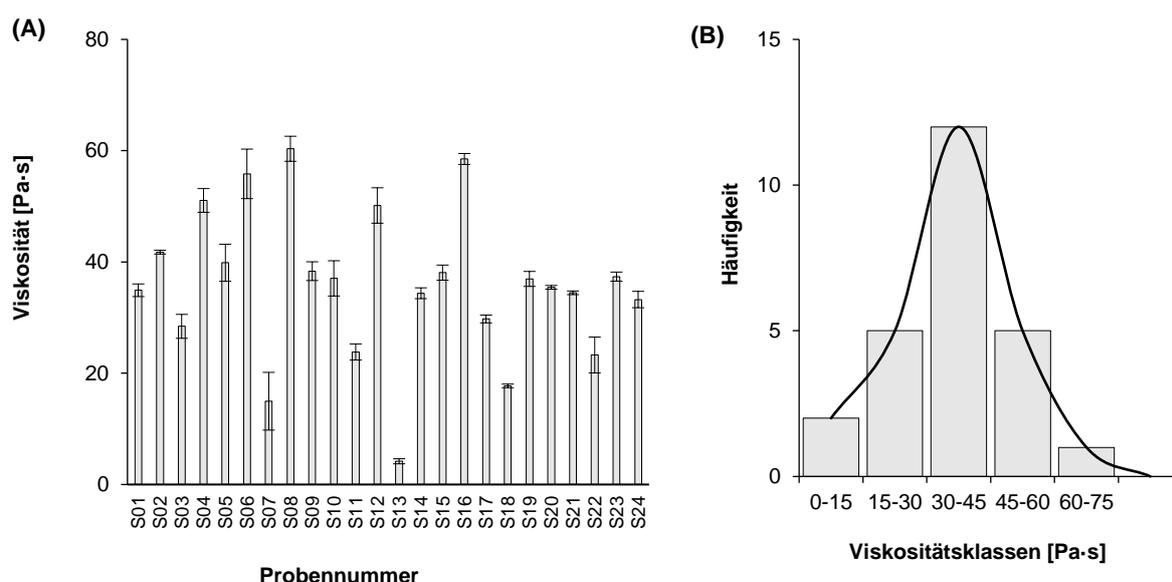


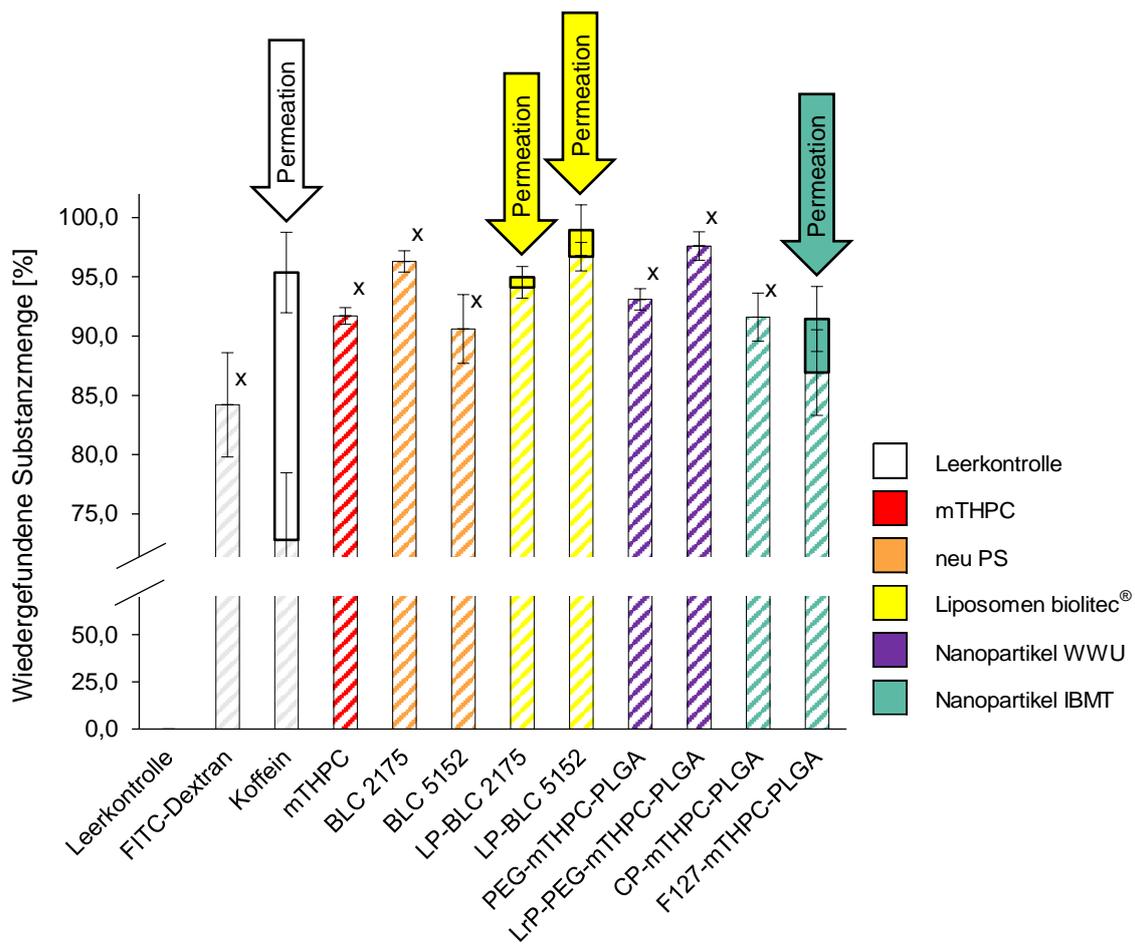
Abbildung 53: Viskositätsmessung der porcinen Mukusproben

(A) Die Viskosität der porcinen Mukusproben aus 24 verschiedenen Schweinen wurde mittels Rheometer gemessen und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. (B) Histogramm aus 72 einzelnen Messungen, die in insgesamt 24 Experimenten durchgeführt wurden. Dargestellt ist die Häufigkeit der Viskositätsverteilung mit fünf Viskositätsklassen (0-15; 15-30; 30-45; 45-60; 60-75). Die Viskosität wurde in Pascalsekunden [Pa·s] gemessen. (n = 24, k = 72) (Kopiert aus [192])

Untersuchung im Mukus-Chip mit Mukus-Applikation

Im nächsten Schritt wurde die Permeation der Kontrollsubstanzen Koffein und FITC-Dextran, der freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren über die Mukus-Barriere im Mukus-Chip untersucht. Es wurden vier unterschiedliche porcine Mukusproben verwendet und je zwei Messungen in zwei Chips damit durchgeführt. Zur Auswertung wurde die jeweilige Substanzmenge im Akzeptormedium und in der Mukusschicht ermittelt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung errechnet (Abbildung 54). Die Ergebnisse zeigten, dass die Kontrollsubstanz Koffein nach 3 h zu $22,6 \pm 3,4 \%$ über die Mukusschicht permeierte. Die „Liposomen biolitec[®]“ permeierten durchschnittlich zu $0,9 \pm 0,9 \%$ bei LP-BLC 2175 und $2,2 \pm 2,1 \%$ bei LP-BLC 5152. Ebenfalls konnte eine Permeation der „Nanopartikel IBMT“ mit der Bezeichnung F127-mTHPC-PLGA von $4,5 \pm 2,7 \%$ gemessen werden. Bei den Proben FITC-Dextran, den freien Photosensibilisatoren mTHPC, BLC 2175 und BLC 5152, den „Nanopartikel WWU“ PEG-mTHPC-PLGA und LrP-PEG-mTHPC-PLGA sowie den „Nanopartikel IBMT“ CP-mTHPC-PLGA konnte **keine Permeation** über die Mukusschicht detektiert werden.

Neben der Untersuchung des Akzeptormediums zur Ermittlung der permeierten Substanzmenge wurde der Substanzgehalt in der Mukusschicht vermessen. Ausgehend von der insgesamt applizierten Substanzmenge auf der apikalen Seite, die auf 100 % gesetzt wurde, konnte zudem eine Wiederfindungsrate durch Addition der detektierten Substanzmenge in der Mukusschicht und im Akzeptormedium rechnerisch ermittelt werden. Die Wiederfindungsrate sollte eine Beurteilung der Lokation der Kontrollsubstanzen und den freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren ermöglichen. Daraus ergab sich eine Wiederfindungsrate für die Kontrollsubstanzen FITC-Dextran von $84,2 \pm 4,4 \%$ und Koffein von $95,4 \pm 9,1 \%$ sowie für die freien Photosensibilisatoren mTHPC von $91,7 \pm 0,7\%$, BLC 2175 von $96,3 \pm 0,9 \%$ und BLC 5152 von $90,6 \pm 2,9 \%$. Die „Liposomen biolitec[®]“ zeigten bei LP-BLC 2175 eine Wiederfindungsrate von $95,0 \pm 1,8 \%$ und bei LP-BLC 5152 von $98,9 \pm 3,3\%$. Für die „Nanopartikel WWU“ wurden bei PEG-mTHPC-PLGA $93,1 \pm 0,9 \%$ und bei LrP-PEG—mTHPC-PLGA $97,6 \pm 1,2 \%$ der applizierten Substanzmenge wiedergefunden. Bei den „Nanopartikeln IBMT“ lagen diese Werte bei $91,6 \pm 2,0 \%$ für CP-mTHPC-PLGA und bei $91,4 \pm 6,4 \%$ für F127-mTHPC-PLGA. Vergleicht man diese Werte mit der Wiederfindungsrate aus den Leermessungen (Abbildung 50), die ohne eine Mukusschicht durchgeführt wurden, war die Wiederfindungsrate mit Mukusschicht verringert.



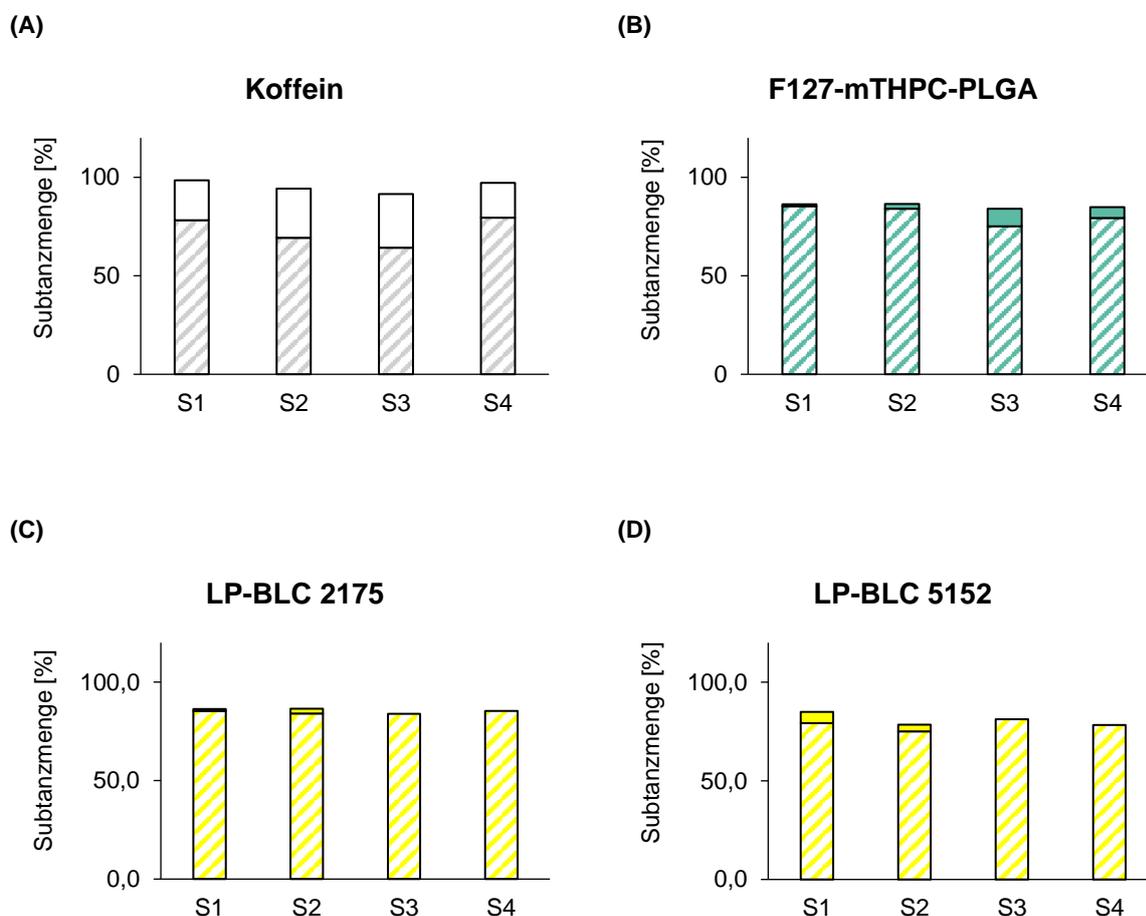
■ Farbliche Füllung steht für das Akzeptormedium, ▨ Gestreifte Füllung steht für die Mukusschicht

Abbildung 54: Darstellung der prozentualen Substanzmenge in der Mukusschicht und im Akzeptormedium des Mukus-Chips

Nach der dreistündigen Inkubation mit der Negativkontrolle FITC-Dextran und Positivkontrolle Koffein, den freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175 und BLC-5152) und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren (PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) im Mukus-Chip wurde der Substanzgehalt in der Mukusschicht und im Akzeptormedium detektiert und aufsummiert. Die eingesetzte Konzentration der Kontrollen betrug 100 µmol / L und die Konzentration der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren 5 µmol / L. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. x: nicht im Akzeptormedium detektierbar (n = 4, k = 8)

Zur Untersuchung der Permeation der Kontrollsubstanzen und von freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden vier voneinander unabhängige native porcine Mukusproben verwendet. Betrachtet man die über die Mukusschicht permeierten Positivkontrolle Koffein, LP-BLC 2175, LP-BLC 5152 und F127-mTHPC-PLGA, ergaben sich in Abhängigkeit von den 4 untersuchten porcinen Mukusproben (S1-S4) unterschiedliche Resultate (Abbildung 55). So permeiert Koffein und die mit mTHPC beladene nanopartikel-inkorporierte Formulierung F127-mTHPC-PLGA bei allen vier Mukusproben. Wohingegen die liposomalen Formulierungen mit den Photosensibilisatoren BLC 2175 und 5152 nur bei den Mukusproben S1 und S2 permeierten. Daraus wurde geschlossen, dass die Permeation von Substanzen

und nanopartikulären Formulierungen von der für die Untersuchung verwendeten porcinen Mukusprobe abhängig war.



■ Farbliche Füllung steht für das Akzeptormedium, ▨ Gestreifte Füllung steht für die Mukusschicht

Abbildung 55: Quantifizierung der Substanzmenge bezogen auf die vier einzelnen porcinen Mukusproben in der Mukusschicht und im Akzeptormedium des Mukus-Chips

Die Substanzen und Nanopartikel wurden im Mukus-Chip für 3 h inkubiert. Hierbei wurden 4 verschiedene porcine Mukusproben verwendet (S1-S4). Nach der Inkubation wurde die Substanzmenge in der Mukusschicht und im Akzeptormedium mittels HPLC detektiert. Die Diagramme zeigen (A) die Positivkontrolle Koffein, (B) die nanopartikuläre Formulierung des Photosensibilisators mTHPC F127-mTHPC-PLGA, (C) die liposomalen Formulierungen der neu synthetisierten Photosensibilisatoren LP-BLC 2175 und (D) LP-BLC 5152. Die eingesetzte Konzentration der Positivkontrolle betrug $100 \mu\text{mol/L}$ und die Konzentration der nanopartikulären und liposomalen Photosensibilisatoren $5 \mu\text{mol/L}$. Jeder Messwert ist als Mittelwert aus zwei einzelnen voneinander unabhängigen Messungen dargestellt. ($n = 4$, $k = 8$)

Bei den Mukus-Chip-Studien wurde während des Versuchszeitraums von 3 h alle 30 min eine Probe aus dem Akzeptormedium entnommen. Dies ermöglichte eine Kalkulation der permeierten Substanzmenge zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchszeitraums (Abbildung 56). Die Ergebnisse zeigten, dass Koffein proportional zur Zeit über die Mukusbarriere permeierte. Ab einer Zeit von 120 min war eine detektierbare Substanzmenge der „Nanopartikel IBMT“ F127-mTHPC-PLGA im Akzeptormedium vorhanden. Die Photosensibilisatoren der „Liposomen biolitec®“ LP-BLC 2175 und 5152 waren ab dem Versuchszeitpunkt von 150 min im Akzeptormedium nachweisbar. Die Ergebnisse aus den Mukus-Chip-Studien zeigten, dass Koffein als positive Kontrollsubstanz und die nanopartikulären Formulierungen F127-mTHPC-PLGA, LP-BLS 2175 und LP-BLC 5152 in der Lage waren über die Mukusschicht des Mukus-Chip-Systems zu permeieren.

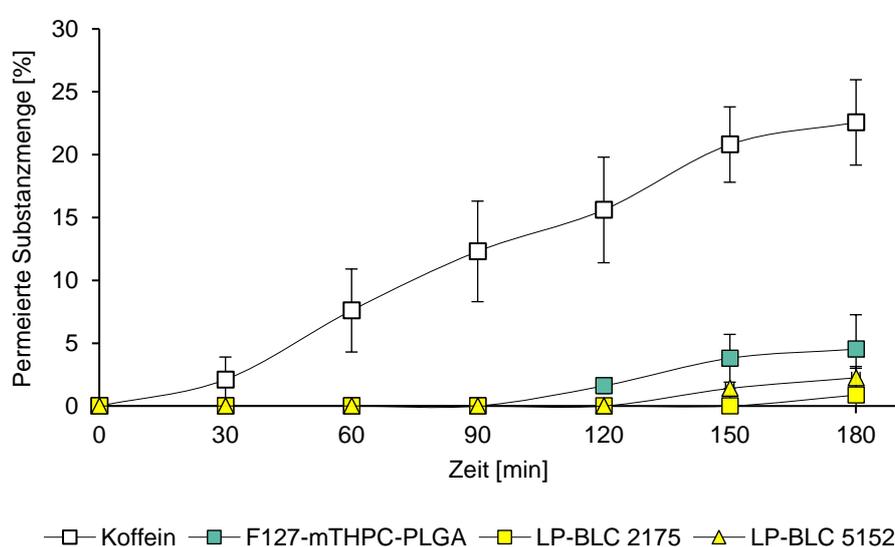


Abbildung 56: Permeierte Substanzmenge im Akzeptormedium des Mukus-Chips dargestellt gegen die Zeit

Das Diagramm zeigt die Substanzmenge in Prozent [%] der Positivkontrolle Koffein, F127-mTHPC-PLGA, LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152, die über den Versuchszeitraum von 180 min alle 30 min mittels HPLC-Messung ermittelt wurden. Die eingesetzte Konzentration der Positivkontrolle betrug $100 \mu\text{mol/L}$ und die Konzentration der nanopartikulären und liposomalen Photosensibilisatoren $5 \mu\text{mol/L}$. Als Mukusbarriere wurde nativer porciner Mukus verwendet (S1-S4). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. ($n = 4$, $k = 8$)

4.4.2 Mikrofluidisches Darmtumor-Modell

Die Entwicklung neuer Medikamente erfordert eine umfangreiche Überprüfung der potenziell neuen Arzneistoffe und deren Formulierungen. Neben der nachgewiesenen Wirksamkeit eines Arzneistoffes spielt die Formulierung eine ausschlaggebende Rolle für den Transport und die Freisetzung des Arzneistoffes am Wirkort. Zur Untersuchung der Eigenschaften von Formulierungen werden Transport- und Wirkort-Abhängige In-vitro-Testsysteme benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurden nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme eingesetzt, um den Transport und die Wirkstofffreisetzung von Photosensibilisatoren zu verbessern. Der zu behandelnde Dünndarmtumor befindet sich im Darmlumen und ist zu diesem durch eine Mukusschicht abgegrenzt. Somit muss der Photosensibilisator zunächst die Mukusschicht überwinden, bevor er das Tumorgewebe erreicht. Die Verwendung von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen ermöglichen zum einen den Photosensibilisator durch Inkorporation in die partikuläre Hülle zu schützen und zum anderen kann die Oberfläche modifiziert werden, um das Tumor-Targeting zu erhöhen. Im Fokus standen hierbei mukoadhärierende und mukopermeierende Modifizierungen. Um diese Eigenschaften in einem dynamischen System zu untersuchen, wurde das **mikrofluidische Darm-Tumor-Modell** entwickelt. Das Modellsystem war aufgebaut aus einem PDMS Chip-Modul, durch das mittels eines Schlauchsystems und einer Peristaltik-Pumpe Flüssigkeit transportiert wird (Abbildung 57, A). Dabei reflektiert der Kanal des Chip-Moduls das Darmlumen, in dem sich der Darmtumor befindet.

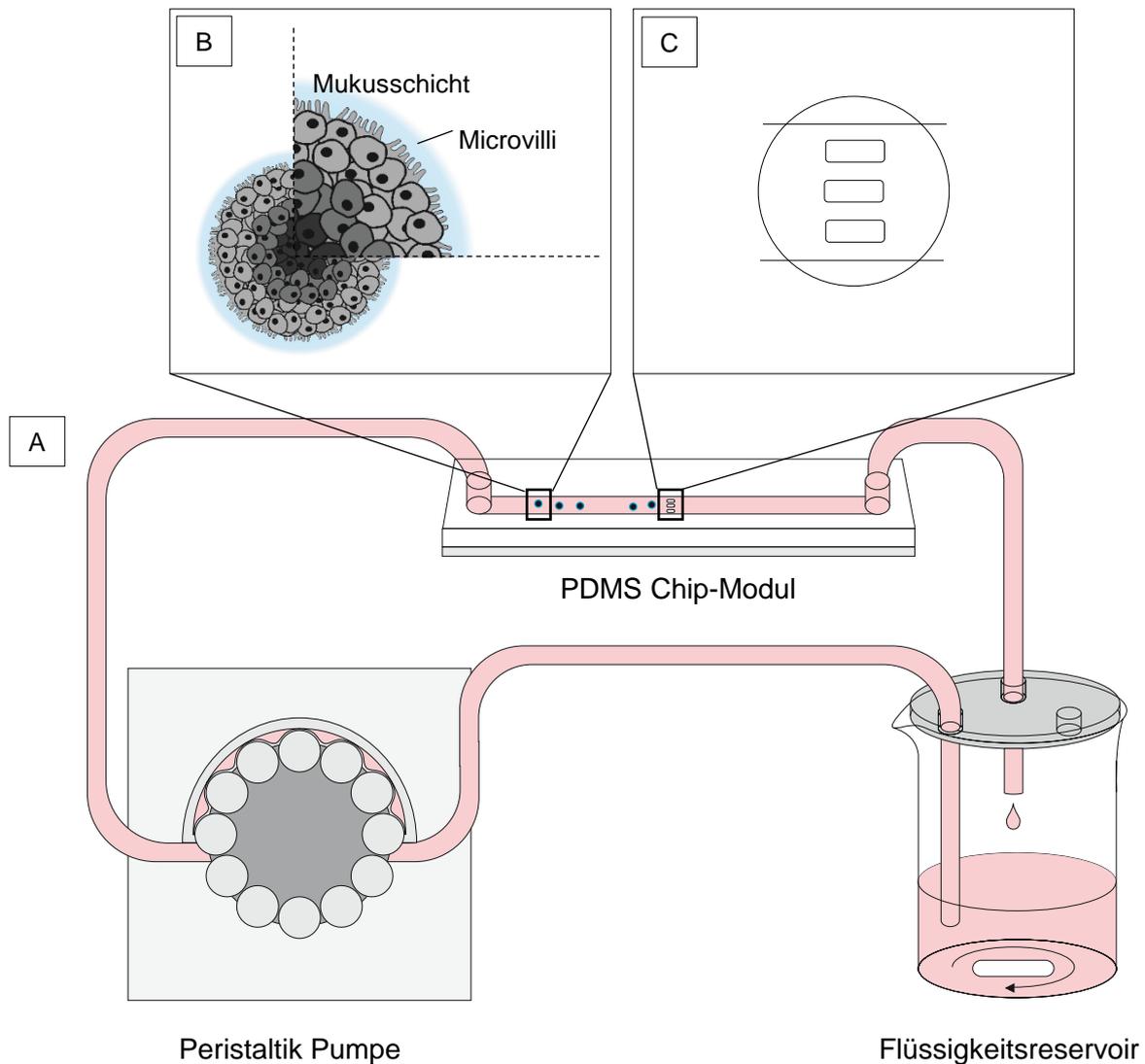


Abbildung 57: Schematische Zeichnung des mikrofluidischen Darm-Tumor-Modells

(A) Die Peristaltik-Pumpe zirkuliert das Medium aus dem Reservoir durch das PDMS Chip-Modul. (B) Der 3D-Tumorsphäroid wird in das PDMS Chip-Modul eingebracht. (C) Um eine Zirkulation der 3D-Tumorsphäroide zu verhindern, wurde ein Gitter in den Fluidikkanal integriert.

Als Darmtumormodell wurde ein 3D-Tumorsphäroid verwendet, der aus der Zelllinie HT29-MTX-E12 generiert wurde. Dieser wurde in den Fluidik-Kanal des Chip-Moduls eingebracht, wo ein integriertes Gitter die Zirkulation der 3D-Tumorsphäroide im System verhinderte (Abbildung 57, B und C).

Die Voraussetzung für die Entwicklung eines geeigneten Darmtumormodells war die Simulation der Charakteristika eines Darmtumors. Hierbei standen die Mukusschicht und die Oberflächenstruktur im Vordergrund, da diese einen Einfluss auf die Adhäsion und Permeation der Nanopartikel haben können. Zur Charakterisierung des entwickelten Darmtumormodells wurde eine Lebend-Tod-Färbung, eine histologische Untersuchung und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Die Lebend-Tod-Färbung wurde durch eine gleichzeitige Fluoreszenzfärbung von vitalen Zellen und toten Zellen durchgeführt. Dadurch

wurde sichtbar, dass der 3D-Tumorsphäroid aus einer vitalen äußeren Zellschicht bestand und einen nekrotischen Kern aufwies (Abbildung 58, A). Die histologisch angefertigten Schnitte wurden mit den Färbelösungen Kernecht-Rot für die Färbung des Zellkerns und **Alcian-Blau für die Färbung der sauren Mukosubstanzen** gefärbt (Abbildung 58, B). Es war eine deutliche Mukusschicht durch eine hellblaue Färbung auf der Oberfläche zu erkennen. Zusätzlich konnte die Oberfläche der 3D-Tumorsphäroide durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dargestellt werden (Abbildung 58, C). Diese zeigten, dass der 3D-Tumorsphäroide eine runde Form aufwies und sich auf der Oberfläche Mikrovilli entwickelt hatten.

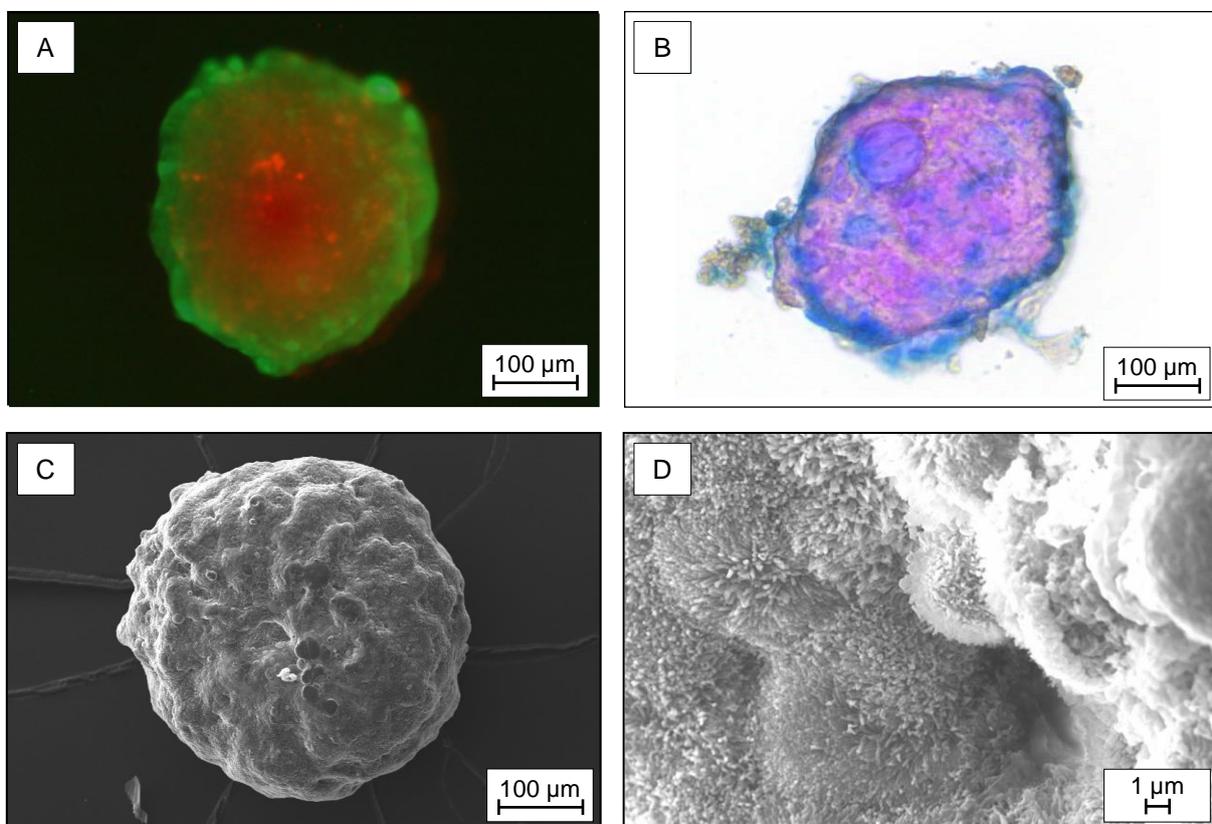


Abbildung 58: Charakterisierung des 3D-Tumorsphäroid-Modells der Zelllinie HT29-MTX-E12

Charakterisierung der 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12. A) Lebend-Tot-Färbung: Gleichzeitige Fluoreszenz-Färbung von vitalen Zellen (Calcein-AM, Grün) und toten Zellen (Propidium Iodid (PI), Rot). B) Histologische Färbung eines Tumorsphäroids: Kernecht-Rot für die Färbung des Zellkerns und Alcian-Blau für die Färbung der sauren Mukosubstanzen. C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 3D-Tumorsphäroids D) Darstellung der Mikrovilli auf der Oberfläche mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahme.

Für die Durchführung der Versuche wurden fünf Tumorsphäroide parallel unter statischen Bedingungen und im mikrofluidischen Darm-Tumor-Modell unter dynamischen Bedingungen für 3 h inkubiert. In beiden Fällen wurde als Umgebungsflüssigkeit das HT29-MTX-E12 spezifische Zellkulturmedium verwendet. Bei den statischen Untersuchungen, die in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wurden, wurden die Probenlösungen direkt in die Wells pipettiert. Die Applikation der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren erfolgte im dynamischen System durch die Zugabe der Probenlösung in das Flüssigkeitsreservoir mit einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$.

Zunächst wurde untersucht, ob die dynamischen Bedingungen im Darmtumor-Modell einen Einfluss auf die Vitalität der HT29-MTX-E12 3D-Tumorsphäroide hatten. In standardisierten Zellkultursystemen findet meist eine statische Kultivierung der Tumorsphäroide statt. Im mikrofluidischen Darmtumor-Modell wurden die Untersuchungen unter dynamischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde mit einer Pumpe die Flüssigkeit in peristaltischen Bewegungen durch das Chip-System gepumpt. Um den Einfluss der dynamischen Strömung auf die Tumorsphäroide zu untersuchen, wurde ein Zellviabilitäts-Test nach einer Inkubationszeit von 3 h durchgeführt (Abbildung 59). Zudem wurde bei beiden Systemen eine unbehandelte Zellkontrolle mitgeführt. Gleichzeitig konnte durch die Zugabe der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren der dunkeltoxische Effekt im Darmtumor-Modell untersucht werden. Die Ergebnisse der Messung zeigten keine signifikanten Unterschiede der Zellviabilität zwischen der statischen und dynamischen Inkubation. Auch konnte auf Grundlage der gemessenen Zellviabilität ein dunkeltoxischer Effekt ausgeschlossen werden. Daraus wurde geschlossen, dass die dynamische Inkubation in einem Zeitraum von 3 h keinen Einfluss auf die Zellviabilität der Tumorsphäroide hatte.

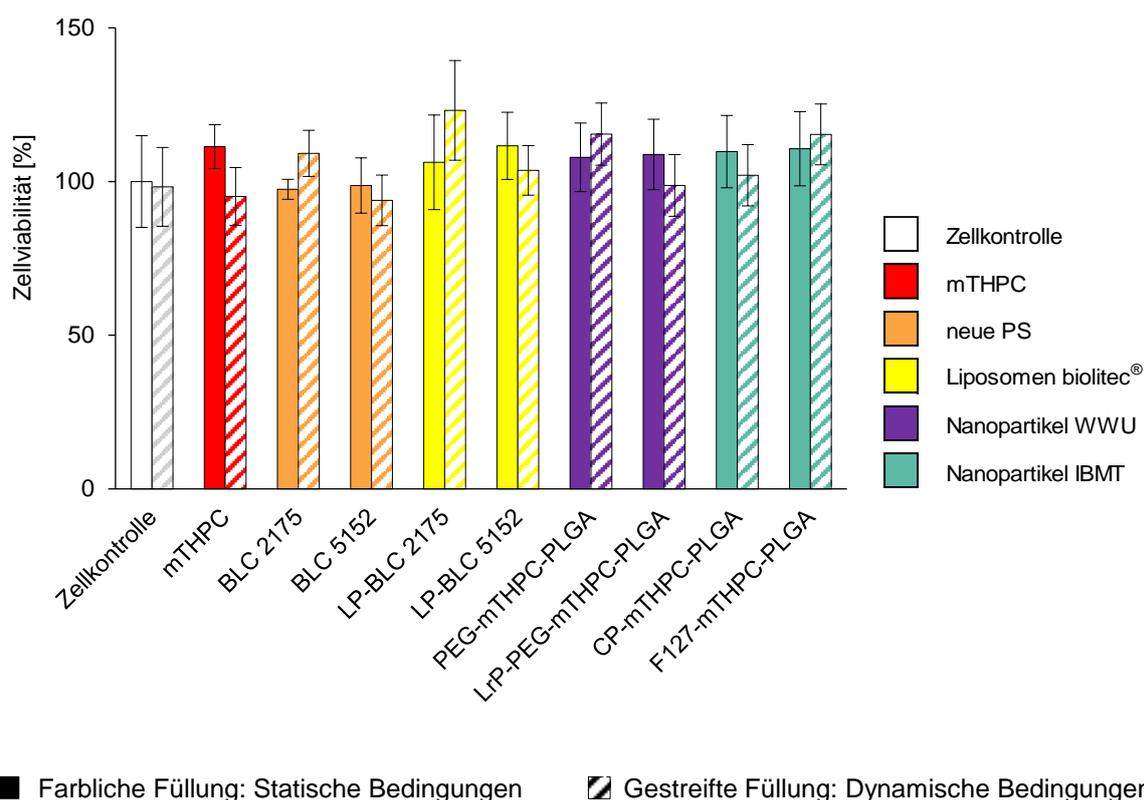
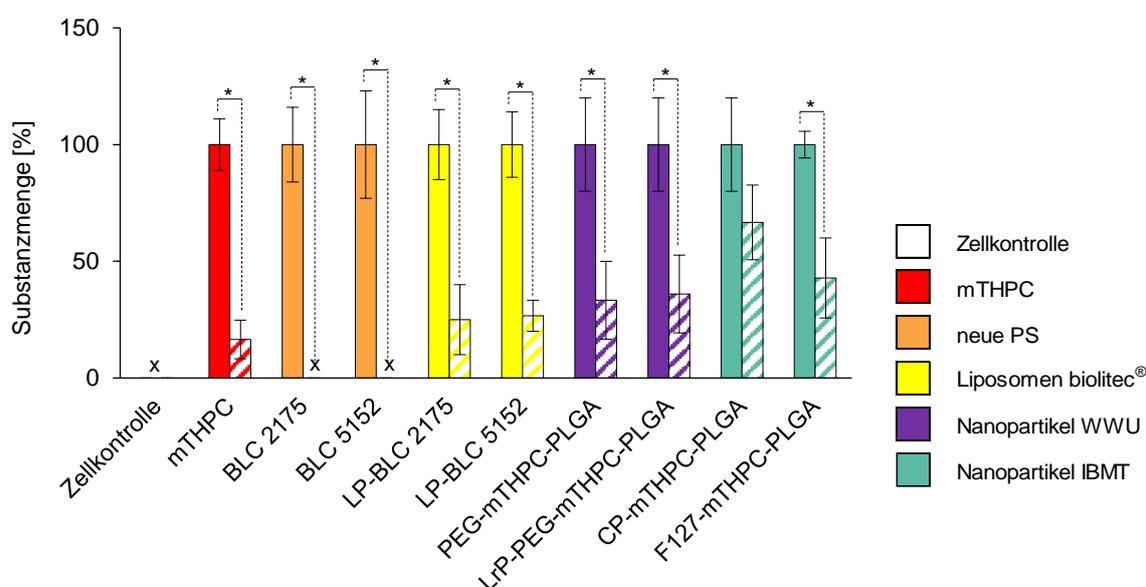


Abbildung 59: Messung der Zellviabilität unter statischen und dynamischen Bedingungen

Untersuchung des Einflusses der statischen und dynamischen Bedingungen auf die Zellviabilität der HT29-MTX-E12 3D-Tumorsphäroide nach 3 Stunden Inkubationszeit. Inkubiert wurden die freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175 und BLC-5152), liposomalen Formulierungen (LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152) und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren (PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (n = 3; k = 15)

Im nächsten Schritt wurden Untersuchungen zur Fähigkeit der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren in einem dynamischen System an die Mukusschicht eines Darmtumors zu adhären durchgeführt. Zur Quantifizierung der adhären Menge des Photosensibilisators, wurden jeweils fünf Tumorsphäroide unter **statischen** und **dynamischen Bedingungen** für 3 h mit den freien Photosensibilisatoren mTHPC, BLC 2175 und BLC 5152, den liposomalen Formulierungen LP-BLC 2175 LP-BLC 5152 und den nanopartikulären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden sie lysiert, der Photosensibilisator aufgereinigt und mittels HPLC-Analyse detektiert. Zur Auswertung wurde zunächst die adsorbierte Menge der freien, liposomalen und nanopartikulären Formulierungen der statisch inkubierten Tumorsphäroide den Messwerten der dynamisch inkubierten Tumorsphäroide gegenübergestellt. Hierzu wurde die unter statischen Bedingungen detektierte Substanzmenge auf 100 % normiert und die Substanzmenge der dynamisch inkubierten Tumorsphäroide dagegen im Vergleich gesetzt (Abbildung 60). Die freien Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 konnten unter dynamischen

Bedingungen nicht an den Tumorsphäroid adsorbieren. Die liposomale Formulierung dieser führte allerdings auch zu einer messbaren Adsorption, die im Vergleich zur statischen Inkubation $25 \pm 15 \%$ des LP-BLC 2175 und $27 \pm 7 \%$ des LP-BLC 5152 betrug. Auch die nanopartikulären Formulierungen des Photosensibilisators mTHPC zeigten eine Adsorption von $33 \pm 17 \%$ bei PEG-mTHPC-PLGA, $36 \pm 7 \%$ bei LrP-PEG-mTHPC-PLGA, $67 \pm 16 \%$ bei CP-mTHPC-PLGA und $43 \pm 17 \%$ bei F127-mTHPC-PLGA im Vergleich zum freien Photosensibilisator im dynamischen System. Daraus ließ sich insgesamt ableiten, dass die Adsorption im dynamischen Modell deutlich verringert war und zwischen 0% bis 67% betrug. Die verringerte Adsorption im dynamischen System war gegenüber dem statischen System signifikant. Lediglich die Nanopartikel mit der Bezeichnung CP-mTHPC-PLGA wiesen keine signifikant unterschiedliche Adsorption auf. Dieses Ergebnis zeigte, dass die mit Carbopol® modifizierten Nanopartikel CP-mTHPC-PLGA als einzige nanopartikuläre Formulierung im dynamischen System eine vergleichbar hohe Adsorption wie im statischen System erreichten.



■ Farbliche Füllung: Statische Bedingungen ▨ Gestreifte Füllung: Dynamische Bedingungen

Abbildung 60: Darstellung der prozentualen Substanzmenge im statischen und dynamischen System

Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12 wurden im statischen und dynamischen Darmtumor-Modell für 3 h mit den freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175 und BLC-5152), liposomalen Formulierungen (LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152) und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren (PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) mit einer Konzentration von $5 \mu\text{mol/L}$ inkubiert. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Danach wurden jeweils fünf Tumorsphäroide aufgereinigt und die Menge des Photosensibilisators mittels HPLC analysiert. Die Substanzmengen sind prozentual aufgetragen. Ausgehend von der statischen Inkubation (100%) wurde die Substanzmenge der dynamischen Inkubation im Verhältnis berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der statischen Inkubation gegenüber der dynamischen Inkubation nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5% . x: keine Substanz detektierbar ($n = 4$; $k = 20$)

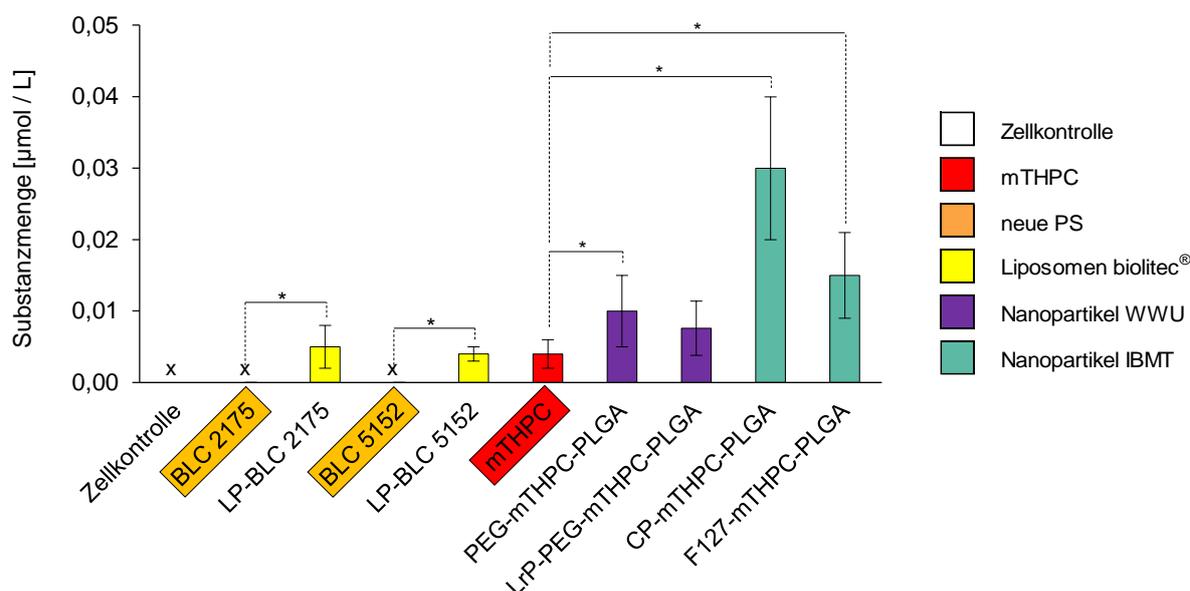


Abbildung 61: Quantifizierung der Menge der freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren im dynamischen Darmtumor-Modell

Die 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12 wurden im dynamischen Darmtumor-Modell für 3 h mit den freien Photosensibilisatoren (mTHPC, BLC 2175 und BLC-5152), liposomalen Formulierungen (LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152) und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren (PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA) mit einer Konzentration von 5 µmol / L inkubiert. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Anschließend wurden jeweils fünf Tumorsphäroide aufgereinigt und die Menge des Photosensibilisators mittels HPLC analysiert. Die gemessenen Substanzmengen sind als Mittelwerte in µmol / L ± Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung zwischen den freien Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 und den liposomalen Formulierungen bzw. dem freien Photosensibilisator mTHPC und den nanopartikelären Formulierungen bzw. nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. x: keine Substanz detektierbar (n = 4; k = 20)

Eine weitere Fragestellung des Experiments war, ob die Adsorption des Photosensibilisators durch die Inkorporation in die liposomalen oder nanopartikeläre Formulierungen verbessert werden konnte. Hierzu wurden die Messwerte der freien Photosensibilisatoren BLC 2175 mit den Liposomen LP-BLC 2175 bzw. BLC 5152 mit den Liposomen BLC 5152 und der freie Photosensibilisator mTHPC mit den nanopartikelären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA verglichen (Abbildung 61). Die freien Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 konnten unter dynamischen Bedingungen nicht an den Tumorsphäroid adsorbieren. Die liposomale Formulierung dieser führte allerdings auch zu einer detektierbaren Adsorption, die im Vergleich zu den freien BLC 2175 und BLC 5152 signifikant war. Auch die nanopartikelären Formulierungen des Photosensibilisators mTHPC mit den Bezeichnungen PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA zeigten eine signifikant, 2- bis 7,5-fach, erhöhte Adsorption im Vergleich zum freien Photosensibilisator mTHPC. Insgesamt zeigten

die Ergebnisse, dass die Inkorporation der Photosensibilisatoren in die nanopartikulären Formulierungen eine verbesserte Adsorption im dynamischen Darmtumor-Modell aufwies. Die Menge des adsorbierten Photosensibilisators mTHPC war bei der nanopartikulären Formulierung CP-mTHPC-PLGA mit $0,030 \pm 0,010 \mu\text{mol} / \text{L}$ am höchsten. Diese Nanopartikel wurden mit Carbopol® oberflächenmodifiziert, was zu einer erhöhten Mukoadsorption führen sollte. Die im Darmtumor-Modell verwendeten 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12 haben nachweislich eine Mukusschicht an der Oberfläche. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte daraus geschlossen werden, dass die Oberflächenmodifizierung mit der mukoadhäsiven Substanz Carbopol® zu einer verbesserten Adsorption und damit Aufnahme des Photosensibilisators in den 3D-Tumorsphäroid führte.

Zusätzlich wurden die Tumorsphäroide, die mit dem freien Photosensibilisator mTHPC und den nanopartikulären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA inkubiert wurden, aus dem jeweiligen System entnommen und zur optischen Kontrolle mittels mikroskopischer Aufnahmen untersucht (Abbildung 62). Diese Aufnahmen erlauben eine optische Beurteilung des adhären Photosensibilisators mTHPC aufgrund der guten fluoreszierenden Eigenschaften. Es wurden Hellfeld- und Fluoreszenzbilder angefertigt, die zusätzlich in Binär-Bilder umgewandelt wurden. Dabei wurden die Pixel der Fluoreszenzaufnahme in schwarz und weiß dargestellt. Dies ermöglichte eine Beurteilung der Fluoreszenz unabhängig von deren Intensität und konnte zur Unterstützung der Auswertung genutzt werden. Der freie Photosensibilisator mTHPC und die nanopartikulären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA und LrP-PEG-mTHPC-PLGA zeigten eine deutliche Fluoreszenz unter statischen Bedingungen, wohingegen unter dynamischen Bedingungen keine Fluoreszenz detektiert werden konnte. Die nanopartikulären Formulierungen CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA zeigten sowohl nach der Inkubation unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen eine deutliche Fluoreszenz. Durch die optische Kontrolle konnten die Ergebnisse der Quantifizierung der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren bestätigt werden, da auch hier die Quantifizierung der aufgenommenen Wirkstoffmenge durch die nanopartikulären Formulierungen CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA am höchsten war.

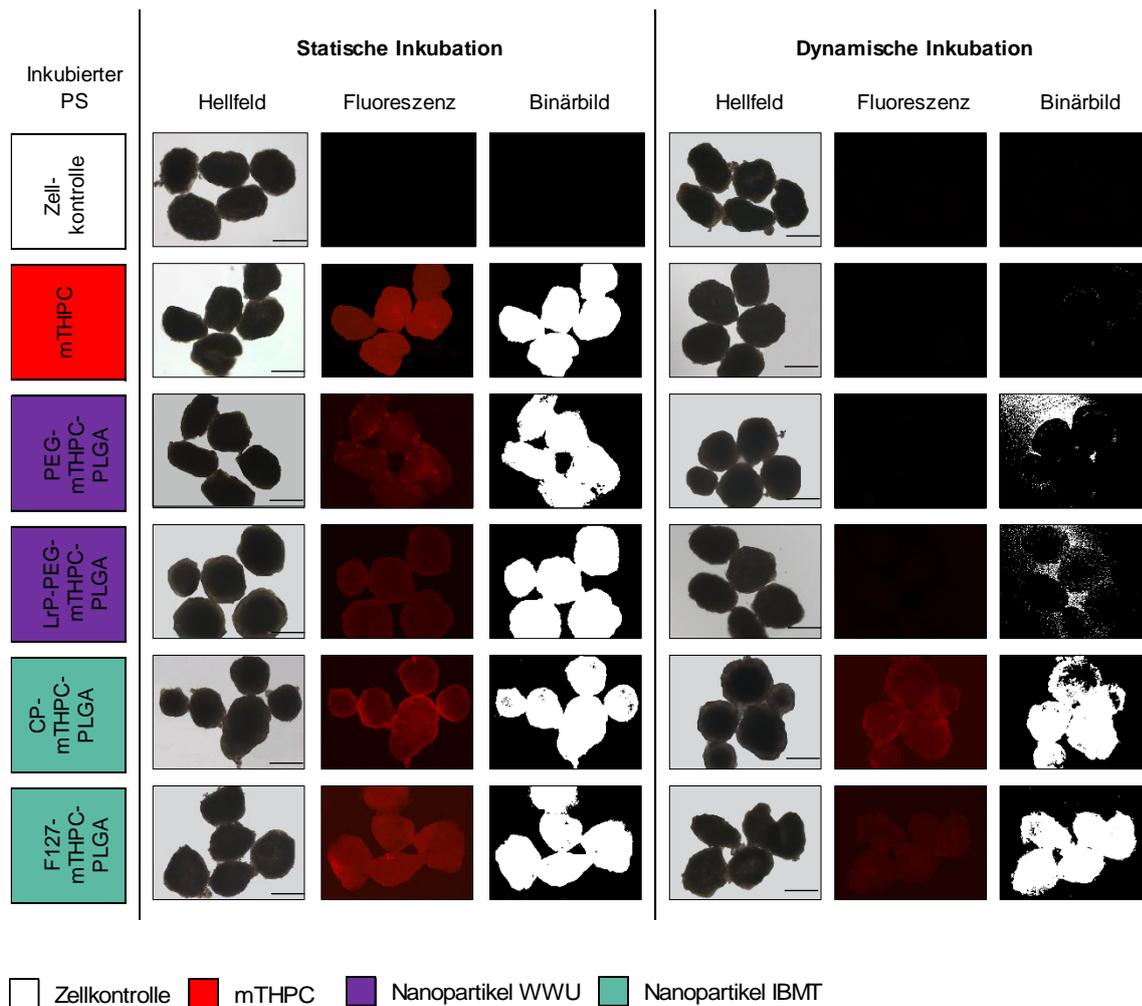


Abbildung 62: Mikroskopische Aufnahmen der statischen und dynamischen Inkubation der 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12 nach der statischen und dynamischen Inkubation mit dem freien Photosensibilisator mTHPC und den nanopartikulären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA unter Hellfeld- und Fluoreszenz-Betrachtung (Extinktions-Wellenlänge 555 nm und Emissions-Wellenlänge 602 nm). Die Konzentration der Photosensibilisatoren betrug 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Zudem wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Zusätzlich wurde ein Binärbild generiert, in dem die roten Pixel der Fluoreszenz-Aufnahmen weiß dargestellt werden. Der Messbalken entspricht 500 μm .

4.4.3 Vaskularisiertes Tumorsphäroid-Modell

Bei der Entwicklung eines Tumors im menschlichen Körper kommt es zu einer Gefäßneubildung (Neovaskularisierung). Dabei wachsen Blutgefäße von außen in das Tumorgewebe ein, wodurch eine Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff ermöglicht wird. Um diesen Zustand nachzubilden, wurde ein vaskularisiertes Tumorsphäroid-Modell unter Verwendung des Hühnerei-Tests an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM, engl. Hen's egg test on chorioallantoic membrane) in Kombination mit 3D-Tumorsphäroiden der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 entwickelt und etabliert. Die CAM eines bebrüteten Hühnereis ist eine stark vaskularisierte Membran, die nach Applikation von Zellen oder Sphäroiden eine Angiogenese dieser ermöglicht. Der so entstehende vaskularisierte Tumorsphäroid konnte verwendet werden, um die In-vivo-Situation eines Tumors im Darm zu simulieren. Das Testsystem wurde genutzt, um den biologischen Effekt und die Akkumulation der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren zu untersuchen. Zunächst wurde hierzu das Öffnen des Eies, die Applikation der Tumorsphäroide sowie der Versuchszeitraum etabliert (Abbildung 63). Das Ei wurde an Tag 5 der Bebrütung geöffnet, wodurch die CAM zugänglich gemacht werden konnte. Die Applikation der Tumorsphäroide erfolgte an Tag 6. Dabei wurden fünf Tumorsphäroide direkt auf die CAM appliziert, was eine Angiogenese und die Verschmelzung der Tumorsphäroide auslöste. Tag 12 bis Tag 17 wurde als Versuchszeitraum festgelegt. Spätestens am 17-ten Entwicklungstag wurde der Versuch beendet.

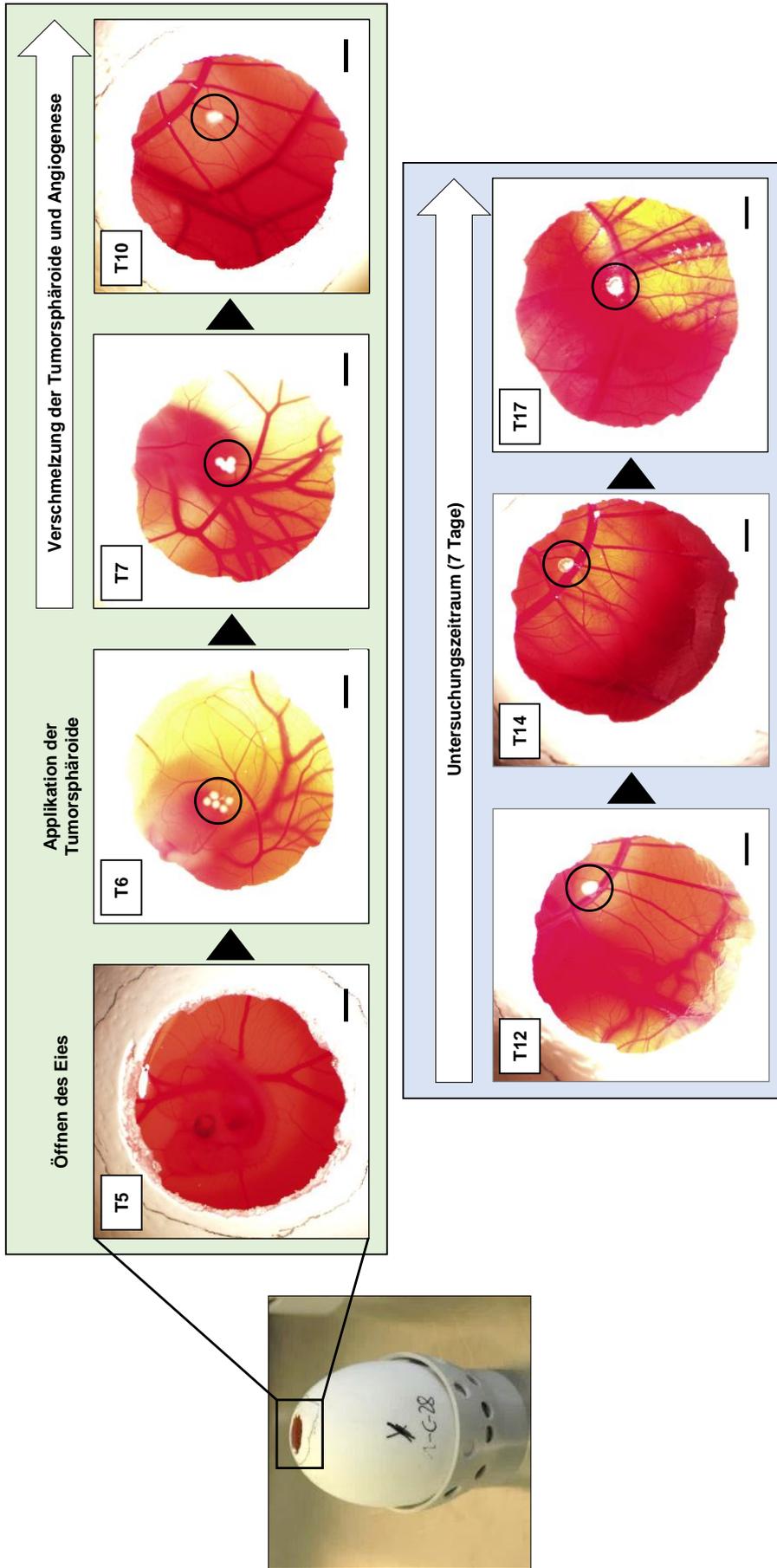


Abbildung 63: Etablierung des HET-CAM-Tumorsphäroid-Modells

Dargestellt sind die verschiedenen Stufen des HET-CAM-Tumorsphäroid-Modells am Beispiel von Tumorsphäroiden, die aus der Zelllinie HuTu-80 generiert wurden. An Tag 5 (T5) wird das Ei geöffnet und an Tag 6 (T6) erfolgt die Applikation der Tumorsphäroide. Die Verschmelzung und Vaskularisierung der einzelnen Tumorsphäroide erfolgt im Zeitraum zwischen Tag 7 – 10 (T7 – T10). Der anschließende Untersuchungszeitraum beträgt 7 Tage (T12 – T17). An Tag 17 (T17) endet der Versuchszeitraum. Der Messbalken entspricht 2 mm.

Zur Visualisierung der Tumorsphäroid-Vaskularisierung wurden hellfeld- und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines vaskularisierten HuTu-80 Tumorsphäroids an Tag 17 angefertigt (Abbildung 64). Die In-ovo-Hellfeldaufnahme zeigten einen weißen Tumorsphäroid, der von großen und kleinen Blutgefäßen netzartig umschlossen war und einen Durchmesser von ca. 4 mm hatte (Abbildung 64, A). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der CAM machten die starke Vaskularisierung deutlich sichtbar. Zu sehen war ein großes Blutgefäß, aus dem mehrere Blutgefäße unterschiedlicher Größe abzweigten (Abbildung 64, B und C). Auf dem Tumorsphäroid selbst konnten sowohl Blutgefäße detektiert werden, die von den Zellen des Tumorsphäroids umwachsen waren, als auch Blutgefäße, die von außen in den Tumorsphäroid hineinwuchsen (Abbildung 64, D und E).

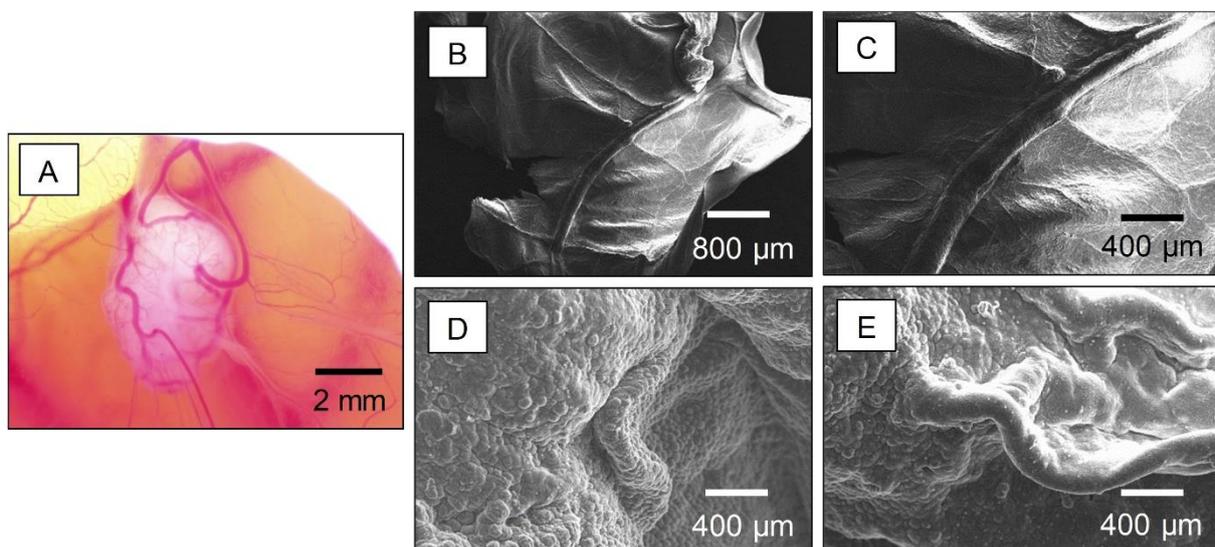


Abbildung 64: Mikroskopische Aufnahmen eines vaskularisierten Tumorsphäroids auf der CAM
 A) Gezeigt ist eine lichtmikroskopische Aufnahme eines vaskularisierten HuTu-80 Tumorsphäroids an Tag 17 im Ei. Der vaskularisierte 3D-Tumorsphäroid wurde anschließend aus dem Ei isoliert, präpariert und mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (REM) untersucht: Abbildung B) und C) zeigen die vaskularisierte CAM (REM-Aufnahme). Auf Abbildung D) ist ein Blutgefäß zu sehen, welches von den Zellen des Tumorsphäroids ummantelt ist (REM-Aufnahme). Abbildung E) zeigt ein Blutgefäß, das von außen in den Tumorsphäroid hineinwachsen ist (REM-Aufnahme).

Die Etablierung des HET-CAM-Tests zur Vaskularisierung von Tumorsphäroiden erfolgte für die Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 und wurde für die Untersuchung der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren genutzt. Ein wichtiger Faktor für die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie ist die Akkumulation des Photosensibilisators im Tumorgewebe. Hierzu wurden 5 µmol/L des Photosensibilisators in freier und nanopartikulärer Formulierung direkt auf die vaskularisierten Tumorsphäroide pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h wurden die Tumorsphäroide von der CAM entnommen, der Photosensibilisator aus dem Zelllysat aufgereinigt und mittels HPLC detektiert. Für die Kalkulation der akkumulierten Substanzmenge wurde der Mittelwert aus vier

unabhängigen HET-CAM Versuchsdurchführungen, die wiederum vier einzelnen vaskularisierten Tumorsphäroiden entsprechen, gebildet. Die so ermittelten Ergebnisse zeigten für die Zelllinie HuTu-80, dass nach 48 h Inkubation die Substanzmenge im Vergleich zur 24 h Inkubation bei mTHPC um 97 %, bei LP-BLC 2175 um 56 %, bei LP-BLC 5152 um 46 %, bei PEG-mTHPC-PLGA um 112 %, bei LrP-PEG-mTHPC-PLGA um 115 %, bei CP-mTHPC-PLGA um 50 % und bei F127-mTHPC-PLGA um 20 % gestiegen war (Abbildung 65, A). Auch bei der Zelllinie HT29-MTX-E12 konnte für die nanopartikulären Formulierungen eine erhöhte Akkumulation von 26 % bei LP-BLC 2175, 46 % bei LP-BLC 5152, 17 % bei PEG-mTHPC-PLGA, 56 % bei LrP-PEG-mTHPC-PLGA, 39 % bei CP-mTHPC-PLGA und 18 % bei F127-mTHPC-PLGA ermittelt werden (Abbildung 65, B). Dies führte zu der Erkenntnis, dass eine 48 h Inkubation der freien und nanopartikulären Formulierungen eine Steigerung der im Tumorsphäroid akkumulierten Substanzmenge bewirkt. Daher wurde für die Untersuchung des phototoxischen Effekts eine Inkubationszeit von 48 h festgelegt.

Zudem wurden zur Etablierung des HET-CAM-Tests Untersuchungen zu den dunkeltoxischen Effekten des Photosensibilisators mTHPC durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden die vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 an Tag 12 mit 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ des freien Photosensibilisators für 48 h inkubiert und nicht bestrahlt. An Tag 17 wurde eine optische Kontrolle durchgeführt. Die mit dem freien mTHPC inkubierten vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 und HT29-MTX-E12 wiesen keine optischen Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten und nicht bestrahlten Zellkontrolle auf. Daraus wurde geschlossen, dass bei einer Inkubation des freien Photosensibilisators mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ für 48 h kein dunkeltoxischer Effekt auftrat.

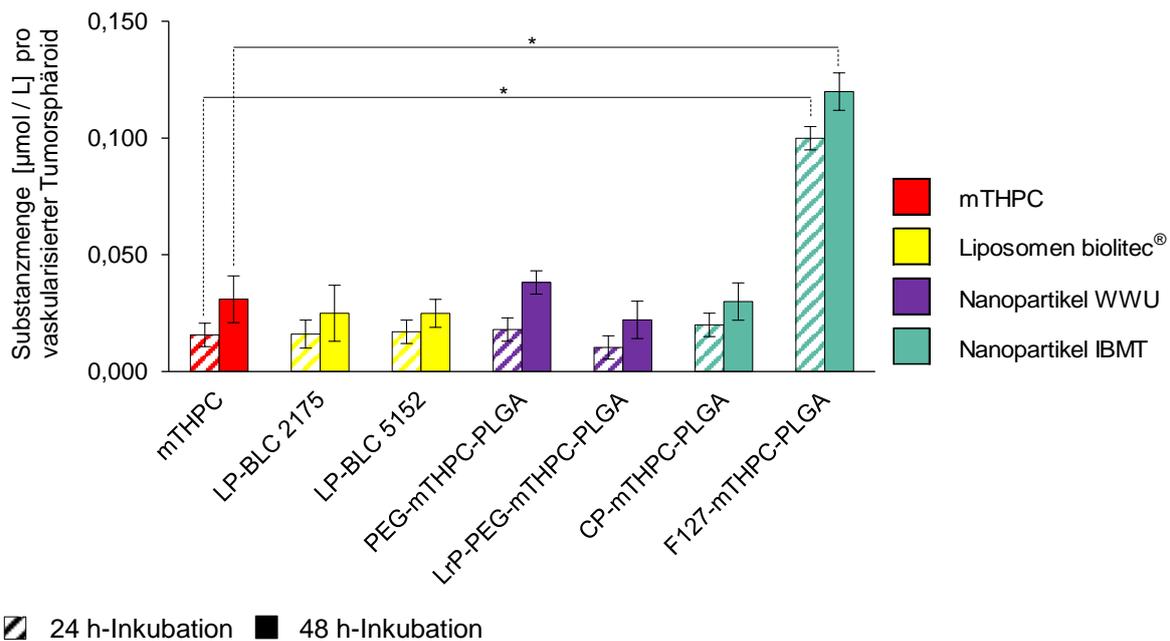
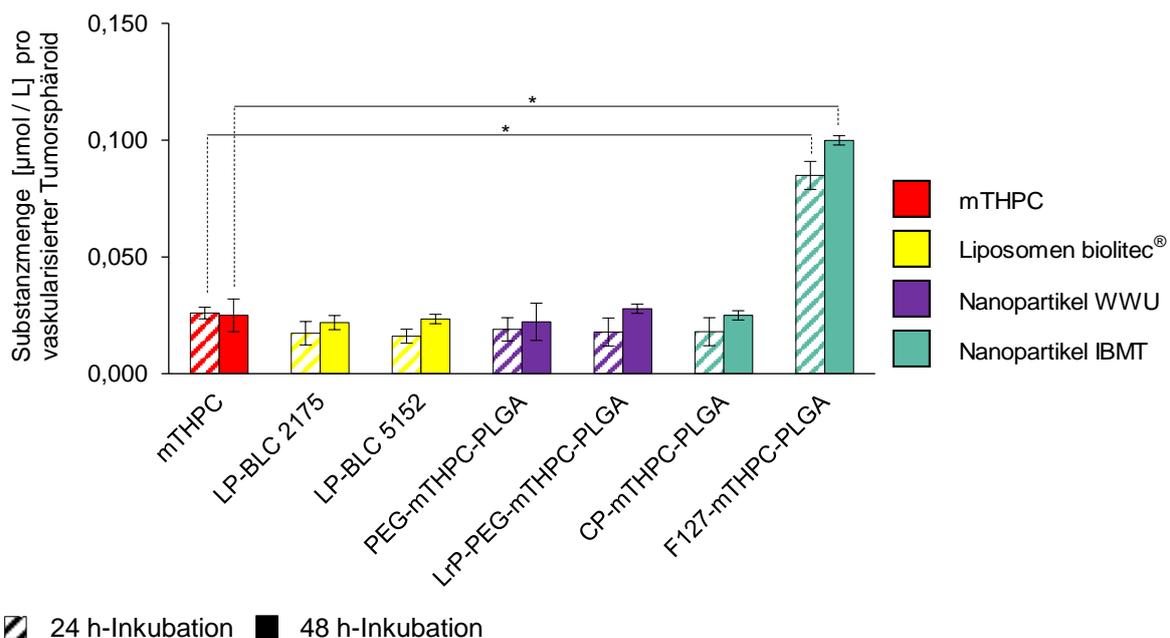
(A) Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80**(B) Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12**

Abbildung 65: Quantifizierung der akkumulierten Menge der Photosensibilisatoren mTHPC, BLC 2175 und BLC 5152 nach 24 h- bzw. 48 h- Inkubation in vaskularisierten Tumorsphäroiden der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12

Der freie Photosensibilisator mTHPC, die liposomalen Formulierungen der Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 mit den Bezeichnungen LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 und nanopartikelinkorporierten Photosensibilisatoren PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA wurden mit einer Konzentration von 5 µmol/L für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Danach wurde die akkumulierte Substanzmenge in den vaskularisierten Tumorsphäroiden mittels HPLC-Analyse detektiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. *Signifikante Abweichung der Messwerte der liposomalen und nanopartikelären Formulierungen gegenüber des freien Photosensibilisators mTHPC nach dem Welch-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 %. (n = 4; k = 4)

Ein Indikator für einen wirksamen phototoxischen Effekt ist die Zerstörung der Tumorzellen und damit die Reduzierung der Tumorgöße. Zur Aktivierung des Photosensibilisators wurde eine Bestrahlungseinheit gebaut, die es ermöglichte, den vaskularisierten Tumorsphäroid auf der CAM des bebrüteten Hühnereis fokussiert zu bestrahlen (Abbildung 66). Damit konnte zudem die für die klinische Anwendung geplante In-vivo-Bestrahlung mittels Endoskop simuliert werden. Neben der Lichtfaser zur Aktivierung des Photosensibilisators mit einer Wellenlänge von 652 nm wurde ein analoger Aufbau für die Aktivierung des lichtresponsiven Polymers mit einer Wellenlänge von 365 nm realisiert.

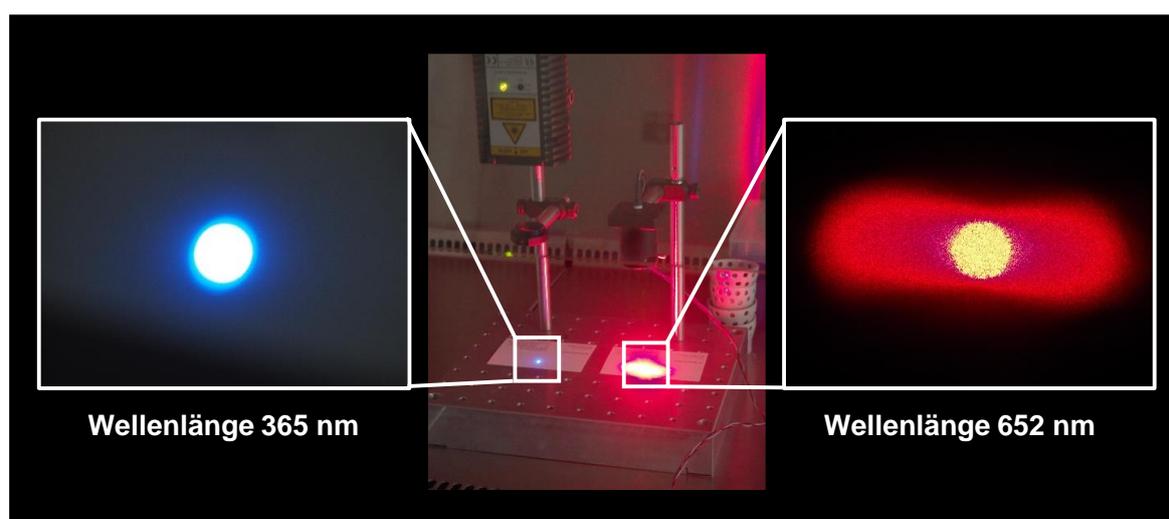
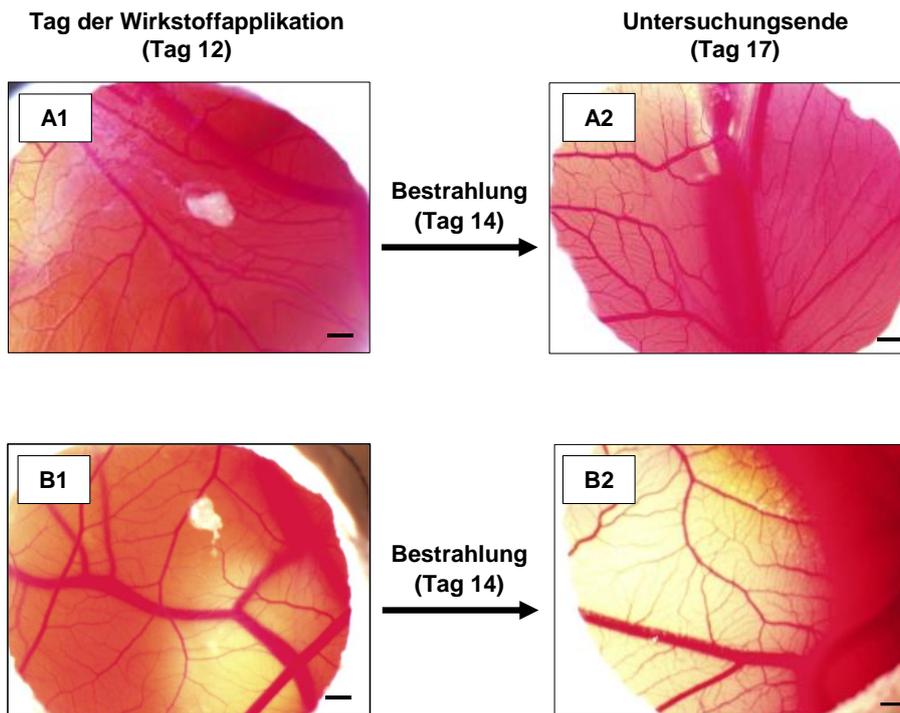


Abbildung 66: Fokussierte Bestrahlung für die vaskularisierten Tumorsphäroide

Die Abbildung zeigt den Aufbau der entwickelten Bestrahlungseinheit. Diese ermöglichte die fokussierte Bestrahlung der vaskularisierten Tumorsphäroide *in ovo* mit den Wellenlängen 365 nm und 652 nm.

Zunächst wurde der anti-tumorale Effekt des freien Photosensibilisators mTHPC in Kombination mit der neu entwickelten fokussierten Bestrahlungseinheit untersucht (Abbildung 67). Hierzu wurden die vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 an Tag 12 mit 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ des freien Photosensibilisators für 48 h inkubiert und an Tag 14 bestrahlt. Der daraus resultierende **phototoxische Effekt** wurde an Tag 17 mittels optischer Kontrolle durch mikroskopische Aufnahmen untersucht. Die mit dem freien mTHPC inkubierten und anschließend bestrahlten vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 waren an Tag 17 der Untersuchung nicht mehr auf der CAM auffindbar (Abbildung 67, A2 und B2). Bei den analog behandelten vaskularisierten Tumorsphäroiden der Zelllinie HT29-MTX-E12 konnte am Untersuchungstag 17 eine Lyse und Koagulation der Blutgefäße, die um den Tumorsphäroid herum lagen, festgestellt werden (Abbildung 67, C1). Ein weiterer dokumentierter Effekt war eine bräunliche Verfärbung und Austrocknung des vaskularisierten Tumorsphäroids nach der Behandlung (Abbildung 67, D2). Durch die optische Kontrolle der vaskularisierten Tumorsphäroide konnte ein anti-tumoraler Effekt der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren *in ovo* visualisiert werden.

Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80



Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12

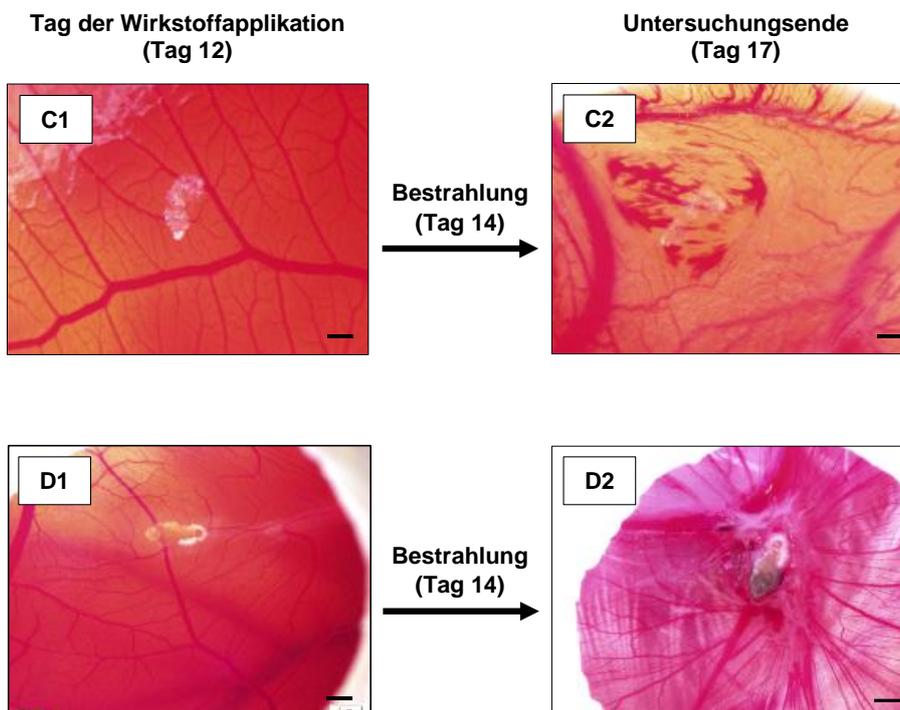
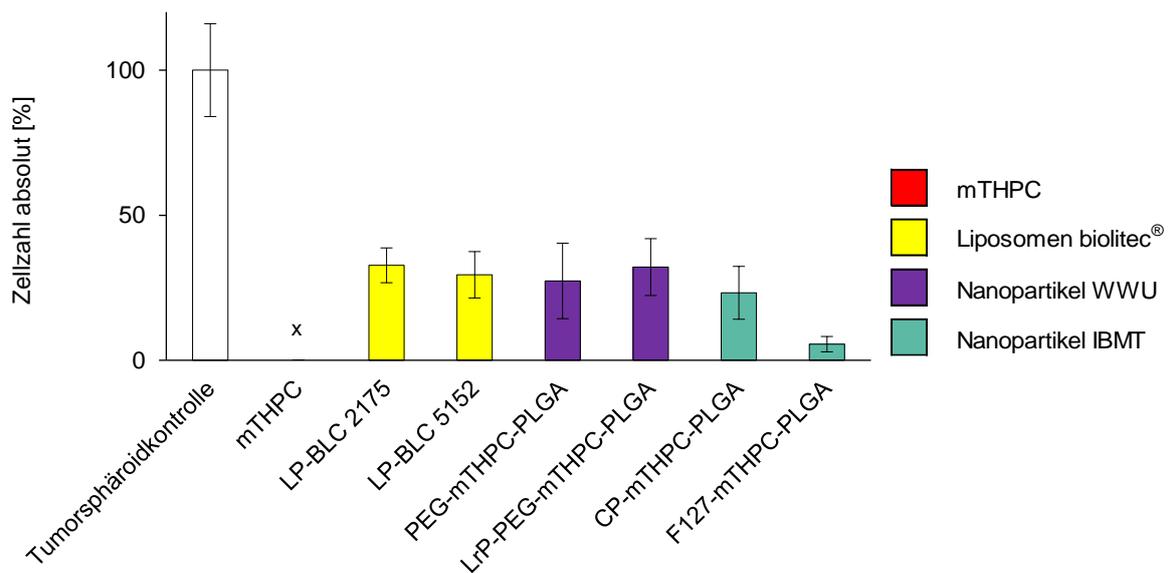
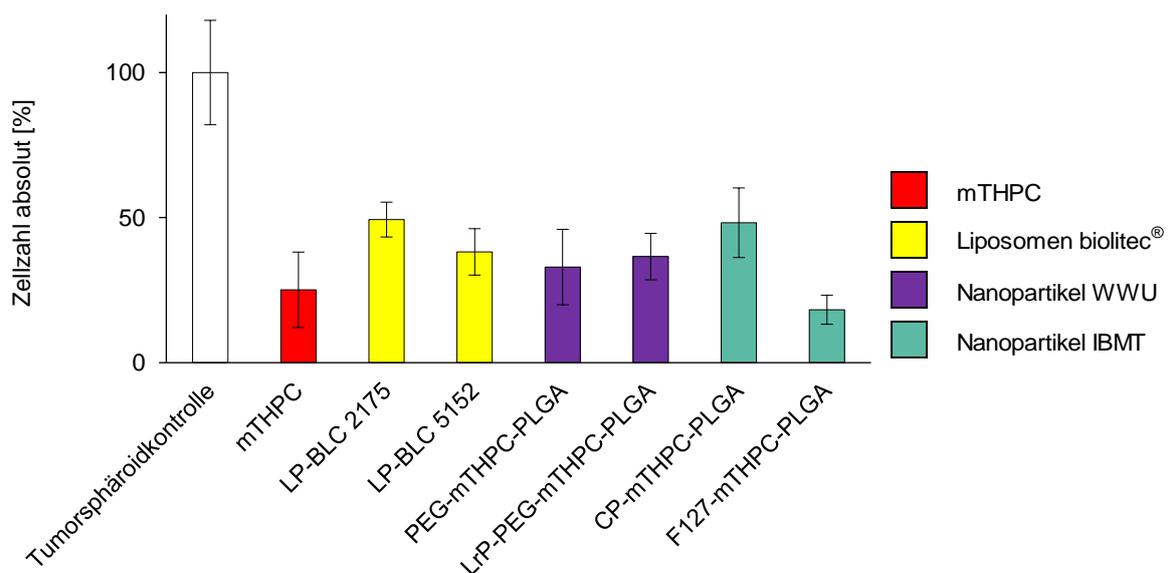


Abbildung 67: Optische Kontrolle der Behandlung von vaskularisierten Tumorsphäroiden der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12

Die vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 und HT29-MTX-E12 wurden an Tag 12 mit dem freien Photosensibilisator mTHPC (Konzentration $5 \mu\text{mol} / \text{L}$) für 48 h inkubiert (A1 und B1; C1 und D1). Danach wurden die Tumorsphäroide mit der fokussierten Bestrahlungseinheit an Tag 14 bestrahlt. An Tag 17 (Untersuchungsende) wurden erneut eine optische Kontrolle der vaskularisierten Tumorsphäroide durchgeführt (A2 und B2; C2 und D2). Der Messbalken entspricht 2 mm.

Im nächsten Schritt wurde zur Quantifizierung des anti-tumoralen phototoxischen Effekts der freien und der nanopartikulären Formulierungen des Photosensibilisators die Tumorgroße nach der Behandlung bestimmt. Dies erfolgte auf der Basis der Zellzahl der Tumorsphäroide an Tag 17 des HET-CAM-Tests. Hierzu wurden vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 an Tag 12 mit 5 $\mu\text{mol/L}$ des freien mTHPCs und den nanopartikulären Formulierungen für 48 h inkubiert. An Tag 14 erfolgte die fokussierte Bestrahlung der vaskularisierten Tumorsphäroide. Anschließend wurden die vaskularisierten Tumorsphäroide an Tag 17 von der CAM präpariert und die Zellen vereinzelt. Dies ermöglichte die Bestimmung der Zellzahl mit dem Zellzähl-System (CASY® TT). Als Vergleichswert wurde eine unbehandelte Tumorsphäroidkontrolle mitgeführt, die analog behandelt und bestrahlt wurde und deren Zellzahl auf 100 % normiert wurde. Entsprechend wurden die ermittelten Zellzahlen der, mit freiem und nanopartikulären Photosensibilisator behandelten, vaskularisierten Tumorsphäroide zum Vergleich Prozentual berechnet. Nach der Behandlung der vaskularisierten HuTu-80 Tumorsphäroide mit dem freien Photosensibilisator mTHPC konnten keine Tumorzellen auf der CAM detektiert werden. Die Behandlung mit den nanopartikulären Formulierungen des Photosensibilisators führte zu einer Reduktion der Zellzahl unter Verwendung der „Liposomen biolitec®“ auf $33 \pm 6 \%$ bei LP-BLC 2175 und auf $29 \pm 8 \%$ bei LP-BLC 5152. Bei den „Nanopartikel WWU“ wurde die Größe der Tumorsphäroide auf $27 \pm 13 \%$ bei PEG-mTHPC-PLGA und auf $32 \pm 10 \%$ bei LrP-PEG-mTHPC-PLGA sowie bei den „Nanopartikeln IBMT“ auf $23 \pm 9 \%$ bei CP-mTHPC-PLGA und auf $6 \pm 3 \%$ bei F127-mTHPC-PLGA (Abbildung 68, A) im Vergleich zur Zellkontrolle verringert. Entsprechend konnte auch eine Reduzierung der absoluten Zellzahl bei den vaskularisierten HT29-MTX-E12 Tumorsphäroiden auf $25 \pm 13 \%$ bei dem freien Photosensibilisator mTHPC festgestellt werden. Für die „Liposomen biolitec®“ lag der Wert bei $49 \pm 6 \%$ für LP-BLC 2175 und bei $38 \pm 8 \%$ für LP-BLC 5152. Die „Nanopartikel WWU“ lösten eine Größenreduktion auf $33 \pm 13 \%$ bei PEG-mTHPC-PLGA und auf $37 \pm 8 \%$ bei LrP-PEG-mTHPC-PLGA aus. Die „Nanopartikel IBMT“ konnten die Größe des Tumorsphäroids nach der Behandlung auf $48 \pm 12 \%$ bei CP-mTHPC-PLGA und auf $18 \pm 5 \%$ bei F127-mTHPC-PLGA verringern (Abbildung 68, B). Die Ergebnisse der Bestimmung der Größe der behandelten vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 zeigten insgesamt eine Verringerung der absoluten Zellzahl zwischen 0 bis 49 %. Damit konnte eine deutliche Verringerung der Tumorgroße nach der Behandlung mit dem freien Photosensibilisator mTHPC und den nanopartikulären Formulierungen nachgewiesen werden.

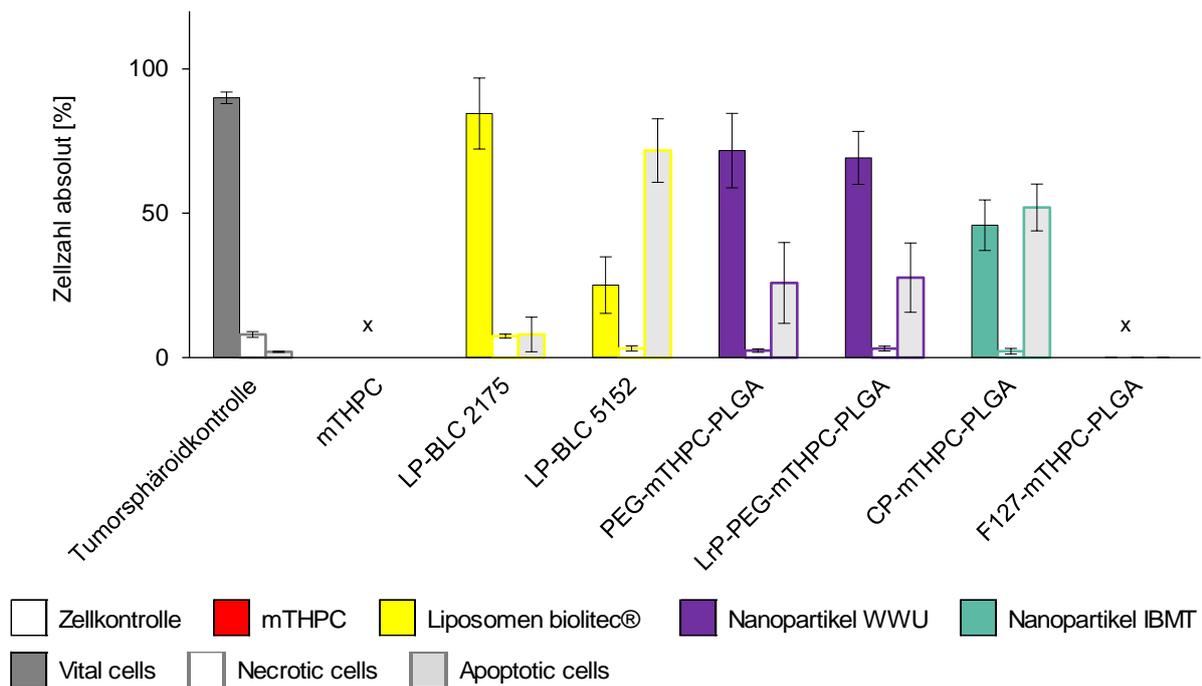
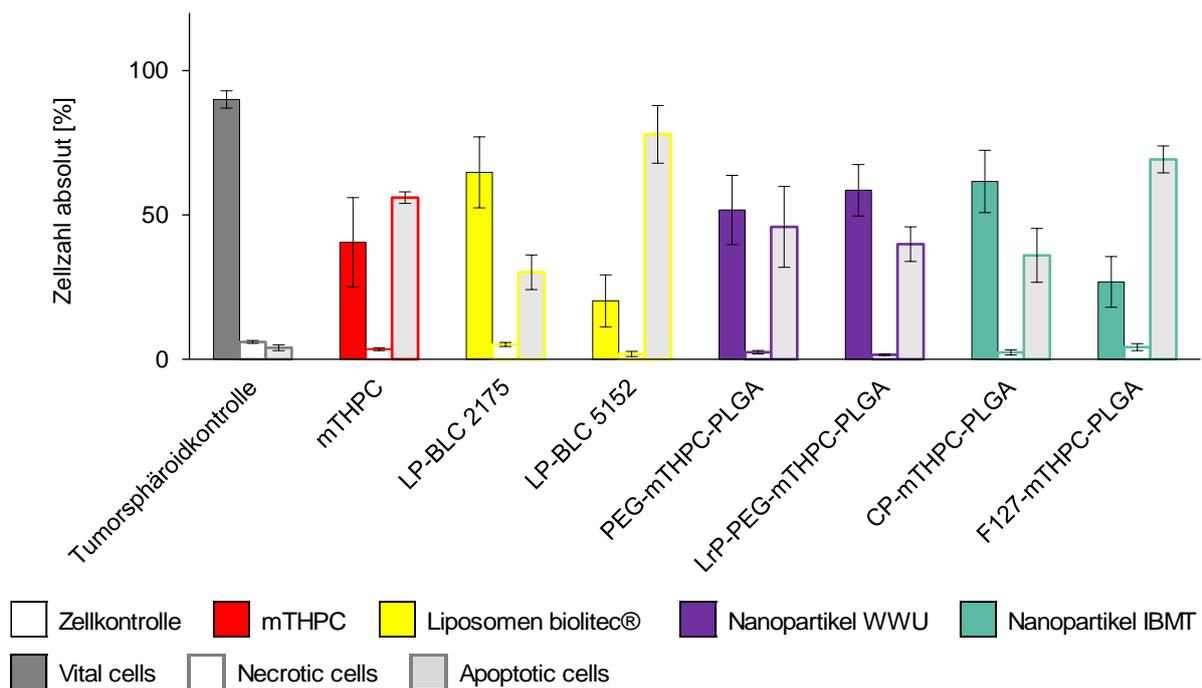
(A) Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80**(B) Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12****Abbildung 68: Bestimmung der Zellzahl der vaskularisierten Tumorsphäroide nach der Inkubation und Bestrahlung**

Dargestellt ist die gemessene absolute Zellzahl der vaskularisierten Tumorsphäroide (A) HuTu-80 und (B) HT29-MTX-E12 nach der Inkubation mit dem freien Photosensibilisator mTHPC, den liposomalen Formulierungen der Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 mit den Bezeichnungen LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 sowie den nanopartikulären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA im Vergleich zur unbehandelten Tumorsphäroidkontrolle, die ebenfalls bestrahlt wurde. Die Konzentration der Photosensibilisatoren betrug $5 \mu\text{mol} / \text{L}$. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. x: keine Zellen detektierbar ($n = 4$; $k = 4$)

Neben der Bestimmung der absoluten Zellzahl der vaskularisierten Tumorsphäroide wurden analog behandelte vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 im Hinblick auf apoptotische und nekrotische Ereignisse mittels FACS-Analyse untersucht. Die Hauptreaktionen, die durch die PDT in Tumorzellen ausgelöst werden, sind Apoptose und Nekrose. Diese zu detektieren gibt Aufschluss über die zelluläre Zusammensetzung von vaskularisierten Tumorsphäroiden nach der induzierten Phototoxizität. Hierfür wurden die vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 an Tag 12 mit den freien und den nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren inkubiert und an Tag 14 erfolgte die Induktion des phototoxischen Effekts mittels fokussierter Bestrahlung. An Tag 17 wurden die behandelten vaskularisierten Tumorsphäroide von der CAM präpariert und für die FACS-Analyse aufbereitet und vermessen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte vaskularisierte Tumorsphäroide mitgeführt. Diese weisen bei den vaskularisierten Tumorsphäroiden der Zelllinie HuTu-80 eine Zusammensetzung von 90 ± 2 % vitale, 8 ± 1 % apoptotische und $2 \pm 0,2$ % nekrotische Zellen auf (Abbildung 69, A). Aufgrund des nicht mehr nachweisbaren vaskularisierten Tumorsphäroids nach Behandlung mit dem freien Photosensibilisator mTHPC konnten keine Zellen in der FACS-Analyse detektiert werden. Die mit den liposomalen Formulierungen „Liposomen biolitec®“ behandelten vaskularisierten Tumorsphäroide zeigten bei LP-BLC 2175 eine Zusammensetzung von 85 ± 12 % vitale, 7 ± 1 % apoptotische und 8 ± 6 % nekrotische Zellen und bei LP-BLC 5152 von 25 ± 10 % vitale, 3 ± 1 % apoptotische und 72 ± 11 % nekrotische Zellen. Nach Behandlung mit den „Nanopartikeln WWU“ ergab sich für PEG-mTHPC-PLGA eine zelluläre Zusammensetzung der vaskularisierten Tumorsphäroide für PEG-mTHPC-PLGA von 72 ± 13 % vitale, 2 ± 1 % apoptotische und 26 ± 14 % nekrotische Zellen und für LrP-PEG-mTHPC-PLGA von 69 ± 9 % vitale, 3 ± 1 % apoptotische und 21 ± 12 % nekrotische Zellen. Die Verwendung der „Nanopartikel IBMT“ ergab eine zelluläre Zusammensetzung der Tumorsphäroide bei CP-mTHPC-PLGA von 46 ± 9 % vitale, 2 ± 1 % apoptotische und 52 ± 8 % nekrotische Zellen und bei F127-mTHPC-PLGA konnten keine Tumorzellen der Zelllinie HuTu-80 nach der Behandlung detektiert werden.

Analog zu der Behandlung der vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 wurden die Messungen der apoptotische und nekrotische Ereignisse mit behandelten vaskularisierten Tumorsphäroiden der Zelllinie HT29-MTX-E12 durchgeführt (Abbildung 69, B). Die Messung der Zellkontrolle ergab hier eine zelluläre Zusammensetzung von 90 ± 3 % vitale, 6 ± 1 % apoptotische und 4 ± 1 % nekrotische Zellen und die Behandlung mit dem freien Photosensibilisator mTHPC von 41 ± 16 % vitale, 4 ± 1 % apoptotische und 56 ± 2 % nekrotische Zellen. Für die liposomalen Formulierungen „Liposomen biolitec®“ konnten für LP-BLC 2175 eine Zusammensetzung von 65 ± 12 % vitale, 5 ± 1 % apoptotische und 30 ± 6 % nekrotische Zellen und bei LP-BLC 5152 von 20 ± 9 % vitale, 2 ± 1 % apoptotische und

78 ± 10 % nekrotische Zellen detektiert werden. Die Behandlung mit den „Nanopartikeln WWU“ ergab für PEG-mTHPC-PLGA eine zelluläre Zusammensetzung der vaskularisierten Tumorsphäroide für PEG-mTHPC-PLGA von 52 ± 12 % vitale, 2 ± 1 % apoptotische und 46 ± 14 % nekrotische Zellen und für LrP-PEG-mTHPC-PLGA von 59 ± 9 % vitale, 2 ± 0 % apoptotische und 40 ± 6 % nekrotische Zellen. Die „Nanopartikel IBMT“ ergaben eine zelluläre Zusammensetzung der Tumorsphäroide bei CP-mTHPC-PLGA von 62 ± 11 % vitale, 2 ± 1 % apoptotische und 36 ± 9 % nekrotische Zellen und bei F127-mTHPC-PLGA von 27 ± 9 % vitale, 4 ± 1 % apoptotische und 69 ± 5 % nekrotische Zellen. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der Untersuchung von apoptotischen und nekrotischen Ereignissen der vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 nach Behandlung mit dem freien mTHPC und den nanopartikulären Formulierungen der Photosensibilisatoren eine Erhöhung der nekrotischen Zellen. Diese lag für die vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 bei 8 bis 72 % und für die Zelllinie HT29-MTX-E12 bei 30 bis 69 %. Damit konnte ein phototoxischer Effekt, der apoptotische und nekrotische Ereignisse in den vaskularisierten Tumorsphäroid ausgelöst hat, festgestellt werden.

(A) Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80**(B) Vaskularisierte Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12****Abbildung 69: Detektion von Apoptose und Nekrose der behandelten vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12**

Die auf der CAM des bebrüteten Hühnereis vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 wurden mit dem freien Photosensibilisator mTHPC, den liposomalen Formulierungen der Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 mit den Bezeichnungen LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 sowie den nanopartikulären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA, LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA inkubiert. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Tumorsphäroidkontrolle, die ebenfalls bestrahlt wurde, mitgeführt. Die Konzentration des freien und der nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren betrug 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Mittels FACS-Analyse wurde die prozentuale Anzahl der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. x: Keine Zellen detektierbar ($n = 4$; $k = 4$)

5 Diskussion

Die Anzahl neuer Krebspatienten steigt kontinuierlich. Wo es im Jahre 2008 etwa 12,7 Millionen neue Krebspatienten gab, waren es im Jahre 2018 bereits 18,1 Millionen Menschen, die an Krebs erkrankten [200,201]. Diese Entwicklung ist zum Teil auf die erhöhte Lebenserwartung, aber auch auf die steigende Weltbevölkerungszahl zurück zu führen. Des Weiteren können ungesunde Lebensweisen, wie Rauchen, erhöhter Alkoholkonsum, körperliche Inaktivität und eine schlechte Ernährungsweise das Risiko an Krebs zu erkranken, erhöhen [38,45,60]. Dieser weltweite Wandel erfordert die Entwicklung neuer Therapieformen und Medikamenten zur Behandlung von Krebs. Dabei scheitern neue potenzielle Arzneistoffe oft nicht an einer mangelnden Wirksamkeit. Häufig ist der Grund eine schlechte Bioverfügbarkeit sowie hohe Nebenwirkungen und damit eine nicht vorhandene Sicherheit für den Patienten. Zur Verbesserung der Arzneistoff-Eigenschaften können nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme eingesetzt werden. Diese ermöglichen durch Inkorporation des Arzneistoffes dessen Löslichkeit und Bioverfügbarkeit zu verbessern und zudem durch einen gezielten Transport zum Wirkort die Nebenwirkungen zu verringern.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme basierend auf Liposomen und Polymilch-co-glykolsäure (PLGA) für den Einsatz zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen mit der photodynamischen Therapie (PDT) entwickelt. Bei der PDT wird dem Patienten ein photoaktivierbarer pharmazeutischer Wirkstoff (Photosensibilisator) verabreicht. Durch anschließende fokussierte Bestrahlung mit Licht einer Photosensibilisator-spezifischen Wellenlänge entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die zu einer Zerstörung des Tumorgewebes führen. Als Arzneistoffe wurden ein bereits von der FDA zugelassener Photosensibilisator mTHPC sowie neu synthetisierte Photosensibilisatoren getestet. Untersucht wurde, neben der anti-tumoralen Wirksamkeit und dem zelltoxischen und dunkeltoxischen Effekt der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren, auch der Transport und die Akkumulation am Wirkort.

5.1 Validierung analytischer Methoden

Die Validierung von analytischen Methoden ist eine wichtige regulatorische Anforderung in der pharmazeutischen Analytik. Die Methodvalidierung liefert einen dokumentierten Nachweis und ein hohes Maß an Sicherheit, dass eine verwendete Analyseverfahren für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet ist. Beim Zulassungsverfahren eines neuen Medikaments muss daher sichergestellt werden, dass die übermittelten Daten mit einer validierten Analyseverfahren erfasst wurden. Die International Conference on Harmonization (ICH) hat daher Richtlinien für die Validierung von Analyseverfahren eingeführt [172]. Diese Richtlinien definieren die regulatorischen Rahmenbedingungen für die Validierung einer Analyseverfahren. Diese fordert die Überprüfung von Richtigkeit, Präzision, Detektionslimit,

Quantifizierungslimit, Linearität, Arbeitsbereich, Robustheit und Spezifität. Daher ist es notwendig diese Parameter zu ermitteln und zu dokumentieren, um eine analytische Methode zu validieren. Die ICH-Guideline liefert hierzu allerdings lediglich eine Definition der einzelnen zu validierenden Parameter, ohne Angaben wie die Validierung durchgeführt werden soll. Daher ist der erste Schritt einer Methodvalidierung die Erstellung eines Validierungsplans, der die Art der Prüfung der einzelnen Parameter genauestens beschreibt. Dabei ist das Vorgehen der Validierung abhängig von der gewählten analytischen Methode und der zu untersuchenden Substanzen. Eine in der pharmazeutischen Analytik häufig verwendete Methode ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC). Diese ermöglicht die Auftrennung von Substanzen aus einer Probe und deren Identifizierung und Quantifizierung durch die Verwendung von Standards.

In der vorliegenden Arbeit war das Ziel eine HPLC-Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, die aus verschiedenen biologischen Testsystemen gewonnenen Proben zu analysieren. Diese HPLC-Methode wurde zur Quantifizierung der aufgenommenen Menge der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren in die Zelle bzw. zur Quantifizierung der permeierten Menge der freien und nanopartikulären Photosensibilisator sowie Kontrollsubstanzen über die Mukusbarriere eingesetzt. Im Allgemeinen ist die Untersuchung von Proben, bei denen die Substanzmenge in komplexen biologischen Materialien wie Blutplasma oder Gewebe vorliegt, eine Herausforderung für die analytische Methodenentwicklung [202,203]. Dabei kann trotz Aufreinigung der Proben meist nicht die komplette Probenmatrix entfernt werden. Daher lag die Herausforderung der Methodenentwicklung in der Trennung der zu detektierenden Substanzen von der Probenmatrix. Eine selektive Methode konnte durch die Verwendung einer Gradienten-Methode mit einer Laufzeit von 14 min erreicht werden. Bei der Methodenentwicklung wird häufig eine schnelle Elution und damit eine kurze Analyse-Laufzeit angestrebt, um möglichst viele Proben mit geringem Materialbedarf untersuchen zu können. Hierbei werden für schnelle HPLC-Methoden eine Zeit von ≤ 8 min in der Literatur angegeben [204–206]. Die gewählte Laufzeit von 14 min war in der entwickelten Methode allerdings nötig, um eine Auftrennung der Probe aus der Probenmatrix zu gewährleisten.

Insgesamt ist die Methode zuverlässig und zeigt eine angemessene Richtigkeit (98 bis 101 %), Präzision (Variationskoeffizient ≤ 2 %), Linearität (Korrelationskoeffizient $r = 1,000$), Robustheit (innerhalb von ± 5 %) und Spezifität gegenüber den zu testenden Substanzen. Somit kann die verwendete HPLC-Methode als validiert bezeichnet werden und eignet sich über die Arbeit hinaus auch für eine Analytik unter Qualitätsmanagement-Aspekten. Zu beachten ist allerdings, dass bei der durchgeführten Quantifizierung mittels HPLC-Analyse die Konzentration des Photosensibilisators und nicht die Konzentration der Nanopartikel bestimmt wurde. Da der Photosensibilisator in die nanopartikulären Arzneistoffträgersysteme

inkorporiert wurde, ist eine Quantifizierung der Nanopartikel nur indirekt möglich. Eine Möglichkeit zur Quantifizierung von Nanopartikeln in der Zelle stellt die Transelektronenmikroskopie (TEM) dar. Diese ermöglicht eine direkte Abbildung von Nanopartikeln in der Zelle mithilfe von Elektronenstrahlen. Die Quantifizierung findet bei dieser Methode durch die Interpretation der Bilder und computergestütztes Zählen statt. Dabei können durch subjektive Interpretationen Effekte der Beobachtungserwartung die Genauigkeit beeinträchtigen [207]. Der größte Nachteil der TEM ist, dass nur einzelne Zellen und nicht das ganze Zellvolumen abgebildet werden können. Infolgedessen ist die Quantifizierung der Nanopartikel in einer kompletten Probe kaum zu bestimmen [208]. Eine weitere mögliche Methode zur Quantifizierung von Nanopartikeln in biologischen Proben ist die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF). Bei dieser Methode wird eine offene Kanalstruktur verwendet, durch die die mobile Phase fließt. Dabei basiert die Auftrennung der Probe ausschließlich auf den Interaktionen zwischen den Analyten und dem senkrecht angelegten Feld [209]. Die FFF ermöglicht eine Analyse von PLGA basierenden Nanopartikeln aus einer komplexen Probe. Beispielsweise wurde in einer Studie von Engel et al. mit Hilfe der FFF die Freisetzung von PLGA-Nanopartikeln aus einer Tablette quantitativ untersucht [210]. Dabei konnte ein direkter Nachweis der Nanopartikel in der Probe durch die Verwendung eines Vielwinkel-Lichtstredetektor (MALS = Multi-Angle Light Scattering Detector) durchgeführt werden. Insgesamt ist die Wahl der Methode zur Quantifizierung von Nanopartikeln in Zellen bzw. biologischen Proben von der zu beantwortenden Fragestellung abhängig. Im Falle der vorliegenden Arbeit ist für eine erfolgreiche Behandlung von Tumorzellen die Menge des akkumulierten Photosensibilisators ausschlaggebend für eine effektive PDT. Die verwendeten Nanopartikel dienen lediglich als Transporter der Photosensibilisatoren zum Wirkort. Zudem stellt die HPLC eine robuste und zeitsparende Standardmethode in der Bioanalytik dar [211,212]. Daher war die HPLC-Analyse die Methode der Wahl zur Quantifizierung der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren in der Zelle bzw. im aufgereinigten Probenmaterial.

5.2 Oberflächenmodifizierung und physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel

Zur Entwicklung von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen für die Behandlung von Dünndarmkarzinomen wurden zwei Strategien für den gezielten Wirkstofftransport gewählt: Mukoadhäsion und Mukopermeation. Der Leitgedanke dieser Strategien beruhte auf der geplanten Arzneistoffapplikation, die oral erfolgen sollte, und der Lokation des zu behandelnden Dünndarmkarzinoms im Darmlumen. Aufgrund der hohen Patient compliance wird eine orale Gabe des Photosensibilisators angestrebt. Hierzu sollen die nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren in eine Tablettenmatrix inkorporiert werden. Nach der

oralen Einnahme des Photosensibilisators soll im Darm eine Freisetzung der Nanopartikel aus der Tablettenmatrix erfolgen. Die Nanopartikel befinden sich nun bereits in nächster Nähe zum Wirkort, allerdings muss hierzu zunächst die Mukusbarriere überwunden werden. Die Mukusschicht kleidet das Darmlumen aus und hat eine schützende Funktion gegenüber dem Eindringen von Pathogenen und Molekülen über die Darmbarriere. Allerdings hindert diese auch Arzneistoffe am Erreichen der Darmepithelschicht. Auch ein Dünndarmkarzinom ist von einer Mukusschicht bedeckt, was dazu führt, dass der Arzneistoff in der Lage sein muss diese zu überwinden, um das Tumorgewebe zu erreichen. Durch den Einsatz von mukoadhäsiven und mukopermeablen nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen sollte die Verweildauer der Nanopartikel erhöht werden und aufgrund einer verzögerten Freisetzung eine gezielte Anreicherung im Tumorgewebe erreicht werden. Zur physikochemischen Charakterisierung, der in der Arbeit verwendeten Nanopartikel, wurden mittels dynamischer Lichtstreuung drei Eigenschaften der Nanopartikel vermessen: Die Nanopartikelgröße, die Oberflächenladung (Zetapotential, ZP) und die Größenverteilung (Polydispersitätsindex, PDI) [213]. Die Größermessung mittels dynamischer Lichtstreuung kann neben der Bestimmung der Nanopartikelgröße auch zu einer Beurteilung der erfolgreichen Oberflächenmodifikation durch Größenzunahme oder -abnahme genutzt werden. Das Zetapotential misst das elektrostatische Potential, das zwischen der Scherebene eines Nanopartikels und dem Lösungsmittel entsteht. Anhand des Zetapotentials kann eine Aussage bezüglich der Stabilität der Nanopartikelsuspension gemacht werden und zum anderen kann eine Oberflächenmodifizierung auch eine Änderung des Zetapotentials bewirken. Dabei kann eine Änderung des Zetapotentials einen positiven Effekt auf den gezielten Transport bzw. die Akkumulation einer Substanz am Wirkort haben und gleichzeitig eine Veränderung der Stabilität der Nanopartikel verursachen [214]. Die Messung der Größenverteilung kann verwendet werden, um die Homogenität der Nanopartikelgröße zu beurteilen [215].

Zur Herstellung von mukoadhäsiven Nanopartikeln wurde eine Oberflächenbeschichtung mit Chitosan und Carbopol® durchgeführt. **Chitosan** ist ein biokompatibles und biologisch abbaubares natürliches Polymer, das als Nahrungsmittel für den Menschen zugelassen ist [124,125,216]. Nanopartikel, die mit Chitosan und Chitosan-Derivaten hergestellt werden, weisen typischerweise eine positive Oberflächenladung und mukoadhäsive Eigenschaften auf, die an Mukusschichten haften und dadurch Wirkstoffe nachhaltig freisetzen können [126]. Die in der Arbeit untersuchten „Nanopartikel WWU“ basieren auf dem Polymer PLGA. Zur Mukoadhäsion wurden diese Nanopartikel mit Chitosan modifiziert. Wie zu erwarten führte diese Oberflächenmodifikation zu einer positiven Oberflächenladung, mit einem durchschnittlichen Wert von 9,5 mV. Im Gegensatz dazu wiesen die unmodifizierten PLGA-Nanopartikel eine durchschnittliche negative Oberflächenladung von -34,8 mV auf. Damit konnte eine erfolgreiche Oberflächenbeschichtung nachgewiesen werden. Eine positive

Oberflächenladung kann eine Anhaftung an die stark negativ geladene Mukusschicht begünstigen. Studien zeigen, dass kationisch geladene Nanopartikel verstärkt über die intestinale Barriere permeieren können im Vergleich zu unmodifizierten Nanopartikeln [149]. Die positive Ladung des Chitosans kann zudem einen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung von negativ geladenen Arzneistoffen auslösen. Negativ geladene Arzneistoffe verbleiben länger in der Matrix des Nanopartikels, da sie aufgrund der Ladungsunterschiede zurückgehalten werden können, was zu einer verzögerten Freisetzung führt [217]. Allerdings hat die Oberflächenmodifizierung mit Chitosan auch zu einer Verringerung der Stabilität der Nanopartikel geführt. Ein hohes Zetapotential ist ein Indikator für die Stabilität einer Nanopartikel-Suspension. Eine höhere elektrische Ladung auf der Oberfläche der Nanopartikel verhindert die Aggregation in der Suspensionslösung aufgrund der starken Abstoßungskräfte, die zwischen den Nanopartikeln vorliegen [46-47]. Dabei gelten Nanopartikel mit einem Zetapotential über ± 30 mV als stabil, über ± 60 mV als sehr stabil und Werte im Bereich von -5 mV bis +5 mV deuten auf eine schnelle Aggregation hin [218,219]. Als Faustregel gilt, dass absolute Zetapotential-Werte über 30 mV eine gute Stabilität bieten [50-51] und über 60 mV eine ausgezeichnete Stabilität. Etwa 20 mV bieten nur Kurzzeitstabilität, Werte im Bereich von -5 mV bis +5 mV deuten auf eine schnelle Aggregation hin. Das Zetapotential veränderte sich durch die Modifizierung von -34,8 mV auf 9,5 mV, was theoretisch begründet zu einer verschlechterten Stabilität der Nanopartikel führt. Allerdings ist zu beachten, dass die Mukoadhäsion von Chitosan auf die Anziehung zwischen dem negativ-geladenen Mukus und dem positiv-geladenen Chitosan zurückzuführen ist [126]. Dieser Aspekt ist gegenüber der Stabilität der Nanopartikel abzuwägen. Eine Möglichkeiten um die Stabilität der Chitosan-Nanopartikel zu erhöhen, wäre eine Anpassung der Chitosan Konzentration oder die Verwendung von Chitosan mit einem höheren Molekulargewicht [220]. Beispielsweise konnte in einer Studie von Wang et al. [221] gezeigt werden, dass durch die Erhöhung der Chitosan-Konzentration um das Vierfache auch eine Erhöhung des Zeta-Potentials um rund 35 % erreicht werden konnte. Des Weiteren führte die Modifizierung mit Chitosan zu einem Größenwachstum von 13,3 %, was ebenfalls auf eine erfolgreiche Modifikation der Nanopartikel hindeutet. Die „Nanopartikel IBMT“ wurden mit **Carbopol**[®] modifiziert, um eine mukoadhäsive Nanopartikeloberfläche zu generieren. Carbopol[®] ist ein synthetisches Polymer mit einer hohen Biokompatibilität und Abbaubarkeit, dass starke mukoadhäsive Eigenschaften aufweist [129,222]. Eine Untersuchung, bei der die Haftkraft von verschiedenen Nanosuspensionen an der porcinen Mucosa ermittelt wurden, zeigten dass die mit verschiedenen Carbopol[®] modifizierten Nanopartikel eine durchschnittliche Haftkraft von 19,5 mN aufwiesen. Chitosan hingegen wies eine Haftkraft von 12 mN auf, was auf eine geringere Mukoadhäsion im Vergleich zu Carbopol[®] hindeutet [223]. Im Gegensatz zu Chitosan führt die Oberflächenmodifizierung mit Carbopol[®] zu einer stark negativen

Oberflächenladung [128]. Die Mukoadhäsion ist daher nicht auf eine Anziehung des negativen Mukus und der Nanopartikeloberfläche zurückzuführen, sondern auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und starke ionische Wechselwirkungen [129]. Die in der Arbeit entwickelten und hergestellten Nanopartikel mit einer Carbopol®-Oberflächenmodifizierung wiesen eine stark negative Oberflächenladung von - 51,6 mV auf. Ein Vorteil einer negativ geladenen Nanopartikeloberfläche ist die geringe Affinität Proteine zu adsorbieren. Dies kann zu einer Erhöhung der systemischen Zirkulationszeit und zu einer Verringerung des Abbaus durch Makrophagen führen, was insgesamt einen positiven Einfluss auf die Akkumulation am Wirkort haben kann [217,224].

Die Strategie mukoadhäsive Nanopartikel als Arzneistoff-Transportsysteme zu verwenden beruht auf der verlängerten Verweildauer der Nanopartikel in der Mukusschicht. Aufgrund von hydrolytischen Prozessen in der Mukusschicht, kommt es dann zur Freisetzung der Arzneistoffe aus der Nanopartikel-Matrix. Die Arzneistoffmoleküle können dann in die Tumorzellen aufgenommen werden. Aufgrund der verlängerten Verweildauer und der verzögerten Freisetzung, soll es zu einer Erhöhung der Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe kommen. Betrachtet man allerdings die Eigenschaft der Mukusschicht, die einem ständigen Erneuerungs- und Abtragungsprozess unterliegt, wird deutlich, dass die Effektivität von mukoadhäsiven Nanopartikeln direkt mit der Geschwindigkeit der Mukus-Erneuerung korreliert. Da die Erneuerungszeit im Darm zwischen wenigen Minuten bis hin zu mehreren Stunden beträgt, stellt dies eine Limitation von mukoadhäsiven nanopartikelären Arzneistoffträgersystemen dar [26,225]. Als alternative Strategie kann das Ziel sein, dass der Nanopartikel die Mukusschicht überwindet und eine Freigabe des Wirkstoffes an der Zelloberfläche oder eine zelluläre Aufnahme des Nanopartikels und eine intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes stattfindet [226]. Eine Herangehensweise hierzu kann die Betrachtung der mukopermeablen Eigenschaften von Viren sein. Viren sind bekanntermaßen aufgrund ihrer Ladungsneutralen und hydrophilen Oberfläche in der Lage, nahezu ungehindert die Mukusschicht zu überwinden [227]. Um diese Eigenschaft auf Nanopartikel zu übertragen, eignen sich mukopermeable Polymere wie PEG. Beispielsweise konnte Maisel et al. zeigen, dass PEGylierte Nanopartikel mit einer Größe von 200 nm die Mukosa des Dickdarms in Ex-vivo- und In-Vivo-Untersuchungen überwinden konnten, wohingegen unmodifizierte Nanopartikel in der Mukusschicht oder im Darmlumen verblieben [228].

Zur Generierung der mukopermeablen „Nanopartikel WWU“ wurde **PEG** verwendet. Die Messung des Zetapotentials wies ohne PEGylierung eine durchschnittliche Oberflächenladung von - 34,8 mV auf, nach der PEGylierung lag diese bei - 36 mV. Die besonderen Eigenschaften von PEG sind damit zu erklären, dass es durch die Oberflächenmodifikation mit PEG zur Bildung einer dichten bürstenartigen Oberfläche kommt, die die negative Grundladung von PLGA-Nanopartikel abschirmen können, was zu einer

Verringerung der Wechselwirkungen mit der Mukusschicht führt [131,132]. Die generierten Nanopartikel weisen allerdings keine Änderung der Oberflächenladung auf, was ein Hinweis auf eine unzureichende PEGylierung sein könnte. Um Nanopartikel mit nahezu ladungsneutralen Eigenschaften zu generieren, wäre eine Optimierung des Molekulargewichts und der Konzentration des verwendeten PEG nötig. Das zweite nanopartikuläre Arzneistoffträgersystem in der Gruppe „Nanopartikel WWU“ basiert ebenfalls auf PLGA und einer PEGylierten Oberfläche, weist aber zudem in der Partikelmatrix ein lichtresponsives Polymer auf. Diese Nanopartikel weisen ein Zetapotential von durchschnittlich -17 mV auf, was der angestrebten neutralen Oberflächenladung näherkommt. Auch hier ist, ähnlich wie bei den Chitosan-Nanopartikeln, die Stabilität der Nanopartikel-Suspension gegenüber der Oberflächeneigenschaften abzuwägen. PEGylierte Nanopartikel haben mukopermeable Eigenschaften aufgrund einer möglichst neutralen Oberflächenladung [131,132]. Diese Eigenschaft führt allerdings gleichzeitig zu einer Verringerung der Stabilität der Nanopartikel in einer Suspension. Im Allgemeinen kann die Stabilität von Nanopartikeln durch Lyophilisierung verlängert werden. Bei diesem Prozess wird der Probe, durch Gefriertrocknung unter Vakuum, Wasser entzogen. Dadurch kann die Nanopartikel-Suspension in einen Feststoff mit einer hohen Stabilität überführt werden [229]. Die mukopermeablen Nanopartikel der Gruppe „Nanopartikel IBMT“ wurden mit dem Polymer **Pluronic® F127** modifiziert. Auch diese sollten nach der Oberflächenbeschichtung eine möglichst neutrale Oberflächenladung aufweisen. Allerdings liegt diese, auch bei den mit F127 oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln, bei $-41,7$ mV. Somit konnte weder bei den PEGylierten Nanopartikeln noch bei den mit F127 oberflächenmodifizierten Nanopartikeln ein Zetapotential im neutralen Bereich festgestellt werden, woraus resultiert, dass eine Optimierung der eingesetzten Polymere und der verwendeten Synthesemethoden überdacht werden sollte. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit liposomale Nanopartikel mit der Gruppierung „Nanopartikel biolitec®“ untersucht. Diese basieren auf Phospholipiden und weisen daher eine hohe Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit auf [230]. Liposomen sind ein klinisch etabliertes Wirkstoff-Transportsystem, das eine hohe strukturelle Flexibilität aufweist und in das bekanntermaßen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Arzneistoffe inkorporiert werden können [74,231]. Eine große Limitation von Liposomen ist deren geringe Stabilität im Gastrointestinaltrakt. Liposomen sind im Gastrointestinaltrakt der Magensäure, Gallensalze und Pankreaslipasen ausgesetzt. Diese führen zu einer Zerstörung der Lipidstruktur, wodurch die Freisetzung des Wirkstoffes ausgelöst wird. Die untersuchten Liposomen wiesen eine stark negativ geladene Oberfläche, mit einem durchschnittlichen Wert von $-59,6$ mV, auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Liposomen eine hohe Stabilität in der Suspension aufweisen. Neben der Oberflächenmodifizierung spielt auch die Größe von Nanopartikeln eine entscheidende Rolle bei der Mukopermeation und Akkumulation im Tumorgewebe. Neben den

interaktiven Barriere-Eigenschaften der Mukusschicht, die zu Interaktionen zwischen Substanzen und Partikeln aufgrund von Ladungsunterschieden führt, weist die Mukusschicht zudem sterische Barriere-Eigenschaften auf. Dabei agiert die Mukusschicht aufgrund ihrer Netzstruktur wie ein Größen-Ausschlussfilter. Die Maschengröße beträgt hierbei zwischen 100 nm bis hin zu mehreren Mikrometern. Dies führt dazu, dass kleinere Moleküle und Partikel leichter durch die Mukusschicht permeieren können. Die bevorzugte Nanopartikelgröße für die nanomedizinische Anwendung beträgt ≤ 200 nm [232]. Die „Nanopartikel WWU“ wurden bewusst in zwei Größenbereichen von 100 und 200 nm hergestellt, um eine Untersuchung des Einflusses der Größe zu ermöglichen. Die „Liposomen biolitec®“ und „Nanopartikel IBMT“ sowie die „Nanopartikel WWU“ im Größenbereich von 100 nm sind insgesamt ≤ 200 nm und eignen sich daher für die nanomedizinische Anwendung. Zur Bestimmung der Größenverteilung, wurde der PDI gemessen. Die liposomalen Nanopartikel haben einen PDI von 0,181 und die mit Chitosan modifizierten Nanopartikel von 0,128. Bei den anderen nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen konnte ein PDI in einem Bereich von $< 0,1$ gemessen werden, was auf eine monodisperse Nanopartikelsuspension hinweist [233]. Im Allgemeinen ist der PDI eine Messgröße die verschiedenen Schwankungen der Nanopartikelsuspension, wie z.B. Aggregations-, Segregations- und Degradationsprozessen unterliegt. Daher gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Morphologie und Größe von Nanopartikeln mit dem PDI [234]. Insgesamt hängt daher die Eignung von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen für den Wirkstofftransport *in vivo* unter anderem von deren durchschnittlichem Durchmesser, dem PDI und der Oberflächenladung, die Rückschlüsse auf die Stabilität erlauben, ab. Die Kontrolle und Validierung dieser Parameter ist daher von entscheidender Bedeutung für die effektive klinische Anwendung von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen [235].

5.3 Screening-Modelle

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten nanopartikulären Arzneistoffträgersysteme wurden nach der physikochemischen Charakterisierung mittels zellulärer Screening-Modelle biologisch charakterisiert. Im Fokus dieser Untersuchungen stand die Prüfung der **zytotoxischen Eigenschaften** der Nanopartikel sowie die Untersuchung des **induzierten phototoxischen Effekts** und der **Dunkeltoxizität** der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren. Um diese für therapeutische Zwecke einsetzen zu können, müssen unerwünschte toxische Nebenwirkung ausgeschlossen und die Wirksamkeit des inkorporierten Photosensibilisators sichergestellt werden. Zur Untersuchung der Dunkeltoxizität wurden Zellen verwendet, die mit bestimmten Konzentrationen des Photosensibilisators inkubiert, aber nicht bestrahlt wurden. Die Zytotoxizität der Nanopartikel sowie die Dunkel- und Phototoxizität der freien und nanopartikulär-inkorporierten

Photosensibilisatoren wurde durch die Bestimmung der Zellviabilität beurteilt. Als Grenze für die Deklaration eines toxischen Effekts wurden die Angaben der DIN EN ISO 10993-5 verwendet. Diese Grenze liegt bei einer Verringerung der Zellviabilität von $\leq 70\%$. Als Screening-Modelle wurden 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroide aus den Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 verwendet. Die Zelllinie HuTu-80 wurde aus einem duodenalen Adenokarzinom generiert und eignet sich daher zur Simulation der zu behandelnden Tumorzellen [190]. Die Zelllinie HT29 stammt von einem kolorektalen Adenokarzinom ab [191]. Aus dieser Zelllinie wurde die Mukus produzierende Zelllinie HT29-MTX-E12 differenziert [236]. Mit dieser können Tumorzellen, die von einer Mukusschicht bedeckt sind, nachgebildet werden. Um den Einfluss der Mukusschicht auf die freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren untersuchen zu können, wurde die Zelllinie HT29 zum Vergleich mitgeführt. Die Kultivierungszeit und die Anzahl der ausgesäten Zellen für die 2D-Monolayer-Untersuchungen wurde an die jeweilige Populationszeit der Zelllinien angepasst. Diese betragen für die Zelllinie HuTu-80 26 h [190], für die Zelllinien HT-29 und HT29-MTX-E12 48 h [191]. Generell hängt die Wirkung von Arzneistoffen auf eine Zelllinie von mehreren Faktoren ab, wobei die Kultivierung vor der Applikation der zu testenden Substanz eine entscheidende Rolle spielt. Die Zellen benötigen nach der Trypsinierung eine gewisse Zeit, um sich zu erholen. In dieser Zeit wird das Zytoskelett wiederaufgebaut, die extrazelluläre Matrix abgesondert und die Verknüpfungen zwischen den Zellen wiederhergestellt. Diese Vorgänge sind nötig, dass die Zellen wieder einen neuen Zyklus beginnen können [237]. Die dafür benötigte Zeit ist zelllinienabhängig, daher wurde für die Kultivierungszeit der 2D-Monolayer-Zellkulturen vor Beginn der Untersuchungen die Populationszeit der Zelllinien gewählt, um eine intakte und vitale Ausgangskultur für die Untersuchungen zu haben.

Im ersten Schritt wurden Untersuchungen mit dem Photosensibilisator mTHPC durchgeführt, um den **dunkeltoxischen** und induzierten **phototoxischen** Effekt auf die **2D-Monolayer-Zellkulturen** der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 zu bestimmen. Hierzu wurde eine mTHPC-Konzentrationsreihe (0,25 bis 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$) für 1 h, 3 h und 24 h inkubiert. Die Ergebnisse zeigten insgesamt, dass die Dunkeltoxizität und die induzierte Phototoxizität von mTHPC von der Zelllinie, der Konzentration des Photosensibilisators und der Inkubationszeit abhängen. Dabei konnte für die Zelllinien HuTu-80 und HT29 ab einer mTHPC-Konzentration von 0,25 $\mu\text{mol} / \text{L}$ und einer Inkubationszeit von 24 h eine Dunkeltoxizität detektiert werden. Für die Zelllinie HT29-MTX-E12 konnte ein dunkeltoxischer Effekt bei einer Inkubationszeit von 24 h erst ab einer mTHPC-Konzentration von 75 $\mu\text{mol} / \text{L}$ festgestellt werden. Für die Inkubationszeiten 1 h und 3 h konnte über die gesamte Konzentrationsreihe kein dunkeltoxischer Effekt detektiert werden. Das Phänomen der zelllinien- und konzentrationsabhängigen Dunkeltoxizität konnte auch von Lange et al. [238] in einer

Untersuchung des Photosensibilisators mTHPC, unter Verwendung von fünf menschlichen Krebszelllinien aus PDT-relevantem Gewebe, d.h. Lunge (A-427), Mundhöhle (BHY), Speiseröhre (KYSE-70), Blase (RT-4) und Gebärmutterhals (SISO), nachgewiesen werden. Bei einer Inkubationszeit von 24 h konnte eine Verringerung der Zellviabilität von $< 6\%$ bei einer mTHPC-Konzentration von $0,5\ \mu\text{mol} / \text{L}$ festgestellt werden. Wobei sich die Zellviabilität mit einer steigenden mTHPC-Konzentration von $0,5$ bis $10\ \mu\text{mol} / \text{L}$ bis hin zu keiner messbaren Zellviabilität verringerte. Auch hier wiesen die verschiedenen Zelllinien eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber mTHPC auf. Die Untersuchungen der induzierten Phototoxizität bestätigen die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien auf den Photosensibilisator mTHPC. So konnte für die Zelllinie HuTu-80 ab einer Konzentration von $0,25\ \mu\text{mol} / \text{L}$ und einer Inkubationszeit von 3 h ein phototoxischer Effekt gemessen werden. Bei den Zelllinien HT29 zeigte sich dieser Effekt bei einer Inkubationszeit von 3 h ab einer Konzentration von $1\ \mu\text{mol} / \text{L}$ und bei der Zelllinie HT29-MTX-E12 ab einer Konzentration von $5\ \mu\text{mol} / \text{L}$. Daraus ergibt sich die höchste Sensitivität gegenüber dem Photosensibilisator mTHPC für die Zelllinie HuTu-80. Analog zu den 2D-Monolayern wurden die Untersuchungen mit **3D-Tumorsphäroiden** der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 durchgeführt. 3D-Tumorsphäroide können aufgrund ihrer Eigenschaften, humane Mikrometastasen im menschlichen Körper zu simulieren, ein verbessertes Modell sein, um die Wirksamkeit von Krebsmedikamenten zu untersuchen [147]. Bei den Untersuchungen der mTHPC-Konzentrationsreihe konnte ein **dunkeltoxischer** Effekt des Photosensibilisators mTHPC für die Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80, bei einer Konzentration von $100\ \mu\text{mol} / \text{L}$ und den Inkubationszeiten 3 h und 24 h, festgestellt werden. Die Tumorsphäroide der Zelllinien HT29 und HT29-MTX-E12 wiesen unabhängig von der mTHPC-Konzentration und der Inkubationszeit keine dunkeltoxischen Effekte auf, was einen Hinweis auf die verringerte Sensitivität von 3D-Tumorsphäroiden gegenüber Krebsmedikamenten gibt. Ein **phototoxischer** Effekt konnte bei den 3D-Tumorsphäroiden bei einer Inkubationszeit von 24 h ab $5\ \mu\text{mol} / \text{L}$ bei allen Zelllinien detektiert werden. Bei einer Verringerung der Inkubationszeit auf 3 h zeigte sich erneut, dass die Zelllinie HuTu-80 die höchste Sensitivität gegenüber mTHPC aufwies. Die Untersuchungen der mTHPC-Konzentrationsreihe unter Verwendung von 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden wurden durchgeführt, um die Inkubationszeiten und die Konzentration des Photosensibilisators festzulegen. Daher wurden für die folgenden Versuche eine Photosensibilisator-Konzentration von $5\ \mu\text{mol} / \text{L}$ und die Inkubationszeiten 3 h und 24 h gewählt.

Der Photosensibilisator mTHPC ist ein hoch wirksamer Arzneistoff für die PDT, der bereits erfolgreich zur Behandlung von Nacken- und Kopftumoren in der Klinik eingesetzt wird [88,89]. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass mTHPC eine anti-tumorale Wirksamkeit gegenüber den getesteten Darmkarzinom-Zelllinien aufweist. Zudem wurde die

Wirksamkeit weiterer **neu synthetisierter Photosensibilisatoren** getestet. Diese Untersuchungen wurden teilautomatisiert mit dem System Tecan Evo 200 durchgeführt. Die Automatisierung von Wirkstoff-Screenings ist ein wichtiger Punkt in der pharmazeutischen Forschung. Aufgrund der Vielzahl neu synthetisierter, potenziell neuer Arzneistoffe bietet ein automatisierter Testablauf viele Vorteile. Es kann eine erhöhte Anzahl von Substanzen parallel getestet werden, eine Verbesserung der Pipettiergenauigkeit erreicht werden und eine große Arbeitserleichterung erzielt werden. Eine Limitation der Automatisierung ist, die meist erhöhte, benötigte Menge der Testsubstanzen im Vergleich zu manuell durchgeführten Arzneistoff-Screenings. In der vorliegenden Arbeit wurden nur die neu synthetisierten Photosensibilisatoren automatisiert getestet, da lediglich diese in einer ausreichenden Menge vorlagen. Die Ergebnisse zeigten, dass insgesamt bei allen sechs neu synthetisierten Photosensibilisatoren bei den Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 keine **Dunkeltoxizität** gemessen werden konnte. Ein **phototoxischer** Effekt der vergleichbar mit dem Effekt von mTHPC ist, konnte bei zwei neu synthetisierten Photosensibilisatoren (BLC 2175 und BLC 5152) gemessen werden. Diese wurden zur Beladung der „Liposomen biolitec[®]“ verwendet. Als Grund hierfür konnte vom Hersteller (biolitec[®] AG) die niedrige Licht-Absorbierbarkeit der Photosensibilisatoren im Bereich von 652 nm genannt werden. Die Anregung mit der verwendeten Bestrahlungseinheit konnte somit die neu synthetisierten Photosensibilisatoren BLC 1157, BLC 6151, BLC 6166 und BLC 6167 nicht ausreichend aktivieren. Die optimale Aktivierung für diese Photosensibilisatoren wird durch eine Mischung aus Licht aller Wellenlängen (weißes Licht) erreicht. Aufgrund der Tatsache, dass das therapeutische Fenster für die Behandlung von Tumoren mit der PDT in einem Wellenlängenbereich von 620 bis 850 nm liegt, wurden diese Photosensibilisatoren in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

Die Untersuchungen der verschieden beladenen und unbeladenen Nanopartikel wurde mit einer Photosensibilisator-Konzentration von 5 µmol / L und den Inkubationszeiten 3 h und 24 h durchgeführt. Diese wurden auf der Grundlage der Untersuchungen des freien Photosensibilisators mTHPC festgelegt. Beim Vergleich dieser Versuchsparameter mit den Literaturwerten konnten Übereinstimmungen gefunden werden [113,239,240]. Ein konkretes Beispiel ist eine Studie von Bœuf-Muraille et al. [241] bei der die Wirkung von freiem mTHPC und mit mTHPC beladene PLGA-Nanopartikel auf Gliom-Zellen (Zelllinie C6) untersucht wurden [241]. Die Untersuchungen ergaben eine Verringerung der Zellviabilität um 50 % nach der Bestrahlung bei einer mTHPC Konzentration von 5,89 µmol / L. Bei einer Konzentration von 20 µmol / L war nahezu keine Zellviabilität detektierbar.

Die Untersuchungen der verschiedenen **nanopartikulären Arzneistoffträger** mit den Gruppierungen „Nanopartikel WWU“, „Liposomen biolitec[®]“ und „Nanopartikel IBMT“ konnten einen dunkeltoxischen Effekt ausschließen und einen induzierten phototoxischen Effekt

beweisen. In der Literatur wird häufig beschrieben, dass die Wirksamkeit von Photosensibilisatoren durch eine Inkorporation in Polymer- und Liposomal-basierten Nanopartikeln bis zu 80 % vermindert wurde [113,241,242]. In den vorliegenden Untersuchungen wurde freies mTHPC zum Vergleich des induzierten phototoxischen Effekts mitgeführt. Dabei war bei allen durchgeführten Messungen der induzierte phototoxische Effekt des inkorporierten Photosensibilisators mit dem freien Photosensibilisator vergleichbar. Daher konnte eine Verminderung des phototoxischen Effekts durch die Inkorporation des Photosensibilisators in die Nanopartikel nicht bestätigt werden. Anhand des Screenings mit den 2D-Monolayer-Zellkulturen konnten hoch wirksame, freie und nanopartikuläre Photosensibilisatoren identifiziert werden. Diese wurden im nächsten Schritt mit 3D-Tumorsphäroiden untersucht.

2D-Monolayer-Zellkulturen und **3D-Tumorsphäroide** unterscheiden sich gravierend in ihrer morphologischen Struktur, die einen großen Einfluss auf die Untersuchung von Arzneistoffen haben können. Einer der größten Unterschiede ist die Arzneistoff-Exposition. Bei 2D-Monolayer-Zellkulturen haben alle Zellen, aufgrund ihres einschichtigen Wachstums, den gleichen Zugang zu den im Umgebungsmedium befindlichen Substanzen. 3D-Tumorsphäroide hingegen entwickeln ab einer Größe von etwa 500 $\mu\text{mol} / \text{L}$ einen nekrotischen Kern, der beim Wachstum durch eine mangelnde Versorgung mit Nährstoffen im Sphäroidkern und eine gleichzeitige Anhäufung von Abbauprodukten entsteht. Die morphologischen Eigenschaften haben direkten Einfluss auf die Wirkstoffpenetration, die eine verringerte Sensitivität von Krebsmedikamenten im Vergleich zu 2D-Monolayer-Zellkulturen zur Folge haben kann [143]. Durch die **Quantifizierung** der aufgenommenen Wirkstoffmenge konnte dieser Effekt bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Aufnahme der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren nach einer Inkubationszeit von 3 h bei den Tumorsphäroiden im Vergleich zu den 2D-Monolayer-Zellkulturen deutlich geringer war. Ein direkter Vergleich der aufgenommenen Menge der Photosensibilisatoren in die 2D-Monolayer Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden war nicht möglich, da die Zellzahlen aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der Zellmodelle nicht direkt vergleichbar sind. Bei Betrachtung der 2D-Monolayer-Zellkulturen verringerte sich die aufgenommene Menge des Photosensibilisators nach 24 h in den 2D-Monolayer-Zellkulturen um durchschnittlich 0 % bis 61 %. Dies weist auf einen zellulären Prozess hin, der dazu führte, dass der aufgenommene, freie und nanopartikuläre Photosensibilisator aus der Zelle ausgeschleust wurde. Dies könnte auf die Aktivität von Efflux-Pumpen zurückzuführen sein, die auf zellulärer Ebene für das Ausschleusen von Molekülen aus der Zelle zuständig sind. So werden häufig Studien durchgeführt, die parallel die zelluläre Aufnahme und den Zell-Efflux untersuchen. Dabei wird die Akkumulation von Arzneistoffen in Zellen aus der Summe der zellulären Aufnahme (z.B. durch Endozytose) und dem zellulären Efflux gebildet [243,244]. Ein Beweis dafür ist die

erhöhte Arzneistoff-Akkumulation durch eine Inhibierung der Efflux-Pumpen. So konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Efflux-Pumpen zu einer deutlich erhöhten Akkumulation von Arzneistoffen im Tumorgewebe führte [245]. Daraus resultierte, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Akkumulation des Photosensibilisators in den Tumorzellen führte. Des Weiteren konnte eine signifikant verbesserte Aufnahme der freien Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 in den liposomalen Formulierungen detektiert werden. Hochwirksame Photosensibilisatoren sind meist schwer wasserlöslich, was zu einer Agglomeration führen kann, die die zellulare Aufnahme verhindert. Im Allgemeinen kann die Löslichkeit durch Inkorporation in ein nanopartikuläres Arzneistofftransportsystem verbessert werden, was zu einer erhöhten Akkumulation in Zellen führen kann [246]. Des Weiteren bestehen Liposomen aus einer zellmembranähnlichen Phospholipid-Doppelschicht. Aufgrund dieser Ähnlichkeit kann die Aufnahme von Wirkstoffen in die Zelle erleichtert werden [116].

Die unterschiedlichen Eigenschaften der 2D-Monolayer-Zellkulturen und der 3D-Tumorsphäroide spiegelte sich auch in der Wirksamkeit aller in der Arbeit verwendeten freien Photosensibilisatoren, liposomalen und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren wider. Die Ergebnisse zeigten einen deutlich verringerten **photoxischen** Effekt der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren auf die verwendeten 3D-Tumorsphäroide. Dabei konnte nach einer Inkubationszeit von 3 h kein phototoxischer Effekt erreicht werden. Erst nach einer Inkubationszeit von 24 h lag eine verringerte Zellviabilität zwischen 21 % bis 74 % vor. Diese lag zum Vergleich bei den 2D-Monolayer-Zellkulturen nach einer Inkubationszeit von 3 h durchschnittlich bei einer Verringerung von 48 % bis 69 % und nach 24 h bei -73 % bis - 82 %. Der verringerte phototoxische Effekt der 3D-Tumorsphäroide könnte auf die Morphologie zurückzuführen sein. Die vorliegenden Versorgungs- und Abbaugradienten führen neben einer verringerten Wirkstoffpermeation auch zu einer sinkenden Sauerstoffkonzentration von der äußeren Schicht des Tumorsphäroids bis zum Inneren. Da die Wirksamkeit des Photosensibilisators neben der Aktivierung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge auch von in der Zelle vorhandenem Sauerstoff abhängig ist, kann dies zu einer Minderung des phototoxischen Effekts in den 3D-Tumorsphäroiden führen [74,77]. Bei einem Vergleich zweier Studien, bei denen der phototoxische Effekt des Photosensibilisators Aminolävulinsäure (ALA) auf 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden der Zelllinie A549 (Lungen Adenokarzinom) untersucht wurden, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Auch hier konnte eine Verminderung des phototoxischen Effekts auf die 3D-Tumorsphäroide im Vergleich zu den 2D-Monolayer-Zellkulturen detektiert werden [247,248]. Die Ergebnisse der Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit zeigen insgesamt, dass die Nutzung von 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden sinnvoll für die Durchführung von Wirkstoff-Screenings ist.

Die Messung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Arzneistoffen in kultivierten Zellen in Kombination mit Zytotoxizitäts-Tests, bei denen immortalisierte Zelllinien mit den Arzneistoffen in Kontakt kommen, bildet seit Jahrzehnten die Grundlage in der präklinischen Bewertung von Krebsmedikamenten [249]. Sie ermöglichen ein schnelles und kostengünstiges Wirkstoff-Screening bei dem eine große Anzahl verschiedener Krebszelllinien getestet werden können [250]. Um einen optimalen anti-tumoralen Effekt mit der PDT zu erreichen, müssen die benötigte Inkubationszeit und Laserlicheinstellungen ermittelt werden. Die spezifische Absorptionswellenlänge der Photosensibilisatoren konnte durch die Verwendung einer klinisch genutzten Bestrahlungseinheit erreicht werden. Diese ermöglichte die Aktivierung des Photosensibilisators, um zytotoxische reaktive Sauerstoffspezies zu erzeugen. Mit den im ersten Schritt genutzten In-vitro-Screening-Modellen können alle Parameter wie die Konzentration des Photosensibilisators, Inkubationszeit und Laserlichtintensität einfach an die Eigenschaften des Photosensibilisators und der verwendeten Zelllinien angepasst werden. Die Messung der Zellviabilität ermöglicht dabei eine Quantifizierung der zytotoxischen Effekte auf Grundlage der zellstoffwechsel-aktiven Zellen. Die Screening-Untersuchungen können jedoch nur zu einer ersten Identifizierung von vielversprechenden Photosensibilisatoren und nanopartikulären Formulierungen genutzt werden. Eine Aussage über die mukoadhäsiven und mukopermeablen Eigenschaften der nanopartikulären Arzneistoffträgersysteme kann mit diesen Methoden nicht gemacht werden. Wobei die statischen Inkubationsbedingungen sowohl für die Beurteilung des Transportes zum Wirkort als auch für die Untersuchung der zellulären Aufnahme des Photosensibilisators schlecht geeignet sind. Auch die Übertragbarkeit auf das In-vivo-Verhalten ist dadurch stark limitiert und bedarf daher weiterer Untersuchungen.

5.4 Spezifische präklinische Testsysteme

Der Prozess der Entwicklung eines neuartigen Medikaments ist zeitaufwändig und kostspielig. Um die Chancen für den erfolgreichen Abschluss einer klinischen Studie, die zur Zulassung eines neuen Medikaments führt, zu erhöhen, ist die Wahl geeigneter präklinischer Modelle von größter Bedeutung [251,252]. Daher ist die Entwicklung neuer und verbesserter Testsysteme, die in der Lage sind die In-vivo-Situation zu simulieren, eine weltweite Herausforderung für die präklinische Forschung [143].

In der vorliegenden Arbeit sollten zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen, nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme zum Transport von Photosensibilisatoren zum Wirkort erforscht werden. Hierzu wurden unterschiedliche nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme auf Basis von Polymilch-co-glykolsäure (PLGA) und Liposomen synthetisiert. Diese wurden zunächst in Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit mit standardisierten In-vitro-Testsystemen unter Verwendung von 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden auf ihre

Wirksamkeit und auf unerwünschte toxische Effekte untersucht. Der Fokus der zu entwickelnden Arzneistoffträgersysteme lag darauf, dass diese mukoadhäsive und mukopermeable Eigenschaft aufweisen sollten, um ein gezieltes Tumor-Targeting zu erreichen. Zur Untersuchung dieser spezifischen Eigenschaften wurden neue präklinische Testmodelle entwickelt und etabliert: (i) Ein mikrofluidisches Mukusbarriere-Modell zur Untersuchung der Mukopermeation, (ii) ein mikrofluidisches Darmtumor-Modell zur Erforschung der mukoadhäsiven Fähigkeiten in einem peristaltischen Fluss und (iii) ein vaskularisiertes Darmtumor-Modell zur Überprüfung der Arzneistoff-Akkumulation und der biologischen Wirksamkeit.

5.4.1 Mikrofluidisches Mukusbarriere-Modell

Das Darmepithel ist mit einer Mukusschicht bedeckt und bildet eine physikalische Barriere für Moleküle und Partikel [24,25]. Krebszellen, insbesondere Adenokarzinome, exprimieren große Mengen Mukus. Dabei geht man davon aus, dass Krebszellen, ähnlich wie normale Epithelien, Mukus zum Schutz vor der lokalen Umgebung nutzen [253]. Daher müssen Arzneistoffe die Mukusschicht überwinden, um das Tumorgewebe erreichen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme hergestellt, die durch **Mukoadhäsion** oder **Mukopermeation** einen gezielten Transport der Arzneistoffe (Photosensibilisatoren) über die Mukusschicht ermöglichen. Um die Permeation der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren über die Mukusschicht zu untersuchen, wurde ein mikrofluidisches Mukusbarriere-Modell entwickelt.

Der mikrofluidische Mukus-Chip bietet eine einfache Technik zur Untersuchung der Permeation von Substanzen und partikulären Systemen über eine Mukusschicht. Er besteht prinzipiell aus einer apikalen Seite, die das Darmlumen simuliert und einer basolateralen Seite, die die Darmepithelschicht bzw. das Darmtumorgewebe reflektiert. Beide Seiten sind durch eine Mukusschicht voneinander getrennt. Zusätzlich wurde ein Fluss auf der basolateralen Seite angelegt, der den Blutkreislauf des Darmepithels bzw. des Tumorgewebes simulieren sollte. Zur Bestimmung der metrischen Parameter wie Größe und Volumen wurden kommerziell verfügbare Permeationsmodelle wie die Ussing-Kammer und permeable Filtereinsätze zur Orientierung verwendet. Je nach System und verwendeten Einsätzen arbeiten kommerziell erhältliche Systeme wie die Ussing-Kammer und permeable Filtereinsätze mit einer Permeationsfläche im Bereich zwischen 0,2 bis 1,26 cm² [153,254–256]. Um eine Vergleichbarkeit zwischen diesen Systemen und dem entwickelten Mukus-Chip-Modell zu erreichen, wurde eine apikale Mukusschicht-Fläche von 0,75 cm² definiert. Ein oft beschriebenes Problem bei der Nutzung von intestinalen Permeations-Modellen ist die geringe Wiederfindungsrate der applizierten Substanzen. Als Gründe dafür werden die Adsorption der Substanzen an der Oberfläche des Testsystems oder eine Bindung an Filtermembranen genannt [257,258]. Ein häufig verwendetes Modell zur Untersuchung der intestinalen

Permeation von Arzneistoffen ist das Caco-2-Modell in Verbindung mit permeablen Filtereinsätzen. In einer Studie, in der im Caco-2-Modell die Wiederfindungsrate von neun verschiedenen Substanzen untersucht wurde, lag diese zwischen 14,5 bis 125 % [259]. Bei der Entwicklung von Arzneistoffen in denen Permeations-Modelle verwendet werden, wird eine Wiederfindungsrate im Bereich von 80 bis 120 % empfohlen, um die Qualität und die Richtigkeit der Untersuchungen zu gewährleisten [260]. Um sicher zu stellen, dass das Mukus-Chip-System eine Permeation der zu untersuchenden Kontrollsubstanzen sowie freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren ermöglicht, wurde die Permeation ohne eine Mukusschicht durchgeführt. Dabei konnte für alle Substanzen eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 89,2 % bis 97,1 % ermittelt werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Konstruktion des Mukus-Chip-Modells eine hohe Eignung für Permeations-Untersuchungen aufweist. Die Dicke der Mukusschicht sowie die physiologischen Bedingungen *in vivo* hängen von der Lage im Körper und ihrem Ursprung ab. Die Schichtdicke von Mukus im Dünndarm wird mit 170 bis 480 μm angegeben, wobei sie vom oberen Abschnitt des Dünndarms bis zum unteren Abschnitt zunimmt [32]. Untersuchungen zur Schichtdicke von menschlichem Mukus im Dünndarm gibt es selten in der Literatur, häufig basieren die Untersuchungen auf Tierversuchen. Bei einer Studie von Varum et al. [261] wurde die Mukusschicht-Dicke von Ratten, Hasen und Schweinen miteinander verglichen. Dabei wurde eine hohe Variabilität der Mukusschicht-Dicke entlang der Darmabschnitte zwischen den Arten gefunden. Kleine Versuchstiermodelle, wie Ratten, unterschieden sich vom Menschen am meisten, während das Schwein der Mukusschicht-Dicke entlang des Darms des Menschen am ehesten ähnelte. Dies macht deutlich, dass die Wahl des Tiermodells einen Einfluss auf die Adsorption und Permeation von Arzneistoffen haben kann. Insbesondere dann, wenn die Mukusschicht eine wichtige Rolle für das erwartete Ergebnis spielt, wie beispielsweise in oralen Arzneimittelpermeationsstudien oder der Bewertung von Verabreichungssystemen für mukoadhäsive Medikamente. Das entwickelte Mukus-Chip-System stellt daher einen möglichen Ersatz für Untersuchungen der Mukuspermeation in Tiermodellen dar. Die Konstruktion des Mukus-Chips ermöglicht eine Variation der Mukusschicht-Dicke und somit eine Anpassung an die zu simulierende Region im Körper. Zudem können sowohl native, bioähnliche und synthetische Mukusproben verwendet werden. Für die Untersuchungen der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren wurde eine Mukusschicht-Dicke von 200 μm gewählt, da die Mukusschicht im Dünndarm reflektiert werden sollte. Als Mukus-Quelle wurde nativer porciner Mukus verwendet. Porciner Mukus hat eine hohe Verfügbarkeit und gilt als gutes Modellsystem im Vergleich zum menschlichen Mukus [261,262]. Darüber hinaus enthält er, im Gegensatz zu künstlich oder zellulär erzeugtem Schleim, Proteasen und andere Verdauungsenzyme, die einen Einfluss auf die zu untersuchenden Verbindungen haben können [26]. Der native Ursprung beinhaltet jedoch auch eine hohe Variation des

Schleims im Vergleich zu bioähnlichem Mukus oder von Zellen produziertem Mukus. Dieser Aspekt wurde durch rheometrische Untersuchungen einer großen Anzahl von Schleimproben verifiziert. Hierzu wurden native porcine Mukusproben von 24 Schweinen isoliert und die Viskosität mittels Rheometer untersucht. Die getesteten Mukusproben wiesen eine durchschnittliche Viskosität von $38,28 \pm 12,50 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ auf. Die gemessenen Viskositätswerte variierten in einem Bereich von $4,17 \pm 0,45 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ und $60,34 \pm 2,25 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Bei einer Studie, in der die Viskosität von humanen Mucosa-Proben aus dem Ileum untersucht wurden, konnte eine Viskosität im Bereich von 11 bis $163 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ gemessen werden [263]. Damit konnten sowohl bei den eigenen Viskositätsmessungen der porcinen Mukusproben als auch bei der Studie der humanen Mukusproben eine hohe Varianz festgestellt werden. Die Viskosität der Mukusschicht ist abhängig vom pH-Wert, der Ionenstärke und dem Hydratationsgrad und ist damit besonders relevant für den Transport von Substanzen und partikulären Systemen [35]. Um die Studien unter konstanten Bedingungen durchführen zu können, wurde auf Basis der 24 Messwerte fünf Viskositätsklassen bestimmt und mit einem Histogramm deren Häufigkeit ausgewertet. Daraus ergab sich für die Permeationsstudien der freien und nanopartikulären Formulierungen, dass nur native porcine Mukusproben verwendet wurden, die eine Viskosität im Bereich von 30 - $45 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ aufwiesen. Im nächsten Schritt wurde die Permeation der Kontrollsubstanzen sowie der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren über die Mukusschicht untersucht. Hierzu wurden die Kontrollsubstanzen Koffein und FITC-Dextran sowie die freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren apikal auf die Mukusschicht pipettiert und über einen Versuchszeitraum von 3 h wurde alle 30 min eine basolaterale Probe entnommen und die enthaltene Substanzmenge mittels HPLC-Analyse detektiert. Koffein wurde aufgrund seiner mukopermeierenden Eigenschaften als **Positiv-Kontrolle** gewählt. Das gewählte FITC-Dextran-Molekül hat eine Größe von 70 kDa und ist daher aufgrund seiner Größe nicht in der Lage über die Mukusschicht zu permeieren. Daher wurde FITC-Dextran als **Negativ-Kontrolle** gewählt. Ein wichtiger Faktor zur Messung der Permeabilität von Verbindungen über eine Barriere ist die Membranintegrität. Beim Mukus-Chip-Modell wird der Schleim mit dem Mukus-Spatel in das Metallgitter gefüllt. Dies kann ein kritischer Punkt sein, da der Mukus ein heterogenes Hydrogel ist und die Integrität der Membran getestet werden muss. Geräte wie das Ussing-Kammer-System oder das cellZscope®-System nutzen den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER), der mittels Impedanzmessungen ermittelt wird, um die Membranintegrität zu ermitteln [153,264,265]. Dabei handelt es sich um eine quantitative Methode zur Messung der Integrität von Verbindungen in Zellkulturmodellen [266]. Das entwickelte Chipsystem verwendet Mukus ohne Epithel, daher sind Impedanzmessungen nicht möglich. Die Membranintegrität wurde daher durch den Einsatz von Kontrollsubstanzen wie Koffein und FITC-Dextran überwacht. Eine konstante Permeation in verschiedenen Experimenten wurde als bestehende

Membranintegrität gewertet. Es wurden sowohl Nanopartikel mit **mukoadhäsiven** als auch **mukopermeierenden** Eigenschaften im Mukus-Chip-System untersucht. Bei der Untersuchung der mukoadhäsiven „Nanopartikel WWU“ und „Nanopartikel IBMT“ die mit Chitosan bzw. Carbopol[®] modifiziert wurden, konnte keine Permeation des Photosensibilisators über den Versuchszeitraum von 3 h gemessen werden. Die Strategie bei der Verwendung von **mukoadhärierenden** Nanopartikel ist, dass diese in die Mukusschicht penetrieren und dort durch Hydrolyse eine Freisetzung des Photosensibilisators aus der Partikelmatrix stattfindet. Daher könnte ein Grund für die nicht vorhandene Permeation eine ungenügende Freisetzung des Photosensibilisators aus dem Nanopartikel sein. Die Versuchszeit von 3 h wurde auf der Grundlage der Verweildauer eines Medikaments im Dünndarm gewählt. Diese wird in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme und intestinalen Motilität mit 30 bis 180 min angegeben [267]. In Anbetracht der Wirkweise von mukoadhärierenden Nanopartikeln wäre eine Verlängerung der Versuchsdauer zu überdenken. Sowohl die Positivkontrolle Koffein als auch die **mukopermeierenden** „Nanopartikel IBMT“ die mit F127 modifiziert wurden und die „Liposomen biolitec[®]“ konnten innerhalb der Versuchszeit über die Mukusschicht permeieren. Eine Permeation der mukopermeierenden „Nanopartikel WWU“ mit einer PEG-Modifizierung konnte nicht festgestellt werden. Koffein und die „Nanopartikel IBMT“ F127-mTHPC-PLGA zeigten eine Permeation bei allen vier verwendeten Mukusproben und die liposomalen Nanopartikel LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 nur bei zwei Proben. Aufgrund der nativen Herkunft unterliegen die verwendeten Mukusproben einer hohen Individuumabhängigen Variabilität [226]. Bereits bei den rheologischen Messungen der nativen porcinen Mukusproben konnte eine hohe Variation der Viskosität festgestellt werden. Diese Variabilität kann zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Untersuchung der Permeabilität über die Mukusschicht führen. Insgesamt konnte durch die Untersuchungen mit dem neu entwickelten Mukus-Chip-System für die Nanopartikel F127-mTHPC-PLGA, LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 eine Permeation über die Mukusschicht nachgewiesen werden und somit deren angestrebte Eigenschaft der Mukopermeation bestätigt werden.

Substanzen oder partikuläre Systeme mit der Fähigkeit, die Darmbarriere zu überwinden, sind ein Schwerpunkt der pharmazeutischen Forschung. Bevor die Verbindungen das Darmgewebe erreichen, müssen sie die Mukusschicht überwinden. Zur Untersuchung der Permeation über die Mukusschicht wurde das Mukus-Chip-System entwickelt. Die Funktionalität konnte durch die Verwendung der Kontrollsubstanzen Koffein und FITC-Dextran bestätigt werden. Durch die Untersuchung der freien und nanopartikulären Formulierungen konnten mukopermeierende nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme identifiziert werden.

5.4.2 Mikrofluidisches Darmtumor-Modell

Die Verwendung von 3D-Tumorsphäroiden im Entwicklungsprozess eines Medikaments stellt eine Erweiterung zu herkömmlich verwendeten 2D-Monolayer-Zellkulturen dar. 3D-Tumorsphäroide sind in der Lage die gewebspezifische Struktur von In-vivo-Tumoren und die daraus resultierenden physiologischen Bedingungen zumindest teilweise zu reflektieren. Trotz dieser Eigenschaften bleibt eine große Limitation der Arzneistoffuntersuchungen mit 3D-Tumorsphäroiden: die statischen Versuchsbedingungen. Dabei werden in den Untersuchungen die Arzneistoffe direkt auf den 3D-Tumorsphäroid bzw. in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und sinken auf das Zellmodell ab. Der daraus entstehende direkte Kontakt der Zelloberfläche mit dem Arzneistoff kann eine erhöhte Aufnahme bewirken. Im Gegensatz dazu ist der Arzneistoff *in vivo* einer ständigen Bewegung ausgesetzt. Um diese Begebenheiten zu simulieren, wurde das mikrofluidisches Darm-Tumor-Modell entwickelt. Grundgedanke bei der Entwicklung des Darmtumor-Modells war, einen Darmtumor im Darmlumen zu simulieren der einem peristaltischen Fluss ausgesetzt ist. Hierfür wurde ein Chip-Modul aus den Materialien Polydimethylsiloxan (PDMS) und Glas aufgebaut. Zur Generierung der Kanalstrukturen wurde das flüssige PDMS in eine vorgefertigte Messingform gespritzt. Nach dem Aushärten wurde diese zum Verschließen der Kanäle mit einem Glasobjektträger mittels plasmagestützten Verbindens irreversible zusammengefügt. PDMS ist ein Material, das häufig für die Herstellung von mikrofluidischen Modellen genutzt wird [268,269]. Es ist biokompatibel, günstig, transparent, weist kaum Autofluoreszenz auf und kann mit einer Auflösung von bis zu wenigen Nanometern abgeformt werden [270–272]. Ein besonders wichtiger Punkt bei der Kultivierung von Zellkulturen ist die lebensnotwendige Begasung. Aufgrund der Gasdurchlässigkeit von PDMS kann eine Versorgung von kultivierten Zellen sichergestellt werden [273,274]. Ein Nachteil von PDMS ist, dass kleine hydrophobe Moleküle und Proteine an die PDMS-Oberfläche adsorbieren können [275]. Wie schon zuvor beschrieben, ist die Adsorption von Substanzen und Molekülen ein häufig beschriebenes Problem bei der Verwendung von Plastik-basierten Materialien in Verbindung mit Zellkulturen. Daher sollte dieser Aspekt im Allgemeinen bei Versuchen überdacht und gegebenenfalls validiert werden [257,258]. Als Darmtumor-Modell wurde ein 3D-Tumorsphäroid der Zelllinie HT29-MTX-E12 verwendet. Die Charakterisierung des 3D-Tumorsphäroids ermöglichte eine Visualisierung der für das Modell typischen vitalen Randschicht und dem nekrotischen Kern. Zudem konnte eine Mukusschicht und Mikrovilli auf der Oberfläche detektiert werden. Die morphologischen Eigenschaften des verwendeten 3D-Tumorsphäroids können dadurch in einem hohen Maß einen In-vivo-Darmtumor reflektieren. Dieser wurde direkt in den Kanal des Chip-Moduls eingebracht. Im Gegensatz zum Mukus-Chip-Modell, ist der 3D-Tumorsphäroid von der Flüssigkeit im Chip-System umschlossen. Die Flüssigkeit wurde in peristaltischen Bewegungen durch das Chip-Modul transportiert, womit die Darmmotilität reflektiert werden

konnte. Dies ermöglichte die Untersuchung der dynamischen Barriere-Eigenschaften die aufgrund peristaltischer Bewegungen im Darm durch einen horizontalen Fluss über der Mukusschicht entstehen [26]. Die sterischen Barriere-Eigenschaften der Mukusschicht begrenzen die **Adhäsion** und **Permeation** von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen stark [276]. Daher stellt sie ein wichtiger Punkt bei der Untersuchung von mukoadhäsiven und mukopermeablen Nanopartikeln dar. Die dynamischen Bedingung in mikrofluidischen Testsystemen lösen fluidischen Scherstress aus, der einen Einfluss auf die Gesundheit von Zellen haben kann [277]. Beispielsweise wurde in einer Untersuchung von HL60 Zellen (Leukämie-Zelllinie) die Auswirkungen von Scherstress auf die Zellviabilität untersucht. Diese war bei der Kultivierung der Zellen unter fluidischem Fluss im Vergleich zu den unter statischen Bedingungen kultivierten Zellen um 11,8 % verringert [278]. Zur Überprüfung dieses Einflusses auf die 3D-Tumorsphäroide wurde eine Untersuchung der Zellviabilität nach einer Inkubationszeit von 3 h untersucht. Um diese Werte vergleichen zu können, wurden die Versuche analog unter statischen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten innerhalb der Versuchszeit von 3 h keinen Einfluss auf die Zellviabilität der 3D-Tumorsphäroide. 3D-Tumorsphäroide weisen oft eine höhere Stabilität gegenüber 2D-Monolayer-Zellkulturen auf, was zu einer verringerten Reaktion auf den Scherstress führen kann. Zur Untersuchung der Fähigkeit der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren unter dynamischen Bedingungen an die Mukusschicht des 3D-Tumorsphäroids zu adhären, wurden diese im mikrofluidischen Darmtumor-Modell für 3 h inkubiert. Danach wurden zur Auswertung eine **Quantifizierung** der Substanzmenge mittels HPLC-Analyse und mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt. Bei der Quantifizierung konnte eine signifikante Verringerung der Substanzmenge im dynamischen System detektiert werden. Einzig bei den „Nanopartikeln IBMT“ mit der Carbopol® Modifizierung konnte keine signifikante Verringerung der Substanzmenge quantifiziert werden. Eine Verringerung der Aufnahme von Nanopartikeln in dynamischen Systemen wird in der Literatur oft beschrieben. Als Gründe hierfür werden Scherstress, verringerte Expositionszeit der einzelnen Nanopartikel mit der Zelloberfläche und die Bildung von Aggregaten unter fluidischen Bedingungen genannt [279,280]. Diese Bedingungen können mit dem neu entwickelten Darmtumor-Modell abgebildet werden. Dadurch kann die In-vivo-Situation simuliert werden und auf Grundlage der Ergebnisse eine zu erwartende Funktionalität abgeleitet werden. Eine weitere Fragestellung der Untersuchungen mit dem dynamischen Darmtumor-Modell war, ob die Adsorption des Photosensibilisators durch die Inkorporation in die liposomalen oder nanopartikulären Formulierungen verbessert werden konnte. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl mit den liposomalen als auch die nanopartikulären Formulierungen der Photosensibilisatoren eine signifikante Erhöhung der adsorbierten Menge erzielt werden konnte. Lediglich die nanopartikuläre Formulierung LrP-PEG-mTHPC-PLGA

konnte in den vorliegenden Untersuchungen keine signifikante Erhöhung der adsorbierten Menge des Photosensibilisators aufweisen. Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme können eingesetzt werden, um die Löslichkeit von Wirkstoffen zu verbessern [102,136–138]. Der Photosensibilisator mTHPC weist eine schlechte Löslichkeit aufgrund von stark hydrophoben Eigenschaften auf. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften kann es zu einer Bildung von Aggregaten kommen [100]. Dies kann zu einer verminderten Adhäsion der freien Photosensibilisatoren gegenüber den liposomalen und nanopartikulären Formulierungen geführt haben. Des Weiteren konnte durch die spezifischen Oberflächenmodifizierungen eine verbesserte Adhäsion erzielt werden. Zusätzlich wurden zur Beurteilung der Ergebnisse mikroskopische **Fluoreszenzaufnahmen** gemacht. Dabei wurden mit dem freien Photosensibilisator mTHPC und den nanopartikulären Formulierungen PEG-mTHPC-PLGA und LrP-PEG-mTHPC-PLGA, CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA behandelte Tumorsphäroide aus dem statischen System mit Tumorsphäroiden aus dem dynamischen System optisch verglichen. Eine Fluoreszenzanalyse der freien Photosensibilisatoren BLC 2175 und BLC 5152 sowie deren liposomalen Formulierungen waren in der vorliegenden Arbeit aufgrund der schwachen Fluoreszenz der Photosensibilisatoren nicht möglich. Eine deutlich sichtbare Fluoreszenz konnte unter den statischen Versuchsbedingungen für den freien Photosensibilisator mTHPC sowie für die mit mTHPC beladenen „Nanopartikel WWU“ PEG-mTHPC-PLGA und LrP-PEG-mTHPC-PLGA und für die „Nanopartikel IBMT“ CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA detektiert werden. Im dynamischen System konnte nur für die nanopartikulären Formulierungen CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA eine Fluoreszenz detektiert werden. Diese Nanopartikel weisen zum einen eine Carbopol® Oberflächenmodifizierung auf, die zu einer verstärkten Mukoadhäsion führen sollte, dass zweite nanopartikuläre Arzneistoffträgersystem wurde mit Pluronic® F127 modifiziert, um mukopermeable Eigenschaften zu erreichen. Ein Nachteil des vorliegenden Versuchsaufbaus ist, dass nicht zwischen einer Mukoadhäsion und Mukopermeation unterschieden werden kann. Daher wäre es von Vorteil eine Methode zu entwickeln, um die Mukusschicht der 3D-Tumorsphäroide abzutrennen und so die Substanzmenge im Mukus und in den Tumorzellen getrennt voneinander beurteilen zu können.

Insgesamt geht aus den vorliegenden Untersuchungen hervor, dass die nanopartikulären Arzneistoffträgersysteme CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA ein hohes Potenzial aufweisen *in vivo* an einen Dünndarmtumor zu adhären.

5.4.3 Vaskularisiertes Tumorsphäroid-Modell

Die Verwendung von mikrofluidischen Modellen in Kombination mit 3D-Tumorsphäroiden stellt eine Erweiterung zu statischen 2D-Zellkultursystemen dar. Ein wichtiger Aspekt, die diese Modelle meist nicht abbilden können, ist die Vaskularisierung eines In-vivo-Tumors. Die Tumor-Angiogenese stellt einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung eines Tumors dar.

Bevor sich Gefäße entwickeln, befindet sich der Tumor in einem ruhenden Stadium, in dem ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod vorliegt. In diesem Stadium kann der Tumor nicht wachsen und hat eine mikroskopische Größe. Erst durch die Angiogenese kommt es zur Bildung von Blutgefäßen, die den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, was letztendlich zum Wachstum des Tumors führt [281]. Der Einfluss eines systemischen Kreislaufs auf die Akkumulation eines Medikaments kann nicht mit standardisierten In-vitro-Modellen untersucht werden, daher werden meist Tiermodelle für diese Fragestellung eingesetzt. Diese sind allerdings mit einem großen Zeit- und Kostenaufwand verbunden und sollten in Anbetracht des Tierwohls kritisch überdacht werden [141]. Der Hühnerei-Test an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM) oder auch das Tumor-Chorion-Allantois-Membran-Modell kann als Bindeglied zwischen standardisierten Screening-Modellen und Tiermodell angesehen werden. Das HET-CAM Modell wird häufig eingesetzt, um die Angiogenese von Tumorzellen und die Wirksamkeit von Krebsmedikamenten zu untersuchen [166,282]. Dabei hat das Modell viele Vorteile wie die stark vaskularisierte Membran, die eine Angiogenese von Tumorzellen fördert, eine hohe Reproduzierbarkeit sowie eine einfache und kosteneffiziente Versuchsdurchführung. Zur Durchführung des HET-CAM-Tests stehen eine Vielzahl von Protokollen zur Verfügung. Generell können zwei Arten der Kultivierung unterschieden werden die Ex-ovo- und die In-ovo-Methode. Bei der Ex-ovo-Methode wird das Ei geöffnet und der Inhalt in eine Petrischale überführt. Der Vorteil der Kultivierung des Eies in einer Petrischale ist die verbesserte Beobachtbarkeit der kompletten CAM, woraus sich eine vereinfachte Beurteilung ergeben kann. Ein großer Nachteil ist jedoch die vermehrte Exposition des Embryos mit der Umwelt bspw. reagieren die Hühnereiembryonen negativ auf Licht, was zu einer erhöhten Mortalität führen kann [166,283]. Bei der In-ovo-Kultivierung bleibt das natürliche Milieu des Embryos bestehen wodurch eine hohe Überlebensrate erreicht werden kann [164]. Die In-ovo-Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Zur Untersuchung der Akkumulation und Wirksamkeit der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren wurden 3D-Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12 verwendet. Diese wurden an Tag 6 der Bebrütung direkt auf die CAM appliziert. Bereits an Tag 10 konnte eine beginnende Vaskularisierung der 3D-Tumorsphäroide beobachtet werden. Vom Beginn der Bebrütung bis zum Schlüpfen des Küchens vergehen 21 Tage. In der Literatur wird beschrieben, dass bis zum 11. Bebrütungstag keine Schmerzempfindlichkeit der Embryonen vorliegt und daher empfohlen wird, die Versuche bis zu diesem Tag zu beenden [284]. Um allerdings eine ausreichende Vaskularisierung von 3D-Tumorsphäroiden zu erreichen und die Wirksamkeit von Medikamenten testen zu können, reicht dieser Zeitraum nicht aus, weshalb viele Untersuchungen in einem Zeitraum bis zum 16. oder 18. Bebrütungstag durchgeführt wurden [170]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde als Versuchsende Tag 17 der Bebrütung festgelegt. Das etablierte, auf dem HET-CAM-Test

basierende, vaskularisierte Darmtumor-Modell ermöglichte eine Untersuchung der Akkumulation sowie die Bestimmung der Tumorsphäroidgröße und der zellulären Zusammensetzung nach der Behandlung mit dem freien Photosensibilisator mTHPC und den nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen „Liposomen biolitec[®]“, „Nanopartikel WWU“ und „Nanopartikel IBMT“. In der klinischen Anwendung der PDT wird nach der Medikamentenverabreichung erst nach 24 h bis 96 h die Bestrahlung durchgeführt. Dieser Zeitraum hängt mit der spezifischen **Akkumulation** des Photosensibilisators im Tumorgewebe zusammen [285]. Auch bei der Untersuchung des freien mTHPC und der nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren konnte ein Zusammenhang zwischen der akkumulierten Substanzmenge und der Inkubationszeit im vaskularisierten 3D-Tumorsphäroid festgestellt werden. Dabei konnte im vaskularisierten 3D-Tumorsphäroid höhere Akkumulation des Photosensibilisators nach 48 h im Vergleich zu der Akkumulation nach 24 h detektiert werden. Im nächsten Schritt wurde eine **optische Beurteilung** der vaskularisierten 3D-Tumorsphäroide nach der Behandlung durchgeführt. Nach der Anwendung der PDT können *in vivo* Veränderungen der Blutgefäße des Tumors beobachtet werden. Aufgrund der fehlenden Vaskularisierung in standardisierten 2D-Monolayer-Zellkulturen und 3D-Tumorsphäroiden kann dieser Effekt meist nur in Tieren untersucht werden [286]. Nach der Behandlung der vaskularisierten 3D-Tumorsphäroide war es allerdings auch möglich, Blutgefäßveränderungen zu detektieren. So konnten nach der Behandlung Effekte wie Gefäß-Lyse und Koagulation im Bereich des 3D-Tumorsphäroids festgestellt werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können daher zu einer Verringerung bis hin zu einer Vermeidung von Tierversuchen führen. Neben der optischen Kontrolle nach der Behandlung wurde auch die **Tumorgroße** bestimmt. Die Tumorgroße ist in der klinischen Anwendung ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der Wirksamkeit einer Behandlung. Beispielsweise wird bei der routinemäßigen Behandlung von Kopf- und Nackentumoren mit der PDT nach zwei Anwendungen mit einem Rückgang des Tumors zwischen 85 % bis 96 % gerechnet [88,89]. Nach der Behandlung der vaskularisierten 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 konnte nach der Behandlung mit dem freien mTHPC keine Tumorzelle auf der CAM detektiert werden. Für die Behandlung mit den nanopartikulären Formulierungen ergab sich eine durchschnittliche Tumorgroßenreduktion von 75 %, wobei das nanopartikuläre System F127-mTHPC-PLGA mit einer Reduktion um 94 % den größten Effekt zeigte. Bei den vaskularisierten 3D-Tumorsphäroiden der Zelllinie HT29-MTX-E12 ergab sich eine durchschnittliche Reduktion der Tumorgroße von 67 %. Auch hier konnte der größte Behandlungseffekt durch die Verwendung der Nanopartikel F127-mTHPC-PLGA mit einer Tumorgroßenreduzierung von - 82 % festgestellt werden. Insgesamt weisen die vaskularisierten 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80 einen größeren anti-tumoralen Effekt nach der Behandlung auf als die vaskularisierten 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12. Damit konnte die in den

Screening Untersuchungen festgestellte Zelllinienabhängige Wirkstoffsensitivität mit den HET-CAM-Versuchen bestätigt werden. Nachdem ein Effekt der PDT auf die Größe der vaskularisierten 3D-Tumorsphäroide festgestellt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die zelluläre Zusammensetzung der verbliebenen Tumorzellen untersucht. Dabei wurden der Anteil an **vitalen, apoptotischen** und **nekrotischen** Zellen untersucht. Diese betragen bei der unbehandelten Zellkontrolle, die analog bestrahlt wurde, durchschnittlich bei beiden Zelllinien 88 % vitale Zellen, 8 % apoptotische Zellen und 5 % nekrotische Zellen. Ergebnisse zeigten, dass nach der Behandlung ein deutlicher Anstieg nekrotischer Zellen zwischen 30 % bis 72 % vorhanden war, wobei die Anzahl der apoptotischen Zellen mit 2 % bis 6 % in etwa gleich blieb. Bei der PDT findet die Zerstörung der Tumorzellen sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose statt. Apoptose wird in diesem Prozess durch eine Zerstörung der Mitochondrien und dem Cytoplasma, oder durch eine lokale Unterversorgung aufgrund einer Beschädigung der Blutgefäße des Tumors. Nekrose wird in erster Linie durch die Zerstörung der Zellmembran ausgelöst [287]. In einer Studie bei der die Wirkung der PDT an P388 und L1210 Zellen (Leukämie Zelllinien) untersucht wurden konnte ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang zu den nekrotischen und apoptotischen Prozessen hergestellt werden. Dabei wurde durch eine geringe Konzentration vermehrt eine Zell-Apoptose ausgelöst und bei hohen Konzentrationen nekrotische Prozesse aktiviert [288]. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die in den vaskularisierten Tumorsphäroiden akkumulierte Menge des Photosensibilisators hoch genug war, um einen deutlichen anti-tumoralen Effekt zu erzielen. Der entwickelte HET-CAM-Test zur Untersuchung der Wirksamkeit von Photosensibilisatoren und deren nanopartikulären Formulierungen kann als Bindeglied zwischen standardisierten In-vitro-Modellen und Tiermodellen verwendet werden. Es ist besonders für die Untersuchung der PDT geeignet, da eine fokussierte Bestrahlung des Tumors möglich ist, die die endoskopische Bestrahlung *in vivo* reflektieren kann.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit im Vergleich zu den Untersuchungen mit spezifischen präklinischen Testsystemen, werden große Unterschiede deutlich. Bei den im ersten Schritt durchgeführten Untersuchungen der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren weisen alle, die als wirksam deklariert wurden, ähnliche Ergebnisse auf. Im Vergleich dazu konnten in den neu entwickelten spezifischen präklinischen Testsystemen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren gemacht werden. So konnte eine Mukopermeabilität durch die Verwendung des Mukus-Chip-Modells für die „Liposomen biolitec[®]“ LP-BLC 2175 und LP-BLC 5152 sowie für die „Nanopartikel IBMT“ F127-mTHPC-PLGA festgestellt werden. Im mikrofluidischen Darmtumor-Modell konnten die „Nanopartikel IBMT“ CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA nachweislich in der höchsten Konzentration im dynamischen System an die Mukusschicht des 3D-Tumorsphäroids

adhärieren, wohingegen unter statischen Bedingungen sowohl der freie Photosensibilisator mTHPC, als auch die partikulären Formulierungen „Nanopartikel WWU“ PEG-mTHPC-PLGA und LrP-PEG-mTHPC-PLGA, eine vergleichbar hohe adhärierte Substanzmenge zu den Nanopartikeln CP-mTHPC-PLGA und F127-mTHPC-PLGA aufwiesen. Die größten Unterschiede in den Versuchsergebnissen konnten allerdings mit dem vaskularisierten Darmtumor-Modell gemacht werden. Hier konnten nach der Behandlung von 3D-Tumorsphäroiden mit dem freien Photosensibilisator mTHPC keine Tumorzellen mehr detektiert werden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der statischen Behandlung von 3D-Tumorsphäroiden in einer Mikrotiterplatte führte hier die Behandlung mit mTHPC lediglich zu einer Verringerung der Zellviabilität um 50 %.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können daher als Beweis für die Notwendigkeit von spezifischen präklinischen Testsystemen angesehen werden, die in Anbetracht der zu untersuchenden Eigenschaften von freien und nanopartikulären Formulierungen ausgewählt und entwickelt werden müssen. Dies erhöht die Vorhersagbarkeit von In-vivo-Untersuchungen, wodurch eine Vermeidung und Verringerung von Tierversuchen gemäß dem 3R-Prinzip erreicht werden [167].

6 Ausblick

Die Diagnose Dünndarmkrebs ist mit einer schlechten Prognose verbunden. Meist werden Dünndarmkarzinome erst in einem späten Stadium diagnostiziert, in dem der Patient bereits Metastasen gebildet hat. Zu diesem Zeitpunkt beschränkt sich die Behandlung meist nur noch auf palliative Maßnahmen. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland durchschnittlich 59 %, wobei in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp zwischen 25 % bis 83 % schwankt. Daher werden dringend neue Therapiemethoden zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen benötigt.

Eine potenzielle neue Therapieform ist die photodynamische Therapie, bei der ein photoaktivierbarer Arzneistoff (Photosensibilisator) in Kombination mit Licht einer spezifischen Wellenlänge und Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies bildet, die zu einer biologischen Zerstörung von Zellen und dem Zelltod führen können. Ein großer Nachteil der meisten Photosensibilisatoren ist deren hydrophobe Eigenschaft. Diese führt *in vivo* zu einer Aggregation des Photosensibilisators und damit zu einer unspezifischen Anreicherung im gesunden Gewebe. Dadurch werden Nebenwirkungen ausgelöst, die zu einer starken Photosensitivität des Patienten führen. Durch die Verwendung von nanopartikulären Arzneistoffträgersystemen soll der Photosensibilisator auf seinem Weg zum Wirkort geschützt werden und dort eine spezifische Akkumulation erreicht werden. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme basierend auf PLGA und Liposomen entwickelt und untersucht. In den Screening-Untersuchungen konnten hoch wirksame freie und nanopartikuläre Photosensibilisatoren identifiziert werden. Eine genauere Betrachtung der mukoadhäsiven und mukopermeablen Eigenschaften der Nanopartikel war mit den neu entwickelten spezifischen präklinischen Testsystemen möglich. Hier haben sich vor allem PLGA-basierte Nanopartikel mit einer Pluronic® F127-Oberflächenmodifizierung als hoch effektiv erwiesen. In Bezug auf die PDT bedeutet dies, dass ein hoch wirksames nanopartikuläres Arzneistoffträgersystem entwickelt wurde, das ein großes Potential zur Behandlung von Dünndarmkarzinomen mit der PDT aufweist. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollte daher der nächste Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines neuen Medikaments mit der Durchführung von präklinischen In-vivo-Studien gemacht werden. Diese sind eine Voraussetzung für weiterführende klinische Studien und ein wichtiger Teil des Zulassungsprozesses. Allgemein betrachtet kann das entwickelte nanopartikuläre Arzneistoffträgersystem auch auf weitere Anwendungen ausgeweitet werden, da ein Austausch des Arzneistoffes, der in die Nanopartikel inkorporiert wird, möglich ist. So kann dieses auch für andere Fragestellungen wie beispielsweise dem Transport von Arzneistoffen über die Mukusbarriere der Lunge genutzt werden.

Auch die neu etablierten spezifischen präklinischen Testsysteme besitzen das Potential für andere Fragestellungen genutzt zu werden. Beim Mukus-Chip-System ist beispielsweise eine

Variation der Mukusschichtdicke und der Mukusquelle möglich, wodurch das System an andere Mukusbarrieren im Körper wie Mundschleimhaut, Auge, Vagina oder Lunge angepasst werden kann. Das entwickelte mikrofluidische Darmtumormodell ist nicht auf den Einsatz von Darmtumoren beschränkt, es können auch andere Tumorsphäroide oder Organoide eingesetzt werden. Entsprechendes gilt für das vaskularisierte Darmtumor-Modell, auch hier können unterschiedliche Tumorarten oder gewebeabbildende Organoide verwendet werden. Daraus ergibt sich ein breites Einsatzgebiet der in der Arbeit entwickelten spezifischen präklinischen Modelle, deren Vorteile in der Zukunft weiter ausgeschöpft werden können.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der einzelnen Schritte zur Zulassung eines Medikaments.....	2
Abbildung 2: Zulassungen neuer Medikamente durch die FDA im Jahre 2018.....	3
Abbildung 3: Histologischer Schnitt eines porcinen Dünndarms	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Darmwand.....	5
Abbildung 5: Schematische Struktur eines Mucin-Glykoproteins	7
Abbildung 6: Entwicklung eines Adenokarzinoms im Darm	8
Abbildung 7: Fakten zur Erkrankung Dünndarmkrebs	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Porphyrin-Grundgerüsts	10
Abbildung 9: Modifiziertes Jablonski-Diagramm zur Darstellung der Aktivierung des Photosensibilisators.....	11
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Behandlung eines Patienten im Rahmen der PDT	12
Abbildung 11: Erhöhter Permeabilitäts- und Retentions-Effekt (EPR-Effect, engl. enhanced permeability and retention)	13
Abbildung 12: Strukturformel und Absorptionsspektrum des Photosensibilisators mTHPC ..	14
Abbildung 13: Photodynamische Behandlung eines Tumors im Gastrointestinaltrakt mittels endoskopischer Bestrahlung.....	15
Abbildung 14: Schematische Darstellung PLGA-basierender Nanopartikel und Liposomen .	18
Abbildung 15: Aktives Targeting von Nanopartikeln mittels mukoadhesiver und mukopermeabler Oberflächenmodifizierung	19
Abbildung 16: Morphologie eines Tumorsphäroids.....	23
Abbildung 17: Übersichtsabbildung des HET-CAM-Tests zur Vaskularisierung von Tumorsphäroiden	26
Abbildung 18: Validierungsparameter nach ICH Guideline als Flussdiagramm dargestellt ...	38
Abbildung 19: Herstellung der linearen Messwertreihe.....	39
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Nanopartikel-Synthese mittels Nanopräzipitation.....	50
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Nanopartikel-Synthese nach dem Doppelemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungs-Verfahren	51
Abbildung 22: Schematische Darstellung des Wirkstoff-Screenings	55
Abbildung 23: Tecan Evo 200 System.....	56
Abbildung 24: Konstruktion des mikrofluidischen Chip-Moduls.....	59
Abbildung 25: Einbringung der Mukusschicht in das mikrofluidische Chip-Modul	61

Abbildung 26: Aufbau der Chip-Modul-Halterung	62
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Messing-Gießform und dem PDMS-Modul	64
Abbildung 28: Schematische Darstellung der plasmagestützten Verbindung des PDMS-Moduls und des Objektträgers und Bild des fertigen PDMS-Chips.....	65
Abbildung 29: Verlaufsdiagramm des HET-CAM-Tests	68
Abbildung 30: Darstellung der errechneten Abweichung zum Soll-Wert	76
Abbildung 31: Kalibriergerade aus den Daten der Tabelle 4.....	78
Abbildung 32: Spezifität der analytischen Methode	80
Abbildung 33: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 2D-Monolayer der Zelllinie HuTu-80.....	92
Abbildung 34: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 2D-Monolayer der Zelllinie HT29	93
Abbildung 35: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 2D-Monolayer der Zelllinie HT29-MTX-E12.....	94
Abbildung 36: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HuTu-80.....	95
Abbildung 37: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29.....	96
Abbildung 38: Bestimmung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität des Photosensibilisators mTHPC auf 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12.....	97
Abbildung 39: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der neu synthetisierten Photosensibilisatoren.....	100
Abbildung 40: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität von Leerpartikeln mit verschiedenen Größen und Modifizierungen	102
Abbildung 41: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der nanopartikulären Formulierungen mit dem inkorporierten Photosensibilisator mTHPP	103
Abbildung 42: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der liposomalen Formulierungen	105
Abbildung 43: Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der IBMT-Nanopartikel	107
Abbildung 44: Übersicht der 2D-Monolayer-Zellkulturen-Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der finalen PS und Formulierungen	111
Abbildung 45: Übersicht der 3D-Tumorsphäroid-Untersuchung der Dunkeltoxizität und Phototoxizität der finalen PS und Formulierungen	112
Abbildung 46: Quantifizierung der aufgenommenen Menge der finalen freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren in 2D-Monolayer Zellkulturen	113

Abbildung 47: Quantifizierung der aufgenommenen Menge der finalen freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren in 3D-Tumorsphäroide	114
Abbildung 48: Schematischer Aufbau der Mukus-Chip Untersuchungen	116
Abbildung 49: Experimenteller Aufbau der Mukus-Chip Untersuchungen	117
Abbildung 50: Permeierte Substanzmenge über die Filtermembranen des Mukus-Chips ohne Mukusschicht	119
Abbildung 51: Bestimmung der Permeation der Kontrollsubstanzen und freien Photosensibilisatoren über die Membranen des Mukus-Chips ohne Mukusschicht	121
Abbildung 52: Permeationsuntersuchungen der nanopartikel-inkorporierten Formulierungen über die Membranen des Mukus-Chips ohne Mukusschicht	122
Abbildung 53: Viskositätsmessung der porcinen Mukusproben	123
Abbildung 54: Darstellung der prozentualen Substanzmenge in der Mukusschicht und im Akzeptormedium des Mukus-Chips	125
Abbildung 55: Quantifizierung der Substanzmenge bezogen auf die vier einzelnen porcinen Mukusproben in der Mukusschicht und im Akzeptormedium des Mukus-Chips	126
Abbildung 56: Permeierte Substanzmenge im Akzeptormedium des Mukus-Chips dargestellt gegen die Zeit	127
Abbildung 57: Schematische Zeichnung des mikrofluidischen Darm-Tumor-Modells	129
Abbildung 58: Charakterisierung des 3D-Tumorsphäroid-Modells der Zelllinie HT29-MTX-E12	130
Abbildung 59: Messung der Zellviabilität unter statischen und dynamischen Bedingungen	132
Abbildung 60: Darstellung der prozentualen Substanzmenge im statischen und dynamischen System	133
Abbildung 61: Quantifizierung der Menge der freien und nanopartikel-inkorporierten Photosensibilisatoren im dynamischen Darmtumor-Modell	134
Abbildung 62: Mikroskopische Aufnahmen der statischen und dynamischen Inkubation der 3D-Tumorsphäroide der Zelllinie HT29-MTX-E12	136
Abbildung 63: Etablierung des HET-CAM-Tumorsphäroid-Modells	138
Abbildung 64: Mikroskopische Aufnahmen eines vaskularisierten Tumorsphäroids auf der CAM	139
Abbildung 65: Quantifizierung der akkumulierten Menge der Photosensibilisatoren mTHPC, BLC 2175 und BLC 5152 nach 24 h- bzw. 48 h- Inkubation in vaskularisierten Tumorsphäroiden der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12	141
Abbildung 66: Fokussierte Bestrahlung für die vaskularisierten Tumorsphäroide	142

Abbildung 67: Optische Kontrolle der Behandlung von vaskularisierten Tumorsphäroiden der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12	143
Abbildung 68: Bestimmung der Zellzahl der vaskularisierten Tumorsphäroide nach der Inkubation und Bestrahlung	145
Abbildung 69: Detektion von Apoptose und Nekrose der behandelten vaskularisierten Tumorsphäroide der Zelllinien HuTu-80 und HT29-MTX-E12	148

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: mTHPC-Standardreihe mit unterschiedlichen Konzentrationsniveaus.....	39
Tabelle 2: HPLC-Bedingungen und Einstellungen zur Messung von mTHPC.....	40
Tabelle 3: Überprüfung der Robustheit der HPLC-Methode zur Analyse von mTHPC	46
Tabelle 4: Ergebnisse der Messungen der mTHPC-Standardreihen.....	74
Tabelle 5: Überprüfung der Messwertreihe auf Normalverteilung, Ausreißer und Trends ..	75
Tabelle 6: Prüfung auf Richtigkeit des analytischen Verfahrens	75
Tabelle 7: Prüfung der Methode auf Wiederholbarkeit.....	76
Tabelle 8: Darstellung der intermediären Präzision	77
Tabelle 9: Kenngrößen der linearen Regression.....	79
Tabelle 10: Physikochemische Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel	82
Tabelle 11: Physikochemische Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel mit Chitosan-Oberflächenmodifizierung	83
Tabelle 12: Physikochemische Charakterisierung der PLGA-Nanopartikel mit PEG-Oberflächenmodifizierung	84
Tabelle 13: Physikochemische Charakterisierung der LrP-PLGA-Nanopartikel mit PEG-Oberflächenmodifizierung	85
Tabelle 14: Physikochemische Charakterisierung der liposomalen Nanopartikel.....	85
Tabelle 15: Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel, die mittels Nanopräzipitation hergestellt wurden	86
Tabelle 16: Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel, die nach dem Doppalemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungs-Verfahren hergestellt wurden..	87
Tabelle 17: Verkapselungseffizienz und Ladungskapazität.....	87
Tabelle 18: Übersicht der untersuchten, freien und nanopartikelär-inkorporierten Photosensibilisatoren.....	89
Tabelle 19: Zusammenstellung der zum phototoxischen Effekt benötigten mTHPC-Konzentration und Inkubationszeit aus den Messergebnissen der Untersuchung des Photosensibilisators mTHPC	98
Tabelle 20: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Berechnung einer signifikanten erhöhten Aufnahme der freien Photosensibilisatoren gegenüber	

	ihren nanopartikulären Formulierungen im 2D-Zellkultursystem und den 3D-Tumorsphäroiden der Zelllinien HuTu-80, HT29 und HT29-MTX-E12 basierenden auf den Werten der Quantifizierung	110
Tabelle 21:	Übersicht der freien und nanopartikulär-inkorporierten Photosensibilisatoren die in den Untersuchungen mit spezifischen präklinischen Testsystemen verwendet wurden.....	115
Tabelle 22:	Vergleichswerte für die untere und obere Schranke zur Prüfung auf Normalverteilung nach David [171]	181
Tabelle 23:	Ausreißertest nach Dean und Dixon [173].....	181
Tabelle 24:	Tabelle für den Neumann-Trendtest [172].....	182
Tabelle 25:	Quantile der T-Verteilung für den Welch-Test [170]	182

7.3 Formelverzeichnis

Formel 1:	Normalverteilung nach David et al. [171]	41
Formel 2:	Berechnung des Range [172].....	41
Formel 3:	Formel zur Berechnung der Standardabweichung [172].....	41
Formel 4:	Dean-Dixon Ausreißertest: Berechnung der Prüfgröße nach unten [173]	42
Formel 5:	Dean-Dixon Ausreißertest: Berechnung der Prüfgröße nach oben [173]	42
Formel 6:	Berechnung der Prüfgröße nach Neumann [173]	42
Formel 7:	Differenzstreuung [173]	42
Formel 8:	Berechnung des Responsefaktors zur quantitativen Analyse [174]	43
Formel 9:	Berechnung des Präzisionsmaß mittels Standardabweichung und Variationskoeffizient [173]	44
Formel 10:	Berechnung der linearen Kalibrierfunktion [172].....	45
Formel 11:	Berechnung des Korrelationskoeffizienten [173].....	45
Formel 12:	Berechnung des Ordinatenabschnitts, an dem die Regressionsgerade die y-Achse schneidet [172]	45
Formel 13:	Berechnung der Steigung der Kalibrierfunktion [173].....	45
Formel 14:	Berechnung der Verkapselungseffizienz	53
Formel 15:	Berechnung der Beladungskapazität.....	54
Formel 16:	Berechnung der Bestrahlungszeit.....	54
Formel 17:	Vergleich zweier Varianzen nach dem F-Test [175].....	71
Formel 18:	Berechnung der Varianzen s^2 [175].....	71
Formel 19:	Berechnung der Prüfgröße nach Welch [170].....	71
Formel 20:	Ermittlung der Anzahl der Freiheitsgrade [170].....	72

7.4 Statistische Tabellen

Tabelle 22: Vergleichswerte für die untere und obere Schranke zur Prüfung auf Normalverteilung nach David [176]

n	Untere Schranke Signifikanzniveau		Obere Schranke Signifikanzniveau	
	$\alpha = 1 \%$	$\alpha = 5 \%$	$\alpha = 1 \%$	$\alpha = 5 \%$
3	1,737	1,758	1,999	2,000
4	1,870	1,980	2,429	2,455
5	2,020	2,150	2,753	2,803
6	2,150	2,280	3,012	3,095
7	2,260	2,400	3,222	3,338
8	2,350	2,500	3,399	3,543
9	2,440	2,590	3,552	3,720
10	2,510	2,670	3,685	3,875

Tabelle 23: Ausreißertest nach Dean und Dixon [173]

n	$\alpha = 5 \%$	$\alpha = 1 \%$
3	0.941	0.988
4	0.765	0.889
5	0.642	0.780
6	0.560	0.698
7	0.507	0.637

Tabelle 24: Tabelle für den Neumann-Trendtest [175]

n	$\alpha = 1\%$	$\alpha = 5\%$
4	0,626	0,781
5	0,538	0,820
6	0,562	0,890
7	0,614	0,936
8	0,663	0,983
9	0,709	1,024
10	0,752	1,062
11	0,792	1,097
12	0,828	1,128
13	0,862	1,156
14	0,893	1,182
15	0,922	1,205
16	0,949	1,227
17	0,974	1,247
18	0,998	1,266
19	1,012	1,283
20	1,041	1,300

Tabelle 25: Quantile der T-Verteilung für den Welch-Test [174]

n	$\alpha = 1\%$	$\alpha = 5\%$
1	31,821	6,314
2	6,965	2,920
3	4,541	2,353
4	3,747	2,132
5	3,365	2,015
6	3,143	1,943
7	2,998	1,895
8	2,896	1,860
9	2,821	1,833
10	2,764	1,812
11	2,718	1,796
12	2,681	1,782
13	2,650	1,771
14	2,624	1,761
15	2,602	1,753
16	2,583	1,746
17	2,567	1,740
18	2,552	1,734
19	2,539	1,729
20	2,528	1,725

7.5 Literaturverzeichnis

- [1] R. Liu, X. Li, K.S. Lam, Combinatorial chemistry in drug discovery., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 38 (2017) 117–126. doi:10.1016/j.cbpa.2017.03.017.
- [2] R.C. Peters, FDA: Early Stage Drug Development Costs Trigger Higher Drug Costs, *Pharm. Technol.* 42 (2018) 20. <http://www.pharmtech.com/fda-early-stage-drug-development-costs-trigger-higher-drug-costs> (accessed June 6, 2019).
- [3] K.C. Nicolaou, The Chemistry-Biology-Medicine Continuum and the Drug Discovery and Development Process in Academia, *Chem. Biol.* 21 (2014) 1039–1045. doi:10.1016/J.CHEMBIOL.2014.07.020.
- [4] G.A. Van Norman, Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs, *JACC Basic to Transl. Sci.* 1 (2016) 170–179. doi:10.1016/J.JACBTS.2016.03.002.
- [5] K. Brake, A. Gumireddy, A. Tiwari, H. Chauhan, D. Kumari, In vivo Studies for Drug Development via Oral Delivery: Challenges, Animal Models and Techniques, *Pharm. Anal. Acta.* 08 (2017). doi:10.4172/2153-2435.1000560.
- [6] FDA, The drug development process - FDA, (2015). <https://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/default.htm> (accessed April 26, 2018).
- [7] J.A. DiMasi, R.W. Hansen, H.G. Grabowski, The price of innovation: New estimates of drug development costs, *J. Health Econ.* 22 (2003) 151–185. doi:10.1016/S0167-6296(02)00126-1.
- [8] J.A. DiMasi, H.G. Grabowski, R.W. Hansen, Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs, *J. Health Econ.* 47 (2016) 20–33. doi:10.1016/J.JHEALECO.2016.01.012.
- [9] S.M. Paul, D.S. Mytelka, C.T. Dunwiddie, C.C. Persinger, B.H. Munos, S.R. Lindborg, A.L. Schacht, New molecular entity How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nat. Rev. | Drug Discov.* 9 (2010) 203. doi:10.1038/nrd3078.
- [10] S. Morgan, P. Grootendorst, J. Lexchin, C. Cunningham, D. Greyson, The cost of drug development: A systematic review, *Health Policy (New York)*. 100 (2011) 4–17. doi:10.1016/J.HEALTHPOL.2010.12.002.
- [11] K. Earm, Y.E. Earm, Integrative approach in the era of failing drug discovery and development., *Integr. Med. Res.* 3 (2014) 211–216. doi:10.1016/j.imr.2014.09.002.

- [12] R.K. Harrison, Phase II and phase III failures: 2013-2015, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (2016) 817–818. doi:10.1038/nrd.2016.184.
- [13] A. Mullard, 2018 FDA drug approvals, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 85–89. doi:10.1038/d41573-019-00014-x.
- [14] A. Mullard, News & Analysis 2018 FDA drug approvals, *Nat. Rev.* 18 (2019) 85–89.
- [15] A. Mullard, 2014 FDA drug approvals, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2015) 85–89. doi:10.1038/nrd4239.
- [16] A. Mullard, 2015 FDA drug approvals, *Nat. Publ. Gr.* 15 (2016) 73–76. doi:10.1038/nrd4239.
- [17] A. Mullard, 2016 FDA drug approvals, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 73–76. doi:10.1038/nrd.2017.14.
- [18] A. Mullard, 2017 FDA drug approvals, *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (2018) 150–150. doi:10.1038/nrd.2018.18.
- [19] WHO, Pricing of cancer medicines and its impacts, 2018.
- [20] E. Mutschler, H.-G. Schaible, P. Vaupel, G. (Begr. . Thews, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 2007.
- [21] A.I. Neugut, J.S. Jacobson, S. Suh, R. Mukherjee, N. Arber, The epidemiology of cancer of the small bowel, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 (1998) 243–251.
- [22] W.F. Caspary, J. Stein, *Darmkrankheiten : Klinik, Diagnostik und Therapie*, 1999.
- [23] T. Deller, W. Kummer, U. 1940- Welsch, *Lehrbuch Histologie*, Elsevier, Urban et Fischer, 2014.
- [24] L. Tarabova, Z. Makova, E. Piesova, R. Szaboova, Z. Faixova, Intestinal Mucus Layer and Mucins (A Review), *Folia Vet.* 60 (2016) 21–25. doi:10.1515/fv-2016-0003.
- [25] J. Leal, H.D.C. Smyth, D. Ghosh, Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 555–572. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.018.
- [26] M. Boegh, H.M. Nielsen, Mucus as a barrier to drug delivery - Understanding and mimicking the barrier properties, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116 (2015) 179–186. doi:10.1111/bcpt.12342.
- [27] R. Shogren, T.A. Gerken, N. Jentoft, Role of Glycosylation on the Conformation and Chain Dimensions of O-Linked Glycoproteins: Light-Scattering Studies of Ovine

- Submaxillary Mucin, *Biochemistry*. 28 (1989) 5525–5536. doi:10.1021/bi00439a029.
- [28] C.L. Hattrup, S.J. Gendler, Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins, *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008) 431–457. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659.
- [29] S.K. Lai, Y.Y. Wang, D. Wirtz, J. Hanes, Micro- and macrorheology of mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 86–100. doi:10.1016/j.addr.2008.09.012.
- [30] X. Yang, K. Forier, L. Steukers, S. van Vlierberghe, P. Dubruel, K. Braeckmans, S. Glorieux, H.J. Nauwynck, Immobilization of Pseudorabies Virus in Porcine Tracheal Respiratory Mucus Revealed by Single Particle Tracking, *PLoS One*. 7 (2012) e51054. doi:10.1371/journal.pone.0051054.
- [31] M.E. V. Johansson, D. Ambort, T. Pelaseyed, A. Schütte, J.K. Gustafsson, A. Ermund, D.B. Subramani, J.M. Holmén-Larsson, K.A. Thomsson, J.H. Bergström, S. van der Post, A.M. Rodriguez-Piñeiro, H. Sjövall, M. Bäckström, G.C. Hansson, Composition and functional role of the mucus layers in the intestine, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 3635–3641. doi:10.1007/s00018-011-0822-3.
- [32] C. Atuma, V. Strugala, A. Allen, L. Holm, The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo, *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 280 (2001) G922–G929. doi:10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922.
- [33] M. Boegh, S.G. Baldursdóttir, A. Müllertz, H.M. Nielsen, Property profiling of biosimilar mucus in a novel mucus-containing in vitro model for assessment of intestinal drug absorption., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (2014) 227–35. doi:10.1016/j.ejpb.2014.01.001.
- [34] J. Kirch, A. Schneider, B. Abou, A. Hopf, U.F. Schaefer, M. Schneider, C. Schall, C. Wagner, C.-M. Lehr, Optical tweezers reveal relationship between microstructure and nanoparticle penetration of pulmonary mucus, (n.d.). doi:10.1073/pnas.1214066109.
- [35] D.P. Wolf, J. Sokoloski, M.A. Khan, M. Litt, Human Cervical Mucus. III. Isolation and Characterization of Rheologically Active Mucin, *Fertil. Steril.* 28 (1977) 53–58. doi:10.1016/S0015-0282(16)42317-4.
- [36] M.P. Curado, International Agency for Research on Cancer., International Association of Cancer Registries., Cancer incidence in five continents, Volume IX, International Agency for Research on Cancer, 2008.
- [37] C. Gao, A.-Y. Wang, Significance of increased apoptosis and Bax expression in human small intestinal adenocarcinoma., *J. Histochem. Cytochem.* 57 (2009) 1139–48.

doi:10.1369/jhc.2009.954446.

- [38] Krebs in Deutschland | 2013/2014, 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft, Berlin, 2017. doi:10.17886/rkipubl-2017-007.
- [39] K.Y. Bilimoria, D.J. Bentrem, J.D. Wayne, C.Y. Ko, C.L. Bennett, M.S. Talamonti, Small bowel cancer in the United States: Changes in epidemiology, treatment, and survival over the last 20 years, *Ann. Surg.* 249 (2009) 63–71. doi:10.1097/sla.0b013e31818e4641.
- [40] C. Lepage, A.M. Bouvier, S. Manfredi, V. Dancourt, J. Faivre, Incidence and management of primary malignant small bowel cancers: A well-defined French population study, *Am. J. Gastroenterol.* 101 (2006) 2826–2832. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00854.x.
- [41] Y.W. Moon, S.Y. Rha, S.J. Shin, H. Chang, H.S. Shim, J.K. Roh, Adenocarcinoma of the small bowel at a single Korean institute: Management and prognosticators, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136 (2010) 387–394. doi:10.1007/s00432-009-0668-3.
- [42] B.S. Dabaja, D. Suki, B. Pro, M. Bonnen, J. Ajani, Adenocarcinoma of the small bowel: Presentation, prognostic factors, and outcome of 217 patients, *Cancer.* 101 (2004) 518–526. doi:10.1002/cncr.20404.
- [43] A.H. Wu, M.C. Yu, T.M. Mack, Smoking, alcohol use, dietary factors and risk of small intestinal adenocarcinoma, *Int. J. Cancer.* 70 (1997) 512–517. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970304)70:5<512::AID-IJC4>3.0.CO;2-0.
- [44] L. Kaerlev, P.S. Teglbaerg, S. Sabroe, H.A. Kolstad, W. Ahrens, M. Eriksson, P. Guénel, L. Hardell, G. Launoy, E. Merler, F. Merletti, A. Stang, J. Olsen, Is there an association between alcohol intake or smoking and small bowel adenocarcinoma? Results from a European multi-center case–control study, *Cancer Causes Control.* 11 (2000) 791–797. doi:10.1023/A:1008920502888.
- [45] W.H. Chow, M.S. Linet, J.K. McLaughlin, A.W. Hsing, H.T. Co Chien, W.J. Blot, Risk factors for small intestine cancer, *Cancer Causes Control.* 4 (1993) 163–169. doi:10.1007/BF00053158.
- [46] M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio, P. Boffetta, F. Levi, C. La Vecchia, E. Negri, European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer, *Ann. Oncol.* 29 (2018) 1016–1022. doi:10.1093/annonc/mdy033.
- [47] G.J.A. Offerhaus, F.M. Giardiello, A.J. Krush, S. V. Booker, A.C. Tersmette, N.C. Kelley, S.R. Hamilton, The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous

- polyposis, *Gastroenterology*. 102 (1992) 1980–1982. doi:10.1016/0016-5085(92)90322-P.
- [48] P.J. Leone, G. Mankaney, S. Sarvapelli, S. Abushamma, R. Lopez, M. Cruise, L. LaGuardia, M. O'Malley, J.M. Church, M.F. Kalady, C.A. Burke, Endoscopic and histologic features associated with gastric cancer in familial adenomatous polyposis, *Gastrointest. Endosc.* 89 (2019) 961–968. doi:10.1016/J.GIE.2018.12.018.
- [49] K.K. Sun, G. Liu, X. Shen, X. Wu, Small bowel adenocarcinoma in Lynch syndrome: A case report, *Oncol. Lett.* 12 (2016) 1602–1604. doi:10.3892/ol.2016.4753.
- [50] J. Haanstra, A. Al-Toma, E. Dekker, S. Vanhoutvin, F. Nagengast, E. Mathus-Vliegen, M. van Leerdam, W. de Vos tot Nederveen Cappel, R. Veenendaal, A. Cats, S. Sanduleanu, H. Vasen, J. Kleibeuker, J. Koornstra, Incidence of small bowel neoplasia in Lynch syndrome assessed by video capsule endoscopy, *Endosc. Int. Open.* 05 (2017) E622–E626. doi:10.1055/s-0043-111723.
- [51] S.Y. Jun, E.J. Lee, M.J. Kim, S.M. Chun, Y.K. Bae, S.U. Hong, J. Choi, J.M. Kim, K.T. Jang, J.Y. Kim, G. Il Kim, S.J. Jung, G. Yoon, S.M. Hong, Lynch syndrome-related small intestinal adenocarcinomas, *Oncotarget*. 8 (2017) 21483–21500. doi:10.18632/oncotarget.15277.
- [52] A. Agaimy, N. Vassos, R.S. Croner, Gastrointestinal manifestations of neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease): Clinicopathological spectrum with pathogenetic considerations, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 5 (2012) 852–862.
- [53] M. Sharma, R. Singh, A.S. Grover, Peutz-jeghers syndrome with synchronous adenocarcinoma arising from ileal polyps., *Indian J. Surg.* 77 (2015) 100–2. doi:10.1007/s12262-014-1178-3.
- [54] S. Shenoy, Genetic risks and familial associations of small bowel carcinoma., *World J. Gastrointest. Oncol.* 8 (2016) 509–19. doi:10.4251/wjgo.v8.i6.509.
- [55] C. Cahill, P.H. Gordon, A. Petrucci, M. Boutros, Small bowel adenocarcinoma and Crohn's disease: any further ahead than 50 years ago?, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 11486–95. doi:10.3748/wjg.v20.i33.11486.
- [56] S.D. Rampertab, K.A. Forde, P.H.R. Green, Small bowel neoplasia in coeliac disease, *Gut*. 52 (2003) 1211–1214. doi:10.1136/gut.52.8.1211.
- [57] G. Caio, U. Volta, F. Ursini, R. Manfredini, R. De Giorgio, Small bowel adenocarcinoma as a complication of celiac disease: clinical and diagnostic features, *BMC Gastroenterol.* 19 (2019) 45. doi:10.1186/s12876-019-0964-6.

- [58] T. Aparicio, A. Zaanan, M. Svrcek, P. Laurent-Puig, N. Carrere, S. Manfredi, C. Locher, P. Afchain, Small bowel adenocarcinoma: Epidemiology, risk factors, diagnosis and treatment, *Dig. Liver Dis.* 46 (2014) 97–104. doi:10.1016/j.dld.2013.04.013.
- [59] M. Anzidei, A. Napoli, C. Zini, M.A. Kirchin, C. Catalano, R. Passariello, Malignant tumours of the small intestine: a review of histopathology, multidetector CT and MRI aspects., *Br. J. Radiol.* 84 (2011) 677–90. doi:10.1259/bjr/20673379.
- [60] Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin, (2016) 16–77. doi:10.17886/rkipubl-2016-014.
- [61] P. Patel, K. Galoian, Molecular challenges of neuroendocrine tumors (Review), *Oncol. Lett.* 15 (2018) 2715–2725. doi:10.3892/ol.2017.7680.
- [62] D.Y. Cheung, M.-G. Choi, Current advance in small bowel tumors., *Clin. Endosc.* 44 (2011) 13–21. doi:10.5946/ce.2011.44.1.13.
- [63] American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2017. Special Section: Rare Cancers in Adults, in: *Cancer Facts Fig. 2017. Spec. Sect. Rare Cancers Adults, 2017*: pp. 30–39. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017-special-section-rare-cancers-in-adults.pdf> (accessed June 13, 2019).
- [64] H. Markogiannakis, E. Messaris, D. Dardamanis, N. Pararas, D. Tzertzemelis, P. Giannopoulos, A. Larentzakis, E. Lagoudianakis, A. Manouras, I. Bramis, Acute mechanical bowel obstruction: Clinical presentation, etiology, management and outcome, *World J. Gastroenterol.* 13 (2007) 432–437. doi:10.3748/wjg.v13.i3.432.
- [65] Talamonti, Goetz, Joehl, Rao, Primary cancers of the small bowel: Analysis of prognostic factors and results of surgical management, in: *Arch. Surg.*, 2002: pp. 564–571. doi:10.1001/archsurg.137.5.564.
- [66] C. Locher, B. Batumona, P. Afchain, N. Carrère, E. Samalin, C. Cellier, T. Aparicio, Y. Becouarn, L. Bedenne, P. Michel, Y. Parc, M. Pocard, B. Chibaudel, O. Bouché, Small bowel adenocarcinoma: French intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatments and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO), *Dig. Liver Dis.* 50 (2018) 15–19. doi:10.1016/j.dld.2017.09.123.
- [67] P. Czaykowski, D. Hui, Chemotherapy in Small Bowel Adenocarcinoma: 10-year Experience of the British Columbia Cancer Agency, *Clin. Oncol.* 19 (2007) 143–149. doi:10.1016/j.clon.2006.12.001.
- [68] J.S. Chow, C.C. Chen, H. Ahsan, A.I. Neugut, A population-based study of the incidence

- of malignant small bowel tumours: SEER, 1973-1990, *Int. J. Epidemiol.* 25 (1996) 722–728. doi:10.1093/ije/25.4.722.
- [69] T. Haselkorn, A.S. Whittemore, D.E. Lilienfeld, Incidence of small bowel cancer in the United States and worldwide: Geographic, temporal, and racial differences, *Cancer Causes Control.* 16 (2005) 781–787. doi:10.1007/s10552-005-3635-6.
- [70] I. Hatzaras, J.A. Palesty, F. Abir, P. Sullivan, R.A. Kozol, S.J. Dudrick, W.E. Longo, Small-bowel tumors: Epidemiologic and clinical characteristics of 1260 cases from the Connecticut Tumor Registry, *Arch. Surg.* 142 (2007) 229–235. doi:10.1001/archsurg.142.3.229.
- [71] S. Pushpan, S. Venkatraman, V. Anand, J. Sankar, D. Parmeswaran, S. Ganesan, T. Chandrashekar, Porphyrins in Photodynamic Therapy - A Search for Ideal Photosensitizers, *Curr. Med. Chem. Agents.* 2 (2005) 187–207. doi:10.2174/1568011023354137.
- [72] K. Berg, P.K. Selbo, A. Weyergang, A. Dietze, L. Prasmickaite, A. Bonsted, B. Engesaeter, E. Angell-Petersen, T. Warloe, N. Frandsen, A. Høgset, Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications, *J. Microsc.* 218 (2005) 133–147. doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01471.x.
- [73] D. van Straten, V. Mashayekhi, H.S. de Bruijn, S. Oliveira, D.J. Robinson, Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions, *Cancers (Basel).* 9 (2017) 1–54. doi:10.3390/cancers9020019.
- [74] G.M.F. Calixto, J. Bernegossi, L.M. De Freitas, C.R. Fontana, M. Chorilli, A.M. Grumezescu, Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review, *Molecules.* 21 (2016) 1–18. doi:10.3390/molecules21030342.
- [75] R. Bonnett, R.D. White, U.J. Winfield, M.C. Berenbaum, Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers, *Biochem. J.* 261 (1989) 277–280. doi:10.1042/bj2610277.
- [76] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 279–293. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4.Mechanisms.
- [77] C.S. Foote, DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTONSENSITIZED OXIDATION, *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 659–659. doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x.
- [78] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science (80-).* 303 (2004) 1818–1822. doi:10.1126/science.1095833.

- [79] V. Muzykantov, V. Torchilin, eds., *Biomedical Aspects of Drug Targeting*, Springer US, Boston, MA, 2002. doi:10.1007/978-1-4757-4627-3.
- [80] R.F. Donnelly, P.A. McCarron, D.I.J. Morrow, S.A. Sibani, A.D. Woolfson, Photosensitizer delivery for photodynamic therapy. Part 1: Topical carrier platforms, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 757–766. doi:10.1517/17425247.5.7.757.
- [81] N. Jain, P.K. Sharma, A. Banik, V. Bhardwaj, Applications of photosensitizer in therapy, *Pharmacogn. J.* 3 (2011) 11–17. doi:10.5530/pj.2011.22.3.
- [82] K. Szaciłowski, W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell, G. Stochel, Bioinorganic Photochemistry: Frontiers and Mechanisms, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2647–2694. doi:10.1021/cr030707e.
- [83] T. Nyokong, V. Ahsen, Photosensitizers in medicine, environment, and security, *Photosensit. Med. Environ. Secur.* 9789048138 (2012) 1–662. doi:10.1007/978-90-481-3872-2.
- [84] X. Li, S. Lee, J. Yoon, Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 1174–1188. doi:10.1039/c7cs00594f.
- [85] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 380–387. doi:10.1038/nrc1071.
- [86] T. Roemer, D.J. Krysan, Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4 (2014). doi:10.1101/cshperspect.a019703.
- [87] M.O. Senge, J.C. Brandt, Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)-a second-generation photosensitizer., *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 1240–96. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x.
- [88] P.J. Lou, L. Jones, C. Hopper, Clinical outcomes of photodynamic therapy for head-and-neck cancer, *Technol. Cancer Res. Treat.* 2 (2003) 311–317. doi:10.1177/153303460300200405.
- [89] M.A. Biel, Photodynamic therapy of head and neck cancers, *Methods Mol. Biol.* 635 (2010) 281–293. doi:10.1007/978-1-60761-697-9_18.
- [90] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 60751, Temoporfin, (2005). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Temoporfin> (accessed April 23, 2019).
- [91] M.J. Bader, H. Stepp, W. Beyer, T. Pongratz, R. Sroka, M. Kriegmair, D. Zaak, M.

- Welschof, D. Tilki, C.G. Stief, R. Waidelich, Photodynamic Therapy of Bladder Cancer - A Phase I Study Using Hexaminolevulinate (HAL), *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 31 (2013) 1178–1183. doi:10.1016/j.urolonc.2012.02.007.
- [92] H. Barr, N. Krasner, P.B. Boulos, P. Chatlani, S.G. Bown, Photodynamic therapy for colorectal cancer: A quantitative pilot study, *Br. J. Surg.* 77 (1990) 93–96. doi:10.1002/bjs.1800770132.
- [93] T. Yoshida, R. Tokashiki, H. Ito, A. Shimizu, K. Nakamura, H. Hiramatsu, K. Tsukahara, S. Shimizu, D. Takata, I. Okamoto, M. Suzuki, Therapeutic effects of a new photosensitizer for photodynamic therapy of early head and neck cancer in relation to tissue concentration, *Auris Nasus Larynx.* 35 (2008) 545–551. doi:10.1016/j.anl.2007.10.008.
- [94] K. Hatogai, T. Yano, T. Kojima, M. Onozawa, H. Daiko, S. Nomura, Y. Yoda, T. Doi, K. Kaneko, A. Ohtsu, Salvage photodynamic therapy for local failure after chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma, *Gastrointest. Endosc.* 83 (2016) 1130-1139.e3. doi:10.1016/j.gie.2015.11.016.
- [95] N. Krasner, Laser therapy in the management of benign and malignant tumours in the colon and rectum, *Int. J. Colorectal Dis.* 4 (1989) 2–5. doi:10.1007/BF01648540.
- [96] H.H. Lee, M.G. Choi, T. Hasan, Application of photodynamic therapy in gastrointestinal disorders: An outdated or re-emerging technique?, *Korean J. Intern. Med.* 32 (2017) 10–11. doi:10.3904/kjim.2016.200.
- [97] P.G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Sala, Photodynamic therapy: Update 2006 Part 1: Photochemistry and photobiology, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 21 (2007) 293–302. doi:10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x.
- [98] T.J. Dougherty, M.T. Cooper, T.S. Mang, Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin®, *Lasers Surg. Med.* 10 (1990) 485–488. doi:10.1002/lsm.1900100514.
- [99] P. Mikvy, H. Messmann, H. Debinski, J. Regula, M. Conio, A. MacRobert, A. Spigelman, R. Phillips, S.G. Bown, Photodynamic therapy for polyps in familial adenomatous polyposis-a pilot study, *Eur. J. Cancer.* 31 (1995) 1160–1165. doi:10.1016/0959-8049(95)00276-O.
- [100] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2 (2005) 1–23. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X.

- [101] J.K. Patra, G. Das, L.F. Fraceto, E.V.R. Campos, M.D.P. Rodriguez-Torres, L.S. Acosta-Torres, L.A. Diaz-Torres, R. Grillo, M.K. Swamy, S. Sharma, S. Habtemariam, H.S. Shin, Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects 10 Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and He, J. Nanobiotechnology. 16 (2018) 71. doi:10.1186/s12951-018-0392-8.
- [102] S.A.A. Rizvi, A.M. Saleh, Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology, Saudi Pharm. J. 26 (2018) 64–70. doi:10.1016/j.jsps.2017.10.012.
- [103] J. Kreuter, Drug targeting with nanoparticles, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 19 (1994) 253–256. doi:10.1007/BF03188928.
- [104] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, Nat. Biotechnol. 33 (2015) 941–951. doi:10.1038/nbt.3330.
- [105] C.H.J. Choi, J.E. Zuckerman, P. Webster, M.E. Davis, Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 6656–6661. doi:10.1073/pnas.1103573108.
- [106] A.H. Faraji, P. Wipf, Nanoparticles in cellular drug delivery, Bioorganic Med. Chem. 17 (2009) 2950–2962. doi:10.1016/j.bmc.2009.02.043.
- [107] M. Sechi, S. Vanna, A.M. Roggio, Siliani, P. Massimo, M. Salvatore, A. Mariani, Development of novel cationic chitosan- and anionic alginate–coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol, Int. J. Nanomedicine. 7 (2012) 5501. doi:10.2147/ijn.s36684.
- [108] R. Watkins, L. Wu, C. Zhang, R.M. Davis, B. Xu, Natural product-based nanomedicine: Recent advances and issues, Int. J. Nanomedicine. 10 (2015) 6055–6074. doi:10.2147/IJN.S92162.
- [109] H. Zhong, G. Chan, Y. Hu, H. Hu, D. Ouyang, A comprehensive map of FDA-approved pharmaceutical products, Pharmaceutics. 10 (2018) 263. doi:10.3390/pharmaceutics10040263.
- [110] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, P. V. Hatton, An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering, Int. J. Mol. Sci. 15 (2014) 3640–3659. doi:10.3390/ijms15033640.
- [111] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable

- controlled drug delivery carrier, *Polymers (Basel)*. 3 (2011) 1377–1397. doi:10.3390/polym3031377.
- [112] H.M. Redhead, S.S. Davis, L. Illum, 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*. 70 (2001) 353–363. doi:10.1016/S0168-3659(00)00367-9.
- [113] M. Rojnik, P. Kocbek, F. Moret, C. Compagnin, L. Celotti, M.J. Bovis, J.H. Woodhams, A.J. MacRobert, D. Scheglmann, W. Helfrich, M.J. Verkaik, E. Papini, E. Reddi, J. Kos, In vitro and in vivo characterization of temoporfin-loaded PEGylated PLGA nanoparticles for use in photodynamic therapy, *Nanomedicine*. 7 (2012) 663–677. doi:10.2217/nnm.11.130.
- [114] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *J. Control. Release*. 161 (2012) 505–522. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- [115] E. Swider, O. Koshkina, J. Tel, L.J. Cruz, I.J.M. de Vries, M. Srinivas, Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications, *Acta Biomater*. 73 (2018) 38–51. doi:10.1016/j.actbio.2018.04.006.
- [116] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, Advances and challenges of liposome assisted drug delivery, *Front. Pharmacol*. 6 (2015) 286. doi:10.3389/fphar.2015.00286.
- [117] G. Villaverde, A. Baeza, Targeting strategies for improving the efficacy of nanomedicine in oncology, *Beilstein J. Nanotechnol*. 10 (2019) 168–181. doi:10.3762/bjnano.10.16.
- [118] D.W. Kufe, Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy, *Nat. Rev. Cancer*. 9 (2009) 874–885. doi:10.1038/nrc2761.
- [119] S. Rachagani, M.P. Torres, N. Moniaux, S.K. Batra, Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer, *BioFactors*. 35 (2009) 509–527. doi:10.1002/biof.64.
- [120] M. Bose, P. Mukherjee, Potential of anti-muc1 antibodies as a targeted therapy for gastrointestinal cancers, *Vaccines*. 8 (2020) 1–21. doi:10.3390/vaccines8040659.
- [121] S. Mansuri, P. Kesharwani, K. Jain, R.K. Tekade, N.K. Jain, Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *React. Funct. Polym*. 100 (2016) 151–172. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011.
- [122] L. Serra, J. Doménech, N.A. Peppas, Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents, *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 71

- (2009) 519–528. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.022.
- [123] A.A. Date, J. Hanes, L.M. Ensign, Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art, *J. Control. Release.* 240 (2016) 504–526. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.016.
- [124] I.A. Sogias, A.C. Williams, V. V. Khutoryanskiy, Why is chitosan mucoadhesive?, *Biomacromolecules.* 9 (2008) 1837–1842. doi:10.1021/bm800276d.
- [125] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 641–678. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001.
- [126] F. Ahmadi, Z. Oveisi, M. Samani, Z. Amoozgar, S.M. Samani, Z. Amoozgar, Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications, Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 2015.
- [127] A. Anil, P. Sudheer, Mucoadhesive Polymers - A Review, *J. Pharm. Res.* 17 (2018) 1–11. doi:10.18579/jpcrk/2018/17/1/119566.
- [128] S. Surassmo, N. Saengkrit, R. Ruktanonchai, K. Suktham, N. Woramongkolchai, T. Wutikhun, S. Puttipatkhachorn, U.R. Ruktanonchai, K. Suktham, N. Woramongkolchai, T. Wutikhun, S. Puttipatkhachorn, Surface modification of PLGA nanoparticles by carbopol to enhance mucoadhesion and cell internalization, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 130 (2015) 229–236. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.015.
- [129] K. Netsomboon, A. Bernkop-Schnürch, Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 98 (2016) 76–89. doi:10.1016/j.ejpb.2015.11.003.
- [130] M. Yang, S.K. Lai, Y.Y. Wang, W. Zhong, C. Happe, M. Zhang, J. Fu, J. Hanes, Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50 (2011) 2597–2600. doi:10.1002/anie.201006849.
- [131] J.S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L.M. Ensign, PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99 (2016) 28–51. doi:10.1016/j.addr.2015.09.012.
- [132] Q. Xu, L.M. Ensign, N.J. Boylan, A. Schön, X. Gong, J.C. Yang, N.W. Lamb, S. Cai, T. Yu, E. Freire, J. Hanes, Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus ex Vivo and Distribution in Vivo, *ACS Nano.* 9 (2015) 9217–9227. doi:10.1021/acs.nano.5b03876.

- [133] Z. Wu, C. Guo, S. Liang, H. Zhang, L. Wang, H. Sun, B. Yang, A pluronic F127 coating strategy to produce stable up-conversion NaYF₄:Yb,Er(Tm) nanoparticles in culture media for bioimaging, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 18596–18602. doi:10.1039/c2jm33626j.
- [134] A.M. Sadowska, J. Verbraecken, K. Darquennes, W.A. De Backer, Role of N-acetylcysteine in the management of COPD., *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 1 (2006) 425–434. doi:10.2147/copd.2006.1.4.425.
- [135] C. Müller, K. Leithner, S. Hauptstein, F. Hintzen, W. Salvenmoser, A. Bernkop-Schnürch, Preparation and characterization of mucus-penetrating papain/poly(acrylic acid) nanoparticles for oral drug delivery applications, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1353. doi:10.1007/s11051-012-1353-z.
- [136] A.P. Gadad, V.K. S M, P.M. Dandagi, U.B. Bolmol, N.P. Pallavi, Nanoparticles and their Therapeutic Applications in Pharmacy, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* 7 (2014) 2509–2519. doi:10.37285/ijpsn.2014.7.3.2.
- [137] D.S. Kohane, Microparticles and nanoparticles for drug delivery, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 203–209. doi:10.1002/bit.21301.
- [138] L. Jia, Nanoparticle Formulation Increases Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs: Approaches, Experimental Evidences and Theory, *Curr. Nanosci.* 1 (2005) 237–243. doi:10.2174/157341305774642939.
- [139] H.P. Lassalle, D. Dumas, S. Gräfe, M.A. D'Hallewin, F. Guillemin, L. Bezdetsnaya, Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC, *J. Control. Release.* 134 (2009) 118–124. doi:10.1016/j.jconrel.2008.11.016.
- [140] I. Yakavets, M. Millard, V. Zorin, H.P. Lassalle, L. Bezdetsnaya, Current state of the nanoscale delivery systems for temoporfin-based photodynamic therapy: Advanced delivery strategies, *J. Control. Release.* 304 (2019) 268–287. doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.035.
- [141] S.A. Langhans, Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 6. doi:10.3389/fphar.2018.00006.
- [142] R.C. Mohs, N.H. Greig, Drug discovery and development: Role of basic biological research, *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 3 (2017) 651–657. doi:10.1016/j.trci.2017.10.005.
- [143] C.J. Lovitt, T.B. Shelper, V.M. Avery, Advanced cell culture techniques for cancer drug

- discovery, *Biology (Basel)*. 3 (2014) 345–367. doi:10.3390/biology3020345.
- [144] S. Nath, G.R. Devi, Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model, *Pharmacol. Ther.* 163 (2016) 94–108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
- [145] K. Groebe, W. Mueller-Klieser, Distributions of oxygen, nutrient, and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters, *Eur. Biophys. J.* 19 (1991) 169–181. doi:10.1007/BF00196343.
- [146] G. Mehta, A.Y. Hsiao, M. Ingram, G.D. Luker, S. Takayama, Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy, *J. Control. Release.* 164 (2012) 192–204. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.045.
- [147] J. Friedrich, C. Seidel, R. Ebner, L.A. Kunz-Schughart, Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 309–324. doi:10.1038/nprot.2008.226.
- [148] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 12 (1995) 413–420. doi:10.1023/A:1016212804288.
- [149] Y. Sambuy, I. De Angelis, G. Ranaldi, M.L. Scarino, A. Stammati, F. Zucco, The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics, *Cell Biol. Toxicol.* 21 (2005) 1–26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
- [150] M. Gagnon, A. Zihler Berner, N. Chervet, C. Chassard, C. Lacroix, Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion, *J. Microbiol. Methods.* 94 (2013) 274–279. doi:10.1016/j.mimet.2013.06.027.
- [151] I. Lozoya-Agullo, F. Araújo, I. González-Álvarez, M. Merino-Sanjuán, M. González-Álvarez, M. Bermejo, B. Sarmiento, Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B coculture models to predict intestinal and colonic permeability compared to Caco-2 monoculture, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 1264–1270. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165.
- [152] Å. Sjöberg, M. Lutz, C. Tannergren, C. Wingolf, A. Borde, A.L. Ungell, Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2013) 166–180. doi:10.1016/j.ejps.2012.10.007.

- [153] L.L. Clarke, A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine, *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 296 (2009) G1151–G1166. doi:10.1152/ajpgi.90649.2008.
- [154] P. Viswanathan, Y. Muralidaran, G. Ragavan, Challenges in oral drug delivery: A nano-based strategy to overcome, *Nanostructures Oral Med.* (2017) 173–201. doi:10.1016/B978-0-323-47720-8.00008-0.
- [155] S. Dünnhaupt, O. Kammona, C. Waldner, C. Kiparissides, A. Bernkop-Schnürch, Nano-carrier systems: Strategies to overcome the mucus gel barrier, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96 (2015) 447–453. doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.022.
- [156] J.Y. Lock, T.L. Carlson, R.L. Carrier, Mucus models to evaluate the diffusion of drugs and particles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124 (2018) 34–49. doi:10.1016/j.addr.2017.11.001.
- [157] H. Friedl, S. Dünnhaupt, F. Hintzen, C. Waldner, S. Parikh, J.P. Pearson, M.D. Wilcox, A. Bernkop-Schnürch, Development and evaluation of a novel mucus diffusion test system approved by self-nanoemulsifying drug delivery Systems, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 4406–4413. doi:10.1002/jps.23757.
- [158] A.C. Groo, K. Mircheva, J. Bejaud, C. Ailhas, I. Panaiotov, P. Saulnier, T. Ivanova, F. Lagarce, Development of 2D and 3D mucus models and their interactions with mucus-penetrating paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 31 (2014) 1753–1765. doi:10.1007/s11095-013-1280-4.
- [159] L.D. Li, T. Crouzier, A. Sarkar, L. Dunphy, J. Han, K. Ribbeck, Spatial configuration and composition of charge modulates transport into a mucin hydrogel barrier., *Biophys. J.* 105 (2013) 1357–65. doi:10.1016/j.bpj.2013.07.050.
- [160] A. Ozcelikkale, H.R. Moon, M. Linnes, B. Han, In vitro microfluidic models of tumor microenvironment to screen transport of drugs and nanoparticles, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 9 (2017). doi:10.1002/wnan.1460.
- [161] M. Suggitt, M.C. Bibby, 50 Years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 971–981.
- [162] W.W. Li, V.W. Li, M. Hutnik, A.S. Chiou, Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention, *J. Oncol.* 2012 (2012) 879623. doi:10.1155/2012/879623.
- [163] E.A. Sausville, D.R. Newell, Preclinical models in cancer drug discovery and development, *Eur. J. Cancer.* 40 (2004) 783–784. doi:10.1016/j.ejca.2004.01.010.
- [164] N.A. Lokman, A.S.F. Elder, C. Ricciardelli, M.K. Oehler, Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 9959–

9970. doi:10.3390/ijms13089959.
- [165] G. Gargiulo, Next-generation in vivo modeling of human cancers, *Front. Oncol.* 8 (2018) 429. doi:10.3389/fonc.2018.00429.
- [166] P. Nowak-Sliwinska, T. Segura, M.L. Iruela-Arispe, The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering, *Angiogenesis.* 17 (2014) 779–804. doi:10.1007/s10456-014-9440-7.
- [167] M.L. Graham, M.J. Prescott, The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease., *Eur. J. Pharmacol.* 759 (2015) 19–29. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.040.
- [168] N. De Magalhães, L.-H.L. Liaw, M. Berns, V. Cristini, Z. Chen, D. Stupack, J. Lowengrub, Applications of a new In vivo tumor spheroid based shell-less chorioallantoic membrane 3-D model in bioengineering research, *J. Biomed. Sci. Eng.* 03 (2010) 20–26. doi:10.4236/jbise.2010.31003.
- [169] S.J. Madsen, C.H. Sim, B.J. Tromberg, V. Cristini, N. De Magalhães, H. Hirschberg, Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med.* 38 (2006) 555–564. doi:10.1002/lsm.20350.
- [170] M. Cecilia Subauste, T.A. Kupriyanova, E.M. Conn, V.C. Ardi, J.P. Quigley, E.I. Deryugina, Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems, *Clin. Exp. Metastasis.* 26 (2009) 1033–1047. doi:10.1007/s10585-009-9293-4.
- [171] R. Demir, A. Dimmler, E. Naschberger, I. Demir, T. Papadopoulos, N. Melling, M. Sturzl, W. Hohenberger, Malignant progression of invasive tumour cells seen in hypoxia present an accumulation of β -catenin in the nucleus at the tumour front, *Exp. Mol. Pathol.* 87 (2009) 109–116. doi:10.1016/j.yexmp.2009.05.004.
- [172] ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use ICH Harmonised Tripartite Guideline of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), *Fed. Regist. Vol. 62, No. 96.* (1997).
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (accessed March 17, 2019).
- [173] S. Kromidas, *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH, 2011.
- [174] C. Weiß, *Basiswissen medizinische Statistik: mit 14 Tabellen; [mit Epidemiologie]*, Springer, 2010.

- [175] F.W. Küster, A. Thiel, A. Ruland, Rechentafeln für die chemische Analytik, De Gruyter, 2003.
- [176] H.A. David, H.O. Hartley, E.S. Pearson, The Distribution of the Ratio, in a Single Normal Sample, of Range to Standard Deviation, *Biometrika*. 41 (1954) 482. doi:10.2307/2332728.
- [177] Agilent, Agilent ChemStation, Agil. Technol. (2009) 1–272.
- [178] K. Brink, G. Fastert, E. Ignatowitz, Technische Mathematik und Datenauswertung für Laborberufe, Verl. Europa-Lehrmittel Nourney, Vollmer, 2012.
- [179] A.D. Katsen, B. Vollmar, P. Mestres-Ventura, M.D. Menger, Cell surface and nuclear changes during TNF- α -induced apoptosis in WEHI 164 murine fibrosarcoma cells. A correlative light, scanning, and transmission electron microscopical study, *Virchows Arch*. 433 (1998) 75–83. doi:10.1007/s004280050219.
- [180] A. Katsen-Globa, N. Puetz, M.M. Gepp, J.C. Neubauer, H. Zimmermann, Study of SEM preparation artefacts with correlative microscopy: Cell shrinkage of adherent cells by HMDS-drying, *Scanning*. 38 (2016) 625–633. doi:10.1002/sca.21310.
- [181] J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 471–476. doi:10.1081/DDC-100102197.
- [182] J. Anderski, L. Mahlert, J. Sun, W. Birnbaum, D. Mulac, S. Schreiber, F. Herrmann, D. Kuckling, K. Langer, Light-responsive nanoparticles based on new polycarbonate polymers as innovative drug delivery systems for photosensitizers in PDT, *Int. J. Pharm.* 557 (2019) 182–191. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.12.040.
- [183] C.J. Martínez Rivas, M. Tarhini, W. Badri, K. Miladi, H. Greige-Gerges, Q.A. Nazari, S.A. Galindo Rodríguez, R.Á. Román, H. Fessi, A. Elaissari, Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 66–81. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.064.
- [184] X. Niu, W. Zou, C. Liu, N. Zhang, C. Fu, Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles modified nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35 (2009) 1375–1383. doi:10.3109/03639040902939221.
- [185] Q. Xu, N.J. Boylan, S. Cai, B. Miao, H. Patel, J. Hanes, Scalable method to produce biodegradable nanoparticles that rapidly penetrate human mucus, *J. Control. Release*. 170 (2013) 279–286. doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.035.
- [186] Malvern Instruments, Zetasizer Nano Produktlinie, Booklet. MRK1839-03 (2017) 1–19.

- [https://www.malvernpanalytical.com/de/assets/MRK1839-03-DE-01 Nano series brochure_LRA4-VK_tcm57-17228.pdf](https://www.malvernpanalytical.com/de/assets/MRK1839-03-DE-01_Nano_series_brochure_LRA4-VK_tcm57-17228.pdf) (01.08.2019).
- [187] Malvern Panalytical Ltd., Dynamic light scattering: An introduction in 30 minutes. Technical note (MRK656-01), 2018. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction>.
- [188] Z. Zhang, S.S. Feng, The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles, *Biomaterials*. 27 (2006) 4025–4033. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.006.
- [189] M. Yasir, U.V.S. Sara, Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: In vitro drug release and pharmacokinetics evaluation, *Acta Pharm. Sin. B*. 4 (2014) 454–463. doi:10.1016/j.apsb.2014.10.005.
- [190] CLS Product Information: HuTu-80, in: 1992: pp. 2–4. <https://www.clsghmbh.de/pdf/u-251-mg.pdf>.
- [191] J. Fogh, G. Trempe, New Human Tumor Cell Lines, in: *Hum. Tumor Cells Vitro.*, Springer US, Boston, MA, 1975: pp. 115–159. doi:10.1007/978-1-4757-1647-4_5.
- [192] L. Elberskirch, T. Knoll, A. Moosmann, N. Wilhelm, H. von Briesen, S. Wagner, A novel microfluidic mucus-chip for studying the permeation of compounds over the mucus barrier, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 54 (2019) 101248. doi:10.1016/j.jddst.2019.101248.
- [193] M. Boegh, M. García-Díaz, A. Müllertz, H.M. Nielsen, Steric and interactive barrier properties of intestinal mucus elucidated by particle diffusion and peptide permeation., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95 (2015) 136–43. doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.014.
- [194] S. Bhattacharya, A. Datta, J.M. Berg, S. Gangopadhyay, Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength, *J. Microelectromechanical Syst.* 14 (2005) 590–597. doi:10.1109/JMEMS.2005.844746.
- [195] C.M. Costello, M.B. Phillipsen, L.M. Hartmanis, M.A. Kwasnica, V. Chen, D. Hackam, M.W. Chang, W.E. Bentley, J.C. March, Microscale Bioreactors for in situ characterization of GI epithelial cell physiology, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. doi:10.1038/s41598-017-12984-2.
- [196] H.J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D.E. Ingber, Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow, *Lab Chip*. 12 (2012)

- 2165–2174. doi:10.1039/c2lc40074j.
- [197] K. Zabielska-Koczywas, A. Wojtkowska, I. Dolka, A. Małek, M. Walewska, A. Wojtalewicz, A. Zbikowski, R. Lechowski, 3D chick embryo chorioallantoic membrane model as an in vivo model to study morphological and histopathological features of feline fibrosarcomas, *BMC Vet. Res.* 13 (2017) 201. doi:10.1186/s12917-017-1114-4.
- [198] C.E. Canman, H.Y. Tang, D.P. Normolle, T.S. Lawrence, J. Maybaum, Variations in patterns of DNA damage induced in human colorectal tumor cells by 5-fluorodeoxyuridine: Implications for mechanisms of resistance and cytotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 10474–10478. doi:10.1073/pnas.89.21.10474.
- [199] J.-W. Hofman, M.G. Carstens, F. van Zeeland, C. Helwig, F.M. Flesch, W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Photocytotoxicity of mTHPC (Temoporfin) Loaded Polymeric Micelles Mediated by Lipase Catalyzed Degradation, *Pharm. Res.* 25 (2008) 2065. doi:10.1007/S11095-008-9590-7.
- [200] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA. Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- [201] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [202] P. Bults, N.C. Van De Merbel, R. Bischoff, Quantification of biopharmaceuticals and biomarkers in complex biological matrices: A comparison of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and ligand binding assays, *Expert Rev. Proteomics.* 12 (2015) 355–374. doi:10.1586/14789450.2015.1050384.
- [203] L.R. Michels, F.N.S. Fachel, J.H. Azambuja, N.E. Gelsleichter, E. Braganhol, H.F. Teixeira, HPLC–UV method for temozolomide determination in complex biological matrices: Application for in vitro, ex vivo and in vivo studies, *Biomed. Chromatogr.* 33 (2019). doi:10.1002/bmc.4615.
- [204] Application Guide Ultra Fast HPLC, YMC Europe GmbH, YMC Europe GmbH, n.d. www.ymc.de.
- [205] D. Šatínský, D. Kameníčková, P. Chocholouš, P. Solich, Fast HPLC method for determination of fenoxycarb and permethrin in antiparasitic veterinary shampoo using fused-core column, *Chromatographia.* 76 (2013) 1559–1564. doi:10.1007/s10337-013-2464-0.

- [206] I. Brabcová, L. Kovářová, D. Šatínský, L. Havlíková, P. Solich, A Fast HPLC Method for Determination of Vitamin E Acetate in Dietary Supplements Using Monolithic Column, *Food Anal. Methods*. 6 (2013) 380–385. doi:10.1007/s12161-012-9452-0.
- [207] B. Drasler, D. Vanhecke, L. Rodriguez-Lorenzo, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, Quantifying nanoparticle cellular uptake: Which method is best?, *Nanomedicine*. 12 (2017) 1095–1099. doi:10.2217/nnm-2017-0071.
- [208] E. Guehrs, M. Schneider, C.M. Günther, P. Hessing, K. Heitz, D. Wittke, A. López-Serrano Oliver, N. Jakubowski, J. Plendl, S. Eisebitt, A. Haase, Quantification of silver nanoparticle uptake and distribution within individual human macrophages by FIB/SEM slice and view, *J. Nanobiotechnology*. 15 (2017) 21. doi:10.1186/s12951-017-0255-8.
- [209] B. Roda, A. Zattoni, P. Reschiglian, M.H. Moon, M. Mirasoli, E. Michelini, A. Roda, Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends, *Anal. Chim. Acta*. 635 (2009) 132–143. doi:10.1016/j.aca.2009.01.015.
- [210] A. Engel, M. Plöger, D. Mulac, K. Langer, Asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) for the quantification of nanoparticle release from tablets during dissolution testing, *Int. J. Pharm.* 461 (2014) 137–144. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.11.044.
- [211] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 105–119. doi:10.1016/j.jpba.2013.03.012.
- [212] C.K. Zacharis, Accelerating the quality control of pharmaceuticals using monolithic stationary phases: A review of recent HPLC applications, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 443–451. doi:10.1093/chromsci/47.6.443.
- [213] Brown W, *Dynamic Light Scattering: The Method and Some Applications*, 16 Diffusing-wave spectroscopy, (1993).
- [214] F.C. Iswanti, I. Nurulita, S. Djauzi, M. Sadikin, A.B. Witarto, T. Yamazaki, Preparation, characterization, and evaluation of chitosan-based nanoparticles as CpG ODN carriers, *Biotechnol. Equip.* 33 (2019) 390–396. doi:10.1080/13102818.2019.1578690.
- [215] J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R.N. Zare, S.S. Gambhir, Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomedicine*. 6 (2011) 715–728. doi:10.2217/nnm.11.19.
- [216] M.A. Mohammed, J.T.M. Syeda, K.M. Wasan, E.K. Wasan, An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery, *Pharmaceutics*. 9 (2017). doi:10.3390/pharmaceutics9040053.

- [217] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2), *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 265–273. doi:10.4314/tjpr.v12i2.20.
- [218] S.A. Wissing, O. Kayser, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1257–1272. doi:10.1016/j.addr.2003.12.002.
- [219] C. Jacobs, O. Kayser, R.H. Müller, Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide, *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 161–164. doi:10.1016/S0378-5173(99)00412-3.
- [220] N.K. Al-Nemrawi, A.R. Okour, R.H. Dave, Surface modification of PLGA nanoparticles using chitosan: Effect of molecular weight, concentration, and degree of deacetylation, *Adv. Polym. Technol.* 37 (2018) 3066–3075. doi:10.1002/adv.22077.
- [221] Y. Wang, P. Li, L. Kong, Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery, *AAPS PharmSciTech.* 14 (2013) 585–592. doi:10.1208/s12249-013-9943-3.
- [222] A.K. Singla, M. Chawla, A. Singh, Potential applications of carbomer in oral mucoadhesive controlled drug delivery system: A review, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 913–924. doi:10.1081/DDC-100101318.
- [223] C. Jacobs, Neue Nanosuspensionsformulierungen für verschiedene Applikationsformen, Ina. Im Fachbereich Biol. Chemie, Pharm. Der Freien Univ. Berlin. (2003) 120–148.
- [224] A.L.Z. Lee, Y. Wang, H.Y. Cheng, S. Pervaiz, Y.Y. Yang, The co-delivery of paclitaxel and Herceptin using cationic micellar nanoparticles, *Biomaterials.* 30 (2009) 919–927. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.062.
- [225] S. Muroa, Drug delivery across physiological barriers, 2016. doi:10.4032/9789814669412.
- [226] M. Boegh, C. Foged, A. Müllertz, H. Mørck Nielsen, Mucosal drug delivery: barriers, in vitro models and formulation strategies, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 23 (2013) 383–391. doi:10.1016/S1773-2247(13)50055-4.
- [227] S.S. Olmsted, J.L. Padgett, A.I. Yudin, K.J. Whaley, T.R. Moench, R.A. Cone, Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus, *Biophys. J.* 81 (2001) 1930–1937. doi:10.1016/S0006-3495(01)75844-4.
- [228] K. Maisel, L. Ensign, M. Reddy, R. Cone, J. Hanes, Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the

- gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse, *J. Control. Release.* 197 (2015) 48–57. doi:10.1016/j.jconrel.2014.10.026.
- [229] F. Franks, Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 221–229. doi:10.1016/S0939-6411(98)00004-6.
- [230] P. Li, H.M. Nielsen, A. Müllertz, Oral delivery of peptides and proteins using lipid-based drug delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 1289–1304. doi:10.1517/17425247.2012.717068.
- [231] G. Fricker, T. Kromp, A. Wendel, A. Blume, J. Zirkel, H. Rebmann, C. Setzer, R.O. Quinkert, F. Martin, C. Müller-Goymann, Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery, *Pharm. Res.* 27 (2010) 1469–1486. doi:10.1007/s11095-010-0130-x.
- [232] A.K. Biswas, M.R. Islam, Z.S. Choudhury, A. Mostafa, M.F. Kadir, Nanotechnology based approaches in cancer therapeutics, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2014) 043001. doi:10.1088/2043-6262/5/4/043001.
- [233] J.M. Hughes, P.M. Budd, A. Grieve, P. Dutta, K. Tiede, J. Lewis, Highly monodisperse, lanthanide-containing polystyrene nanoparticles as potential standard reference materials for environmental “nano” fate analysis, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015) n/a-n/a. doi:10.1002/app.42061.
- [234] C. Amgoth, K. Kumar, M. Himadri, P. Paik, Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery, in: S.R. Garg (Ed.), *Colloids Drug Deliv.*, 2014: pp. 99–123.
- [235] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics.* 10 (2018) 1–17. doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
- [236] T. Lesuffleur, A. Barbat, E. Dussaulx, A. Zweibaum, Growth Adaptation to Methotrexate of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-secreting Cells, *Cancer Res.* 50 (1990) 6334–6343.
- [237] I. Assanga, Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities, *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 4 (2013) 60–70. doi:10.5897/ijbmr2013.0154.
- [238] C. Lange, C. Lehmann, M. Mahler, P.J. Bednarski, Comparison of cellular death pathways after mTHPC-mediated photodynamic therapy (PDT) in five human cancer

- cell lines, *Cancers (Basel)*. 11 (2019) 702. doi:10.3390/cancers11050702.
- [239] N. Rousset, E. Kerninon, S. Eléouet, T. Le Néel, J.L. Auget, V. Vonarx, J. Carré, Y. Lajat, T. Patrice, Use of alkaline Comet assay to assess DNA repair after m-THPC-PDT, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 56 (2000) 118–131. doi:10.1016/S1011-1344(00)00053-1.
- [240] T. Kiesslich, J. Berlanda, K. Plaetzer, B. Krammer, F. Berr, 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.* 6 (2007) 619–627. doi:10.1039/b617659c.
- [241] G. Bœuf-Muraille, G. Rigaux, M. Callewaert, N. Zambrano, L. Van Gulick, V.G. Roullin, C. Terryn, M.C. Andry, F. Chuburu, S. Dukic, M. Molinari, Evaluation of mTHPC-loaded PLGA nanoparticles for in vitro photodynamic therapy on C6 glioma cell line, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 25 (2019) 448–455. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.01.026.
- [242] F.P. Navarro, G. Creusat, C. Frochot, A. Moussaron, M. Verhille, R. Vanderesse, J.S. Thomann, P. Boisseau, I. Texier, A.C. Couffin, M. Barberi-Heyob, Preparation and characterization of mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 130 (2014) 161–169. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.11.007.
- [243] H. Engman, Cytochrome P450 3A and ABC-Transport Proteins. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* 296. 61 pp. Uppsala., 2003.
- [244] W.J. Brownlee, F.P. Seib, Impact of the hypoxic phenotype on the uptake and efflux of nanoparticles by human breast cancer cells, *Sci. Rep.* 8 (2018) 12318. doi:10.1038/s41598-018-30517-3.
- [245] A.C. Jaramillo, F. Al Saig, J. Cloos, G. Jansen, G.J. Peters, How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance?, *Cancer Drug Resist.* 1 (2018) 6–29. doi:10.20517/cdr.2018.02.
- [246] K. Löw, T. Knobloch, S. Wagner, A. Wiehe, A. Engel, K. Langer, H. Von Briesen, Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free mTHPC and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells, *Nanotechnology*. 22 (2011). doi:10.1088/0957-4484/22/24/245102.
- [247] A. Zuchowska, E. Jastrzebska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, Advanced 3D Spheroid Culture for Evaluation of Photodynamic Therapy in Microfluidic System, in: *Procedia Eng.*, Elsevier, 2016: pp. 403–406. doi:10.1016/j.proeng.2016.11.184.

- [248] E. Jastrzebska, M. Bulka, N. Rybicka, K. Zukowski, Analysis of the efficiency of photodynamic therapy using a microsystem for mono-, co- and mixed cultures, *Sensors Actuators, B Chem.* 221 (2015) 1356–1365. doi:10.1016/j.snb.2015.08.022.
- [249] M. Yoshida, A. Hoshi, K. Kuretani, T. Kanai, M. Ichino, Action of 5 fluorocyclocytidine on cultured L 5178Y cells, *Gann, Japanese J. Cancer Res.* 66 (1975) 561–564. doi:10.20772/cancersci1959.66.5_561.
- [250] J.L. Wilding, W.F. Bodmer, Cancer cell lines for drug discovery and development, *Cancer Res.* 74 (2014) 2377–2384. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
- [251] Honek J, *Preclinical Research in Drug Development, Med. Writ.* 26 (2017) 5–8.
- [252] S. Sant, P.A. Johnston, The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery, *Drug Discov. Today Technol.* 23 (2017) 27–36. doi:10.1016/j.ddtec.2017.03.002.
- [253] M.A. Hollingsworth, B.J. Swanson, Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface, *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 45–60. doi:10.1038/nrc1251.
- [254] J.A. Nicolazzo, B.L. Reed, B.C. Finnin, The Effect of Various in Vitro Conditions on the Permeability Characteristics of the Buccal Mucosa, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 2399–2410. doi:10.1002/jps.10505.
- [255] J. Stab, I. Zlatev, B. Raudszus, S. Meister, C.U. Pietrzik, K. Langer, H. Von Briesen, S. Wagner, Flurbiprofen-loaded Nanoparticles can Cross a Primary Porcine In vitro Blood-Brain Barrier Model to Reduce Amyloid- B 42 Burden, *J. Nanomedicine. Biotherapeutic Discov.* 6 (2016) 1–10. doi:10.4172/2155-983X.Page.
- [256] A. Alemka, M. Clyne, F. Shanahan, T. Tompkins, N. Corcionivoschi, B. Bourke, Probiotic colonization of the adherent mucus layer of HT29MTXE12 cells attenuates *Campylobacter jejuni* virulence properties, *Infect. Immun.* 78 (2010) 2812–2822. doi:10.1128/IAI.01249-09.
- [257] D.W. Blaser, Determination of drug absorption parameters in Caco-2 cell monolayers with a mathematical model encompassing passive diffusion , *Inauguraldissertation, Basel, 2007.*
- [258] X. Cai, A. Walker, C. Cheng, A. Paiva, Y. Li, J. Kolb, J. Herbst, W. Shou, H. Weller, Approach to improve compound recovery in a high-throughput Caco-2 permeability assay supported by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2755–2762. doi:10.1002/jps.23194.
- [259] J. Yu, N. Li, P. Lin, Y. Li, X. Mao, G. Bao, W. Gu, R. Zhao, Intestinal transportations of main chemical compositions of *Polygoni Multiflori Radix* in Caco-2 cell model, Evidence-

- Based Complement. *Altern. Med.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/483641.
- [260] K.K. V Kumar, S. Karnati, M.B. Reddy, R. Chandramouli, Caco-2 cell lines in drug discovery- an updated perspective., *J. Basic Clin. Pharm.* 1 (2010) 63–9.
- [261] F.J.O. Varum, F. Veiga, J.S. Sousa, A.W. Basit, Mucus thickness in the gastrointestinal tract of laboratory animals, *J. Pharm. Pharmacol.* 64 (2012) 218–227. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01399.x.
- [262] T.T. Kararli, Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals, *Biopharm. Drug Dispos.* 16 (1995) 351–380. doi:10.1002/bdd.2510160502.
- [263] J. Sotres, S. Jankovskaja, K. Wannerberger, T. Arnebrant, Ex-Vivo Force Spectroscopy of Intestinal Mucosa Reveals the Mechanical Properties of Mucus Blankets, *Sci. Rep.* 7 (2017) 7270. doi:10.1038/s41598-017-07552-7.
- [264] H. Li, D.N. Sheppard, M.J. Hug, Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber, *J. Cyst. Fibros.* 3 (2004) 123–126. doi:10.1016/j.jcf.2004.05.026.
- [265] A. Lechanteur, J. das Neves, B. Sarmiento, The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124 (2018) 50–63. doi:10.1016/j.addr.2017.07.019.
- [266] B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems, *J. Lab. Autom.* 20 (2015) 107–126. doi:10.1177/2211068214561025.
- [267] S.S. Davis, J.G. Hardy, J.W. Fara, Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine, *Gut.* 27 (1986) 886–892. doi:10.1136/gut.27.8.886.
- [268] B.K. Gale, A.R. Jafek, C.J. Lambert, B.L. Goenner, H. Moghimifam, U.C. Nze, S.K. Kamarapu, A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects, *Inventions.* 3 (2018) 60. doi:10.3390/inventions3030060.
- [269] N. Gupta, J.R. Liu, B. Patel, D.E. Solomon, B. Vaidya, V. Gupta, Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research, *Bioeng. Transl. Med.* 1 (2016) 63–81. doi:10.1002/btm2.10013.
- [270] M.C. Bélanger, Y. Marois, Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: A review, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 467–477. doi:10.1002/jbm.1043.

- [271] A. Piruska, I. Nikcevic, S.H. Lee, C. Ahn, W.R. Heineman, P.A. Limbach, C.J. Seliskar, The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation, *Lab Chip*. 5 (2005) 1348–1354. doi:10.1039/b508288a.
- [272] F. Hua, Y. Sun, A. Gaur, M.A. Meitl, L. Bilhaut, L. Rotkina, J. Wang, P. Geil, M. Shim, J.A. Rogers, A. Shim, Polymer imprint lithography with molecular-scale resolution, *Nano Lett.* 4 (2004) 2467–2471. doi:10.1021/nl048355u.
- [273] S.G. Charati, S.A. Stern, Diffusion of gases in silicone polymers: Molecular dynamics simulations, *Macromolecules*. 31 (1998) 5529–5535. doi:10.1021/ma980387e.
- [274] E. Leclerc, Y. Sakai, T. Fujii, Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane), *Biomed. Microdevices*. 5 (2003) 109–114. doi:10.1023/A:1024583026925.
- [275] K.Y. Chumbimuni-Torres, R.E. Coronado, A.M. Mfuh, C. Castro-Guerrero, M.F. Silva, G.R. Negrete, R. Bizios, C.D. Garcia, Adsorption of proteins to thin-films of PDMS and its effect on the adhesion of human endothelial cells, *RSC Adv.* 1 (2011) 706–714. doi:10.1039/c1ra00198a.
- [276] X. Zhang, W. Dong, H. Cheng, M. Zhang, Y. Kou, J. Guan, Q. Liu, M. Gao, X. Wang, S. Mao, Modulating intestinal mucus barrier for nanoparticles penetration by surfactants, *Asian J. Pharm. Sci.* 14 (2019) 543–551. doi:10.1016/j.ajps.2018.09.002.
- [277] S. Varma, J. Voldman, A cell-based sensor of fluid shear stress for microfluidics, *Lab Chip*. 15 (2015) 1563–1573. doi:10.1039/c4lc01369g.
- [278] F.J. Armistead, J. Gala De Pablo, H. Gadêlha, S.A. Peyman, S.D. Evans, Cells Under Stress: An Inertial-Shear Microfluidic Determination of Cell Behavior, *Biophys. J.* 116 (2019) 1127–1135. doi:10.1016/j.bpj.2019.01.034.
- [279] R. Steele, A. Doiron, R. Shepherd, K. Rinker, Effect of disturbed flow on nanoparticle uptake in endothelial cells, 22 (2011).
- [280] E.K. Breitner, S.M. Hussain, K.K. Comfort, The role of biological fluid and dynamic flow in the behavior and cellular interactions of gold nanoparticles, *J. Nanobiotechnology*. 13 (2015) 56. doi:10.1186/s12951-015-0117-1.
- [281] A. Lebelt, J. Dzieciół, K. Guzińska-Ustymowicz, D. Lemancewicz, L. Zimnoch, E. Czykier, Angiogenesis in gliomas, *Folia Histochem. Cytobiol.* 46 (2008) 69–72. doi:10.2478/v10042-008-0009-4.
- [282] X. Xiao, X. Zhou, H. Ming, J. Zhang, G. Huang, Z. Zhang, P. Li, Chick chorioallantoic membrane assay: A 3D animal model for study of human nasopharyngeal carcinoma,

- PLoS One. 10 (2015) e0130935. doi:10.1371/journal.pone.0130935.
- [283] D.S. Dohle, S.D. Pasa, S. Gustmann, M. Laub, J.H. Wissler, H.P. Jennissen, N. Dünker, Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: How it really works, *J. Vis. Exp.* (2010). doi:10.3791/1620.
- [284] M. Rosenbruch, The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs, *ALTEX*. 14 (1997) 111–113.
- [285] P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas, F.A. Stewart, Foscan® uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy, *Br. J. Cancer*. 88 (2003) 283–290. doi:10.1038/sj.bjc.6600682.
- [286] D. Meier, C. Campanile, S.M. Botter, W. Born, B. Fuchs, Cytotoxic efficacy of photodynamic therapy in osteosarcoma Cells In Vitro, *J. Vis. Exp.* (2014) 2–7. doi:10.3791/51213.
- [287] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin, Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer, *Cancers (Basel)*. 3 (2011) 2516–2539. doi:10.3390/cancers3022516.
- [288] D. Kessel, Y. Luo, Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 42 (1998) 89–95. doi:10.1016/S1011-1344(97)00127-9.

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

L. Elberskirch, T. Knoll, A. Moosmann, N. Wilhelm, H. von Briesen, S. Wagner. A novel microfluidic mucus-chip for studying the permeation of compounds over the mucus barrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 54 (2019) [192]; Auszeichnung: Best Paper Award "Most outstanding JDDST research article in 2019"

L. Elberskirch, T. Knoll, Rebecca Königsmark, Janis Renner, N. Wilhelm, H. von Briesen, S. Wagner. Microfluidic 3D intestine tumor spheroid model for efficient in vitro characterization of nanoparticulate formulations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*; angenommen

L. Elberskirch, Ronan Le Harzic, Gerhard Wieland, Arno Wiehe, H. von Briesen, S. Wagner. A HET-CAM based vascularized intestine tumor model as a screening platform for nano-formulated photosensitizers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; in Vorbereitung

Poster

Rottendorf Pharma GmbH; biolitec research GmbH; Westfälische Wilhelms-Universität Münster; **Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik**; Universität Paderborn; Pharmacelsus GmbH; CeramOptec GmbH. Zielgesteuerte BioTransporter oral applizierter Photosensibilisatoren zur photodynamischen Therapie gastrointestinaler Carcinome (GITCare). 4. BMBF-Symposium „ProMatLeben“, Nürnberg (Germany), Juni 2016

L. Elberskirch, S. Wien, N. Wilhelm, S. Wagner. Skin permeation testing via reconstructed human epidermis. 5th Galenus Workshop, Berlin (Deutschland), November 2016

L. Elberskirch, N. Wilhelm, S. Wagner. An ex vivo model to analyse transport across the small intestine barrier. 19th Barriere- and Transport-Meeting, Bad Herrenalb (Germany), Mai 2017

L. Elberskirch, T. Knoll, R. Königsmark, J. Renner, N. Wilhelm, H. von Briesen, S. Wagner. A novel fluidic intestine-tumour-model as a tool to study the ability of nanoparticles to adsorb and permeate in a fluidic system. 11th European and Global Summit for Clinical Nanomedicine, Targeted Delivery and Precision Medicine, Basel (Schweiz), September 2018

Vorträge

L. Elberskirch, T. Knoll, H. von Briesen, S. Wagner. A novel fluidic intestine-tumour-model to characterize nanoparticles. 11th European and Global Summit for Clinical Nanomedicine, Targeted Delivery and Precision Medicine, Basel (Schweiz), September 2018

L. Elberskirch, A. Schulz. Fish-Feed-Carrier. Ideenwettbewerb »Mashup – gut gemischt ist halb gewonnen!«, Fraunhofer-Symposium Netzwerk, München (Deutschland), Februar 2018

Patent

Patent DE 10 2017 000 896 A1 2018.08.02: H. Zimmermann, H. von Briesen, A. Schulz, **L. Elberskirch**, S. Wagner. Selektives Freisetzungssystem für Tumorthapeutika und Tumordiagnostika sowie Biosensor für Tumorgewebe

Danke!

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Heiko Zimmermann für die Möglichkeit, die Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT durchführen zu dürfen und seinem Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hagen von Briesen für die Betreuung der Promotion und seine fortwährende Unterstützung in allen wissenschaftlichen Belangen.

Frau Prof. Dr. Martina Sester für die Übernahme des Koreferats meiner Arbeit.

Frau Dr. Sylvia Wagner für Ihre Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft und fortwährende Unterstützung in allen wissenschaftlichen Belangen.

Den Partnern des Projektes „GIT-Care“ für die gute Kooperation und die wissenschaftlichen Diskussionen. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Juliane Anderski und Prof. Dr. Klaus Langer (Westfälische Wilhelms-Universität Münster) für die Bereitstellung der nanopartikulären Formulierungen sowie Herrn Dr. Arno Wiehe und Dr. Gerhard Wieland (biolitec® research GmbH) für die Bereitstellung der freien Photosensibilisatoren und der liposomalen Formulierungen.

Herrn Thorsten Knoll für die Unterstützung bei der Herstellung der Mikrofluidik-Chips und des Darm-Tumor-Modells sowie seiner stetigen Bereitschaft zur kritischen Diskussion.

Herrn Dr. Ronan Le Harzic für die Unterstützung bei der Entwicklung und Konstruktion der fokussierten Bestrahlungseinheit.

Frau Rebecca Königsmark und Herrn Janis Renner für ihre Unterstützung im Rahmen ihrer Masterarbeiten sowie Max Sokoli im Rahmen seiner Ausbildung.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Hauptabteilung medizinische Biotechnologie für das großartige Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnen möchte ich hierbei meine Kollegin und Weggefährtin Michelle Hesler mit der ein steter wissenschaftlicher Austausch stattfand.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Michael Elberskirch für die permanente Unterstützung und liebevolle Begleitung auf meinem Weg zur Promotion.