Die Entwicklung eines Aptamer-modifizierten Polymer-Nanopartikelsystems zur zielgerichteten Freisetzung von Wirkstoffen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von

Julia Gisela Bernadette Modrejewski, M. Sc.

[2019]

Referent:	Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent:	Prof. Dr. Cornelia Blume
Tag der Promotion:	26.03.2019

„Wir stehen immer noch vor der Tür, hinter der die großen Antworten warten."

Arthur Miller, *17.10.1915, † 20.02.2005
amerikanischer Schriftsteller und Dramatiker

Danksagung

Zunächst danke ich der *Hannover School for Biomolecular Drug Research* (HSBDR) für die Unterstützung meiner Promotion im Rahmen eines dreijährigen Promotionsstipendiums.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit, am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, meine Dissertation anfertigen zu können sowie für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Frau Prof. Dr. Blume.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Johanna G. Walter für die tolle Betreuung und Korrektur meiner Arbeit. Danke, dass ich mit jeder Idee und Frage zu dir kommen konnte. Danke auch für das schöne Arbeitsklima. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht, mit dir zu arbeiten.

Meinen fleißigen Masteranden Sandra Kuhlmeier und Torsten Schüling danke ich ebenfalls, genauso meinen beiden Bachelorandinnen Lena Harmening und Lisa Gülker. Ein ganz spezieller Dank geht an Shira Engelberg, Kooperationspartnerin dieses Projektes.

Bei Laura Altenschmidt, Pascal Rusch, Dennis Wachsmuth, Peter Kraus, Imme Kretschmer und Hamza Belhadj bedanke ich mich für die Bereitstellung von NTA und Zetaanalyzer sowie für die Messung meiner Proben am TEM und FTIR.

Danke an Martina! Du warst stets mit Rat und Tat dabei und auf dich ist immer Verlass!

Den Werkstätten danke ich ebenfalls für jegliche Unterstützung. Insbesondere Kai danke ich für zahlreiche Fahrradreparaturen. Friedbert, Thorsten und Bodo: vielen Dank für viele nette und witzige Kaffeerunden, das Bereitstellen eurer Räumlichkeiten für meine Fahrräder und das Ansprühen der Hutplatten!

Für die unvergesslichen Jahre am TCI möchte ich allen Kollegen danken. Es war eine sehr schöne, lustige und manchmal auch recht anstrengende Zeit, die ich sehr vermissen werde.

Vor allem danke ich den Personen, die mir in den letzten Jahren am TCI besonders ans Herz gewachsen sind und mit denen mich eine tolle Freundschaft verbindet.

Abschließend möchte ich meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung, egal in welcher Situation, danken. Ohne Euch wäre ich nichts. Ich liebe Euch!

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 9

2 Zielsetzung 10

3 Theoretischer Hintergrund 11

3.1 *Drug Delivery* Systeme 11

3.1.1 Passives Targeting 13

3.1.2 *Targeted Drug Delivery* Systeme 15

3.2 Drug Delivery Systeme in der klinischen Anwendung 30

4 Experimenteller Teil 32

4.1 Entwicklung des *Targeted Drug Delivery* Systems 33

4.1.1 Polymersynthese 33

4.1.2 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel 37

4.1.3 Lagerstabilität der Partikel 50

4.1.4 Funktionalisierung der Partikel 51

4.1.5 Einkapselung von Wirkstoffen 62

4.1.6 Schlussfolgerung/ Zusammenfassung 4.1 68

4.2 In Vitro Untersuchungen des entwickelten *Targeted Drug Delivery* Systems 70

4.2.1 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung 70

4.2.2 Untersuchung der Toxizität des entwickelten TDDS auf die Zellen 74

4.2.3 Analyse der Aptamerspezifität für adhärente A549 Zellen 80

4.2.4 Zelluläre Aufnahme von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln 86

4.2.5 Untersuchung der Toxizität des optimierten TDDS 93

5 Zusammenfassung und Ausblick 96

Anhang 100

6 Material und Methoden 100

6.1 Materialien 100

6.1.1 Zellen 100
6.1.2 Medien 102
6.1.3 Puffer und Lösungen 102
6.1.4 Chemikalien 102
6.1.5 Verwendete Aptamere 104
6.1.6 Verbrauchsmaterialien 104
6.1.7 Geräte 105
6.2 Methoden 107
6.2.1 Herstellung der Polymere 107
6.2.2 Nanopartikelherstellung 108
6.2.3 Einkapselung von (Modell-)Wirkstoffen 109
6.2.4 Funktionalisierung der Nanopartikel mit Aptameren 109
6.2.5 Charakterisierung der Partikel 112
6.2.6 Zellkulturtechniken 117
6.2.7 Charakterisierung der Bindung und zellulären Aufnahme von Aptamer-Nanopartikel-Konjugaten an Zellen 118
6.2.8 Charakterisierung der Wirkstoffaufnahme in die Zellen 120
6.2.9 Zellassays 120
6.2.10 Durchflusszytometrische Messungen 123
Literaturverzeichnis 126
Abkürzungsverzeichnis 138
Abbildungsverzeichnis 140
Tabellenverzeichnis 146
Lebenslauf 147
Publikationsliste 148

Kurzfassung

Konventionelle *Drug Delivery* Systeme weisen häufig Limitierungen wie beispielsweise die unspezifische Wirkstofffreisetzung auf, wodurch es zu unerwünschten Nebenwirkungen kommt. Daher ist es notwendig, *Targeted Drug Delivery* Systeme (TDDS) zu entwickeln, die eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes am gewünschten Wirkort ermöglichen. In der vorliegenden Dissertation besteht dieses TDDS aus Polycaprolacton-basierten Polymer-Nanopartikeln. Nanopartikel eignen sich aufgrund ihrer geringen Größe und der daraus resultierenden hohen zellulären Aufnahme als Träger für TDDS. Die Funktionalisierung mit Aptameren auf der Oberfläche der Nanopartikel sorgt für eine spezifische Bindung an den Zielzellen. Aptamere eignen sich u.a. aufgrund ihrer niedrigen Immunogenität gut für den Einsatz im menschlichen Körper.

Nach erfolgreich optimierter Herstellung der Nanopartikel, konnte das S15 Aptamer, das gegen die Lungenkrebszelllinie A549 gerichtet ist, auf der Oberfläche immobilisiert werden. Die Nanopartikel hatten eine Größe zwischen 50 und 100 nm, die für Nanoträger ideal ist, um sich in den Zielzellen anreichern zu können und nicht durch die Nieren oder die Leber aus dem Blutkreislauf herausgefiltert zu werden. In die Nanopartikel wurden erfolgreich die Wirkstoffe Paclitaxel und Camptothecin, die gegen verschiedene Arten von Krebs eingesetzt werden, eingekapselt. In Wasser bleiben die mit Wirkstoff beladenen Partikel stabil. Die Freisetzung des Wirkstoffes, die bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht wurde, erfolgt bevorzugt in saurem Milieu, welches auch von Tumorzellen ausgebildet wird. Das entwickelte TDDS wurde abschließend *in vitro* untersucht. Dabei ist die Dichte des auf den Nanopartikeln immobilisierten Aptamers für eine spezifische Bindung an die Zielzellen verantwortlich. Ist die Dichte zu hoch, kann diese aufgrund sterischer Hinderungen zu unspezifischen Bindungen an die Kontrollzelllinie HeLa führen.

Weiterhin wurde untersucht, über welchen Weg die Nanopartikel in die Zielzellen aufgenommen werden. Dazu kamen mit S15 konjugierte Quantum Dots (QDs) als Modellpartikel zum Einsatz, die wegen ihrer Fluoreszenzeigenschaften leichter detektierbar waren. Die funktionalisierten QDs werden über die Rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Abschließend wurde das entwickelte *Targeted Drug Delivery* System hinsichtlich seiner Toxizität auf die Zielzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die mit Wirkstoff beladenen und mit S15 funktionalisierten Polymer-Nanopartikel einen toxischen Effekt auf die Lungenkrebszellen haben. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit das *Targeted Drug Delivery* System erfolgreich entwickelt und *in vitro* eingesetzt werden.

Schlagworte: *Targeted Drug Delivery*, Polymer-Nanopartikel, Aptamere, Rezeptorvermittelte Endozytose

Abstract

Conventional Drug Delivery Systems often have limitations such as non-specific drug delivery, which leads to undesired side effects. Therefore, there is an effort to develop Targeted Drug Delivery Systems (TDDS), that allow the controlled release of the drug at the desired site of action. In this thesis, the TDDS consists of polycaprolactone-based polymer-nanoparticles. Due to their small size and the resulting high cellular uptake, nanoparticles are suitable carriers for TDDS. The functionalization with aptamers on the surface of the nanoparticles enable specific binding to the target cells. Due to their low immunogenicity, aptamers are well suited for use in the human body. After successfully optimizing the production of the nanoparticles, the S15 aptamer, which is directed against the lung cancer cell line A549, was immobilized on the surface of the particles.

Nanoparticles had a size between 50 and 100 nm, which is ideal for nanocarriers to accumulate in the target cells and not be filtered out of the blood circulation by kidneys or the liver.

Drugs such as Paclitaxel and Camptothecin, two drugs which are known to kill cancer, could be encapsulated successfully. Drug-loaded nanoparticles remain stable in water. When investigating drug release from the nanoparticles in different pH values, it was found, that nanoparticles release the drug in acidic environment preferably, which is also formed by tumor cells. The developed TDDS was finally investigated *in vitro*. The density of aptamers immobilized on nanoparticles' surface is responsible for specific binding to the target cells. If density is too high, this can lead to unspecific binding to the control cell line HeLa due to steric hindrance.

Furthermore, cell internalization of the nanoparticles was investigated. Therefore, S15 conjugated quantum dots were used as model particles. Due to their fluorescent properties they are easier to detect. The S15 conjugated quantum dots were internalized by receptor-mediated endocytosis.

Finally, the developed Targeted Drug Delivery System was investigated concerning its toxicity to the target cells. Drug-loaded polymer-nanoparticles demonstrated a toxic effect on the lung cancer cells. Thus, the system could be successfully developed and used *in vitro*.

Keywords: Targeted Drug Delivery, Polymer-nanoparticles, aptamers, receptor-mediated endocytosis

1 Einleitung

Mit dem Wort „Krebs" wird in der Medizin das unkontrollierte Wachstum von Zellen bezeichnet, womit die bösartige Gewebeneubildung gemeint ist. Dies ist in Deutschland neben Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Dabei ist Lungenkrebs die am weitesten verbreitete Krebserkrankung sowohl bei Männern als auch bei Frauen [1]. Im Kampf gegen die Krankheit Krebs steht die Forschung jedoch weiterhin vor dem Problem, eine geeignete Darreichungsform zu finden, um Krebszellen zu zerstören, ohne gesunde Zellen zu beeinträchtigen [2]. Dabei ist die Nanotechnologie in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Fokus der medizinischen Forschung getreten. Das Versprechen der sogenannten Nanomedizin ist u.a. die höhere Präzision bei der Verabreichung neuartiger Medikamente. Diese werden speziell verpackt und kommen nur dort zum Einsatz, wo sie gebraucht werden. Gerade dieses Versprechen ist es, das auch im Bereich der Krebstherapie Verwendung finden kann. Hier kann diese Technologie eine Ergänzung zu den konventionellen Therapien sein. Krebstherapien, wie sie im Allgemeinen bekannt sind, bestehen oft aus einer Kombination von Chemotherapie, chirurgischem Eingriff und Bestrahlung. Vor allem durch die Chemotherapie ist die systemische Toxizität, also die Toxizität für den gesamten Organismus, sehr hoch [3]. Um die systemische Toxizität und damit schwerste Nebenwirkungen für den Patienten zu verringern, braucht es ein Präparat, welches gezielt Tumorzellen auffindet und ausschließlich dort wirkt. Tatsächlich gibt es bereits solche Präparate, die jedoch nur bedingt Anwendung finden. Diese sogenannten *Drug Delivery* Systeme setzen sich aus einem Trägermaterial zusammen, das mit einem Wirkstoff assoziiert ist. Um gezielt Krebszellen auffinden zu können, gibt es die Möglichkeit, die Träger mit geeigneten Molekülen zu versehen, die auf die Tumorzellen „programmiert" sind. Dafür können sogenannte „Aptamere" eingesetzt werden. Sie sind für den Körper nicht toxisch, da sie nicht immunogen sind, also keine Immunantwort auslösen. Mittels ihrer „Programmierung" sollen die Systeme den Tumor finden, dort binden und dann von den Tumorzellen aufgenommen werden. Anschließend sollen sie den Wirkstoff aus ihrem Inneren freisetzen, so dass der Tumor von innen heraus zerstört wird. Im Idealfall sollten so Nebenwirkungen vollständig vermieden werden. Ein entscheidender Vorteil der programmierten Systeme wäre auch, dass insgesamt weniger Wirkstoff benötigt werden würde, da er nur am Wirkort freigesetzt werden würde. Dies wirkt sich positiv auf die Behandlungseffizienz aus.

Diese programmierten Systeme werden als *Targeted Drug Delivery* Systeme bezeichnet. Wenn es möglich ist, ein solches System erfolgreich in der Praxis einzusetzen, kann dies ein Meilenstein für das Heilen von Krebserkrankungen sein.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines *in vitro* Systems für die Untersuchung der zielgerichteten Wirkstofffreisetzung. Ein solches System soll dazu dienen, spezifisch mit Hilfe eines sogenannten *Targeting* Liganden, Tumorzellen im Körper aufzuspüren, zu binden und nach seiner Aufnahme in die Zelle einen Wirkstoff gezielt dort freizusetzen. Hintergrund ist die Vermeidung von Nebenwirkungen, die aus der konventionellen Krebstherapie bekannt sind. Weiterhin sollen Systeme zur gezielten Freisetzung die Handhabung der Medikamentengabe erleichtern, was für den Erkrankten von großem Vorteil ist, da beispielsweise bei oraler Gabe häufige Krankenhausbesuche ausbleiben könnten.

Der erste Schritt zur Entwicklung dieses sogenannten *Targeted Drug Delivery Systems* (TDDS) ist die Herstellung von Nanopartikeln aus Biopolymeren, die als Trägersystem dienen sollen. Zunächst sollen diese Polymere aus ihren Untereinheiten synthetisiert werden. Danach soll die Herstellung der Nanopartikel in der vorliegenden Arbeit entwickelt und optimiert werden. Es sollen entsprechende Wirkstoffe für die Krebstherapie in die Nanopartikel eingekapselt werden und deren optimale Einkapselungsmenge bestimmt werden. Es soll außerdem die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Nanopartikeln charakterisiert werden. Abschließend soll die Oberfläche der Nanopartikel mit Aptameren, die als *Targeting* Liganden dienen, funktionalisiert werden. Nach Bestimmung der optimalen Menge an immobilisiertem Aptamer, soll das System *in vitro* an verschiedenen Tumorzelllinien und an gesunden Zellen hinsichtlich seiner Zytotoxizität und seines Einflusses auf die Zellviabilität getestet werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob und über welchen Weg das TDDS in die Zellen aufgenommen werden (beispielsweise über Endozytose). Letzteres soll in Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie und Lebensmitteltechnik des Technions in Haifa, Israel bestimmt werden.

Nach erfolgreicher Entwicklung und Testung an Tumorzelllinien bietet dieses System eine Alternative zu herkömmlichen, systemischen Krebstherapien und verspricht, ein Ansatz für eine erfolgreiche Behandlung von Krebs darstellen zu können.

3 Theoretischer Hintergrund

In dieser Arbeit soll ein Modellsystem für die zielgerichtete Wirkstofffreisetzung (*Targeted Drug Delivery*) entwickelt und an Tumorzelllinien sowie gesunden Zellen untersucht werden. Solche sogenannten *Targeted Drug Delivery Systeme* (TDDS) sollen dazu dienen, spezifisch an ausgewählte Zellen und Gewebe zu binden und nur dort den Wirkstoff freizusetzen. Dies soll die Nebenwirkungen auf nicht erkrankte Zellen und Gewebe minimieren und einen maximalen therapeutischen Effekt hervorrufen.

Im Folgenden werden zunächst *Drug Delivery Systeme* vorgestellt (Kapitel 3.1), wobei insbesondere auf passives *Targeting* näher eingegangen wird. Anschließend werden TDDS sowie ihre Komponenten erläutert, wobei hier vor allem die verwendeten Polymer-Nanopartikel und Aptamere als spezifische Liganden vorgestellt werden. Schließlich wird ein kurzer Überblick über Systeme in der klinischen Anwendung gegeben (Kapitel 3.2).

3.1 *Drug Delivery* Systeme

Das Hauptziel von Wirkstoffen in der Krebstherapie ist, neben der angestrebten Heilung, die Lebenszeit und die Lebensqualität des Patienten zu erhöhen und zu verbessern, während gleichzeitig die Toxizität des Therapeutikums reduziert wird [4]. Der große Nachteil vieler Medikamente ist jedoch ihre Darreichungsform. Diese erfolgt im Normalfall oral oder intravenös und geht mit der sofortigen Freisetzung und unspezifischen Verteilung des Wirkstoffes im Körper einher. Es erreicht nur ein Teil des applizierten Wirkstoffs seinen eigentlichen Wirkort. Dies sorgt oft für unerwünschte toxische Nebenwirkungen in Zellen oder Geweben, in denen der Wirkstoff gar nicht wirken soll. Ein bekanntes Beispiel dafür sind Chemotherapeutika, die sowohl Krebszellen als auch gesunde Zellen angreifen [5]. Bekannte Nebenwirkungen sind u.a. Übelkeit und Erbrechen, Schädigungen des Knochenmarks und Haarausfall. Damit sind diese Medikamente dosislimitiert und eine effiziente Behandlung kann somit nicht erfolgen. Um diese Nebenwirkungen in einem vertretbaren Rahmen zu halten, muss die maximale Menge des zu verabreichenden Medikaments angepasst werden. Wenn also die optimale Wirkung des Therapeutikums erreicht werden soll, muss die Darreichungsform des Medikaments angepasst werden, da Wirkung und Medikamentengabe unmittelbar miteinander korrelieren [6]. Es ist somit notwendig, ein System zu entwickeln, welches die therapeutisch aktiven Komponenten nur in solche Gewebe und Zellen transportiert, in denen sie gebraucht werden und dabei keinen Einfluss auf andere Organe und Gewebe haben [7, 8]. Sogenannte *Drug Delivery Systeme* (DDS) sollen dafür sorgen, einen Wirkstoff über einen kontrollierten Zeitraum freizusetzen und damit dessen Effektivität

erhöhen [9]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, den Wirkstoff konstant auf einem sogenannten therapeutischen Level zu halten, so dass er nicht toxisch wird (Abbildung 1) [10].

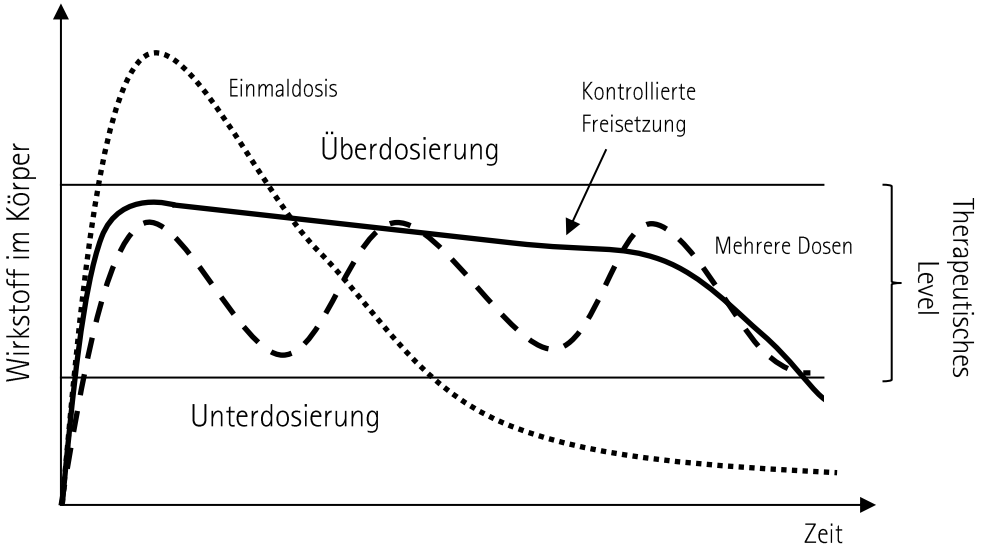

Abbildung 1: Wirkstoffkonzentration im Körper bei verschiedenen Darreichungsformen nach [10].

Abbildung 1 erklärt den Zusammenhang zwischen der Toxizität eines Wirkstoffes und dem „therapeutischem Level". Es ist derjenige Konzentrationsbereich eines Wirkstoffes im Körper, in dem dieser seine Wirkung entfalten kann. Handelt es sich um eine Einmalgabe des Medikaments, kommt es zunächst zu einem starken Anstieg des Wirkstoffes, der verstärkt zu Nebenwirkungen führen kann. Dies ist damit zu erklären, dass die Wirkstoffmenge oberhalb der maximal tolerierten Konzentration liegt. Die Wirkstoffkonzentration fällt jedoch zügig wieder unter die minimale Wirkungsgrenze. Werden mehrere Dosen verabreicht, steigt und fällt die Wirkstoffkonzentration stetig. Bei der kontrollierten Wirkstoffgabe, die durch ein DDS erreicht werden soll, kann die Konzentration des Wirkstoffes über einen langen Zeitraum auf einem kontinuierlichen Level gehalten werden. Die Vorteile von *Drug Delivery Systemen* liegen also bei: 1) der kontinuierlichen Aufrechterhaltung eines bestimmten Wirkstofflevels in einem therapeutischen akzeptablen Bereich; 2) der Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen; 3) der potentiell geringer eingesetzten Wirkstoffmenge; 4) weniger aggressiven Dosierungen und 5) der Vereinfachung der Medikamentengabe durch Reduktion der Einnahmezeitpunkte [11]. Außerdem kann durch das DDS der Wirkstoff vor zu frühem Abbau im Körper bewahrt werden. Infolgedessen können auch niedrigere Wirkstoffmengen zum Einsatz kommen, was wiederum das Wohlbefinden und damit die Compliance des Patienten beträchtlich erhöht [12]. Dabei liegt der Hauptvorteil von DDS jedoch bei ihrer Fähigkeit, die Pharmakokinetik und die Bioverteilung der Wirkstoffe so zu verändern, dass ihre Wirkungen auf Nicht-Zielgewebe reduziert wird [13]. Dies ist besonders wichtig, da allein in den USA 15 % aller

Patienteneinlieferungen in Krankenhäuser, einige Hunderttausend Todesfälle sowie etwa $ 136 Mrd. an Gesundheitsversorgungskosten den Nebenwirkungen von Medikamenten zuzuschreiben sind [11].

Die ersten *Drug Delivery* Systeme wurden in den 1960er Jahren beschrieben und waren Lipidvesikel, die später als Liposomen bekannt wurden [14]. In den darauffolgenden Jahren wurde eine Vielzahl an biokompatiblen Materialien für DDS entwickelt. Schließlich wurde 1976 das erste System beschrieben, aus dem kontrolliert Wirkstoff freigesetzt werden konnte. Dabei handelte es sich um ein Polymersystem aus drei verschiedenen Polymeren[1] [15].

Ein ideales *Drug Delivery System* sollte die Stabilität, die Absorption und die therapeutische Wirkung eines Wirkstoffes im Zielgewebe erhöhen und die Freisetzung des Wirkstoffes über einen längeren Zeitraum ermöglichen. Außerdem sollte neben der Reduktion der Frequenz der Medikamentengabe und damit der Erhöhung des Patientenkomforts, der Schutz und die Verbesserung der Pharmakokinetik des Wirkstoffes gewährleistet sein. Um erfolgreich im *Drug Delivery* genutzt werden zu können, sollte das System chemisch inert, bioabbaubar und frei von Verunreinigungen sein [2]. Solche Systeme bestehen deshalb oftmals aus biologischen oder synthetischen Polymeren, die als Wirkstoffträger dienen [10, 16]. Deren Eigenschaften, wie zum Beispiel das Molekulargewicht der Polymere, können so beeinflusst werden, dass sie die Effizienz des DDS erhöhen [10]. Außerdem muss der Träger derart beschaffen sein, dass der enthaltene Wirkstoff kontrolliert ans entsprechende Gewebe abgegeben wird, wenn das System am Wirkort angelangt ist [10]. *Drug Delivery* Systeme können entweder passiv oder aktiv an den entsprechenden Wirkort gelangen. Worin der Unterschied sowie Vor- und Nachteile liegen, wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

3.1.1 Passives Targeting

Das passive Targeting basiert auf der Anreicherung von Nanopartikeln in Tumorgeweben durch den sogenannten „erhöhten Permeabilitäts- und Retentionseffekt (EPR-Effekt)", der von Matsumura und Maeda 1986 entdeckt wurde [17][4]. Ein wachsender Tumor benötigt für seine Versorgung ein Netzwerk aus neuen Blutgefäßen. Diese Neubildung von Gefäßen wird Angiogenese genannt. Dieses Netzwerk aus neu gebildeten Blutgefäße weist üblicherweise große Lücken im Bereich zwischen 100 nm und 600 nm auf [12, 18]. Mit den erwähnten Lücken ist Folgendes gemeint: Durch das aggressive Wachstum von entarteten Zellpopulationen und der damit einhergehenden

[1] Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), Ethylen-Vinylacetat-Coplymer (PEVA) und Polyvinylalkohol (PVAL)

Überexpression von proangiogenetischen Faktoren kommt es zu einem unorganisierten Netzwerk aus neugebildeten Blutgefäßen in Tumoren [19].

Der EPR-Effekt basiert vor allem auf folgenden Faktoren: das Kapillarsystem in malignem Gewebe ist, wie erwähnt, sehr porös (lückenhaft) und somit für Makromoleküle durchlässiger als das Kapillarsystem von normalem Gewebe. Außerdem besitzen Tumorzellen ein beeinträchtigtes lymphatisches System, was dafür sorgt, dass zellfremdes Material weniger gut aus den Zellen heraustransportiert werden kann [19, 20]. Somit erlaubt dies die Anreicherung von beispielsweise Polymer-Nanopartikeln im Tumorgewebe [12][20, 21]. Weiterhin ist der EPR-Effekt von der Größe der Nanopartikel abhängig. Je kleiner die Partikel sind, desto besser können sie durch das poröse Tumorgewebe in das Zellinnere eindringen. Zu kleine Partikel jedoch, die einen Durchmesser von unter 10 nm besitzen, werden durch die Nieren aus dem Kreislauf gefiltert [22]. Laut [22–24] ist eine Größe zwischen 50 nm und 150 nm ideal. Partikel, die 200 nm und größer sind, werden schneller aus der Zirkulation durch das lymphatische System entfernt [25]. Es ist notwendig, dass die Nanopartikel lange in der Zirkulation bleiben, in genügend hohen Konzentrationen vorliegen und nicht vom Retikuloendothelialen System (RES) (System, dem phagozytierende Zellen zur Immunabwehr angehören) abgebaut werden [26, 27].

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Fähigkeit der Nieren, positiv geladene Partikel aufzunehmen, wodurch die Nanoträger entweder neutral oder anionisch sein müssen [28, 29].

Der dritte wichtige Faktor ist, dass die Nanoträger vor der Opsonisierung durch das RES geschützt werden müssen. Das heißt, dass zellfremdes Material vom RES mit Antikörpern markiert wird, um später von phagozytierenden Zellen aufgenommen und degradiert zu werden. Dies kann durch eine Beschichtung der Nanoträger mit PEG verhindert werden [22, 30].

Passive *Targeting* Systeme sind bereits auf dem Markt und in der klinischen Anwendung (Abschnitt 3.2). Ein Beispiel für ein solches System ist bekannt als **Doxil®** (oder **Caelyx®**). Dabei handelt es sich um ein PEGyliertes Liposom, in das Doxorubicin eingekapselt ist (Abschnitt 3.2). Bei **Doxil®** bzw. **Caelyx®** wurde im Vergleich mit freiem Doxorubicin eine erhöhte Zirkulationsdauer sowie eine sechs Mal höhere Effektivität nachgewiesen [22, 31, 32].

Um jedoch dafür zu sorgen, dass das *Drug Delivery* System direkt zum Wirkort gebracht und der darin enthaltene Wirkstoff gezielt dort freigesetzt wird, wird auf das aktive *Targeting* von DDS (*Targeted Drug Delivery* Systeme) zurückgegriffen. Denn das passive *Targeting* bzw. die Anreicherung der Nanoträger über den EPR Effekt hängt maßgeblich von der Vaskularität und der Angiogenese des Tumorgewebes ab und variiert zwischen verschiedenen Tumorarten [4]. Dies kann durch das aktive

Targeting verhindert werden. Im folgenden Abschnitt werden *Targeted Drug Delivery* Systeme erläutert.

3.1.2 *Targeted Drug Delivery* Systeme

Eines der Hauptziele der Nanomedizin ist die zielgerichtete Freisetzung eines Wirkstoffes (*Targeted Drug Delivery*) aus einem dafür geeigneten Trägermaterial, sodass der Wirkstoff nicht systemisch, sondern selektiv auf Tumorzellen wirkt und nicht erkrankte Zellen unbeeinflusst lässt [7, 22]. Dabei ist das Konzept der zielgerichteten Wirkstofffreisetzung nicht neu, sondern kann bis in die Anfänge des 20. Jahrhunderts zurückgeführt werden. 1906 wurde erstmals durch Paul Ehrlich das sogenannte Allheilmittel gegen Krebs postuliert [33]. Dieses „*magic bullet*", wie er es nannte, ist eine Einheit aus zwei Komponenten: die erste soll das Ziel erkennen und binden, die zweite soll einen therapeutischen Effekt am Zielort haben [34, 35]. Bei der Umsetzung ergaben sich allerdings drei große Schwierigkeiten: 1) es musste das richtige Ziel (*Target*) für eine entsprechende Krankheit gefunden werden, 2) es musste ein geeigneter, spezifischer Wirkstoff zur Behandlung einer speziellen Krankheit vorhanden sein und 3) es war ein geeignetes System als Wirkstoffträger erforderlich [34]. Die Anforderung eines TDDS ist, neben dem Transport des Wirkstoffes zu einem spezifischen Wirkort, auch seine kontrollierte Freisetzung nach Erreichen von ebendiesem. Weiterhin sollten *Targeted Drug Delivery* Systeme nicht toxisch, nicht immunogen sowie physikalisch und chemisch stabil (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*) sein. Außerdem ist es wichtig, dass sie nach und nach vom Organismus eliminiert bzw. abgebaut werden können [36].

Bei *Targeted Drug Delivery* Systemen (TDDS) ist der Unterschied zum passiven *Targeting* die Verwendung von Oberflächenfunktionalisierungen der Nanopartikel (Abbildung 2).Dies wird mittels spezieller Moleküle erreicht, die mit einer hohen Selektivität überexprimierte Rezeptoren an den Zielzellen binden. Während beim passiven *Targeting* die Anreicherung der Nanopartikel im Gewebe über den EPR Effekt stattfindet, findet dies beim TDDS über die Bindung der spezifischen Liganden statt. Die Funktionalisierung sorgt somit dafür, dass die therapeutische Effektivität erhöht wird und die Nebenwirkungen im Vergleich zu konventionellen Therapeutika reduziert werden, da sich der Wirkstoff nicht unspezifisch im gesamten Körper verteilen kann [20][37]. Außerdem bewirken die Funktionalisierungen an Nanoträgern eine Verbesserung der Pharmakokinetik, der Pharmakodynamik, eine kontrollierte und anhaltende Freisetzung von Wirkstoffen, eine erhöhte Spezifität sowie eine erhöhte Aufnahme in die Zelle und intrazelluläre Freisetzung [4].

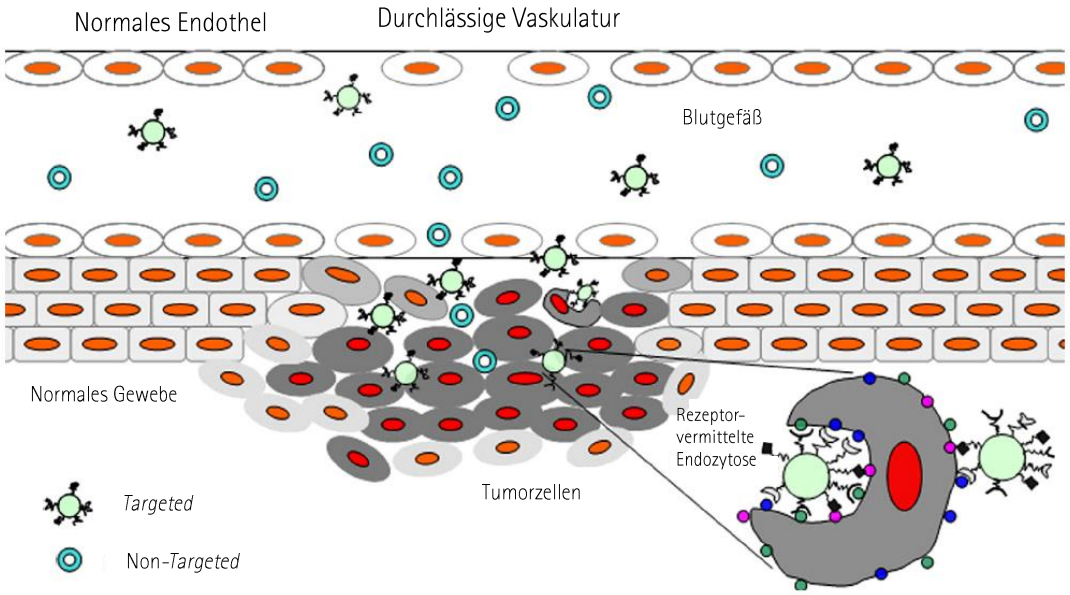

Abbildung 2: Passives Targeting: Nanopartikel werden über die Lücken im Endothelgewebe der Tumorzellen aufgenommen (EPR Effekt). Aktives Targeting: Spezifische Liganden sorgen für eine Bindung an entsprechende Rezeptoren und je nach adressiertem Rezeptor für die Aufnahme in die Zelle nach [38].

Zum Einsatz kommende Liganden sind vor allem Antikörper oder deren Derivate, Peptide, oder auch Aptamere (Abschnitt 3.1.2.4) [22]. Beispiele für spezifische Liganden, die bereits für das aktive *Targeting* von Nanoträgern *in vitro* genutzt werden, sind u.a. Folat, Transferrin und Galactosamin. In Phase I der klinischen Anwendung kommen bislang nur Antikörperbasierte Nanoträger für das aktive *Targeting* zum Einsatz [39].

Die ersten Berichte von zielgerichteten Nanopartikeln gehen zurück bis in die 80er Jahre und beinhalten die Oberflächenmodifizierungen von Liposomen mit monoklonalen Antikörpern, die Antigene auf den Zielzellen erkennen [40]. Heutzutage gibt es etwa 30 monoklonale Antikörper im aktiven *Targeting*, die für den klinischen Gebrauch zugelassen sind. Die bekanntesten Beispiele sind der Antikörper Rituxan, der an das CD20 Antigen bindet und somit zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms dient; und der Herceptin Antikörper, der am Antigen HER2/neu bindet und für die Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird [40].

In der Krebstherapie kann die Anwesenheit von spezifischen Liganden die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln über die Rezeptorvermittelte Endozytose (3.1.2.5) erhöhen. Das kann zu einer erhöhten intrazellulären Wirkstoffkonzentration und größerer therapeutischer Effizienz im Tumorgewebe führen [37]. Damit ist das aktive *Targeting* eine vielversprechende Möglichkeit zur Reduktion von Nebenwirkungen bzw. Beeinträchtigung von gesunden Zellen und Geweben. Im nächsten Abschnitt werden zunächst die verschiedenen Systeme von *Targeted Drug Delivery* Systemen und anschließend die einzelnen Komponenten vorgestellt.

3.1.2.1 Aufbau von Targeted Drug Delivery Systemen

Targeted Drug Delivery Systeme bestehen meistens aus einem Träger, einem Wirkstoff und einem Liganden. Der Träger ist in den häufigsten Fällen ein Nanoträger, der in erster Linie zwei Aufgaben erfüllen muss: den Wirkstoff vor der Degradation durch den Körper schützen und die Funktionalisierung mit einem spezifischen Liganden ermöglichen, um Tumorzellen gezielt zu binden, während gesundes Gewebe verschont bleibt [4]. Der Ligand dient dazu, die Zielzellen anzusteuern und zu binden. Dabei gibt es mehrere Varianten, wie der Wirkstoff und der Ligand miteinander verbunden sein können. Dies wird nachfolgend erläutert.

Im ersten Fall kann der Ligand direkt über einen Linker an den Wirkstoff gebunden sein, wodurch die Verwendung eines Trägers entfällt. Das Verhältnis von Wirkstoff und Ligand ist dabei begrenzt, so dass die eingesetzte Menge des im System eingesetzten Wirkstoffes gering ist (Abbildung 3). Dieses System ist das ursprüngliche Modell für einen gezielten Wirkstofftransport [36]. Wird der Wirkstoff an einen Träger, in diesem Fall an einen Nanopartikel, gebunden, kann deutlich mehr Wirkstoff an die Zielzellen gebracht werden (Abbildung 4). Im dritten System wird über die Verkapselung des Wirkstoffs in den Wirkstoffträger nicht die Oberfläche genutzt, sondern sein gesamtes Volumen, wodurch eine deutlich größere Menge zum Wirkort gebracht werden kann (Abbildung 5). Dieses System kommt auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

Abbildung 3: Bindung eines Liganden über einen Linker direkt an den Wirkstoff.

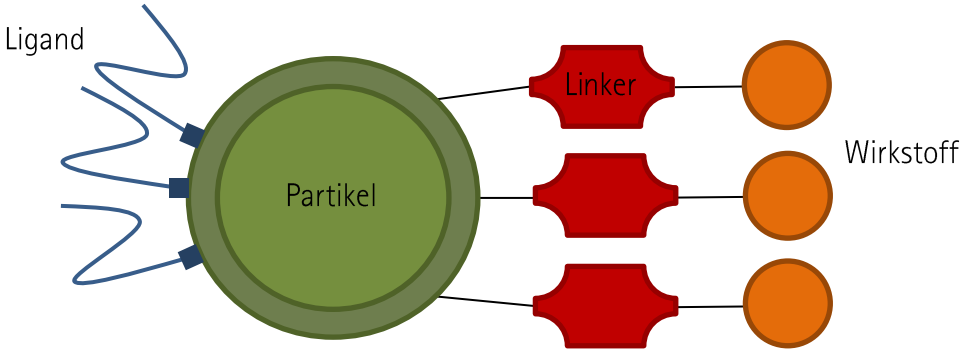

Abbildung 4: Bindung des Liganden an einen Wirkstoffträger, auf dessen Oberfläche der Wirkstoff über einen Linker immobilisiert ist.

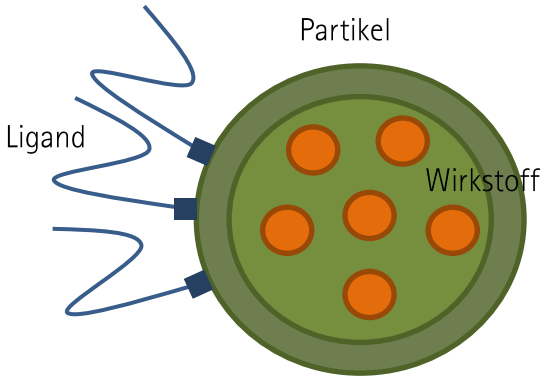

Abbildung 5: Wirkstoff wird im Träger eingekapselt; Ligand ist direkt an Wirkstoffträger gebunden.

Die Anforderungen an den Wirkstoffträger sind dabei eine hohe Bioverfügbarkeit sowie Biodegradabilität und Biokompatibilität [41]. Weiterhin sollten Nanopartikel als Wirkstoffträger den Wirkstoff vor äußeren Einflüssen wie Luft und Licht schützen, und einen Schutz vor physiologischen Prozessen wie z.B. enzymatischem Abbau bieten. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Größe des Nanoträgers, die ausreichend klein sein muss, um eine hohe Verteilung im Gewebe zu gewährleisten [35].

Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten eines *Targeted Drug Delivery* Systems näher vorgestellt. Dabei werden zunächst die Nanopartikel mit besonderem Augenmerk auf Polymer-Nanopartikel als Träger erläutert.

3.1.2.2 Nanopartikel in Drug Delivery Systemen

Aufgrund ihrer geringen Größe werden Nanopartikel als Träger für die gezielte Wirkstofffreisetzung verwendet. Die geringe Größe sorgt dafür, dass Nanopartikel in der Lage sind, sich durch das Epithel von Zellen zu bewegen. Außerdem ist die geringe Größe von Vorteil, da die Partikel biologische Barrieren, wie die Blut-Hirn-Schranke, durchdringen können. Durch ihr großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis und ihre hohe Beladungskapazität kommt es zu einer erhöhten Wirkstofffreisetzung [42, 43]. Das Resultat ist eine Minimierung der systemischen Toxizität, während der therapeutische Index des Wirkstoffes am gewünschten Wirkort maximal ist. Neben therapeutischen Agenzien können auch bildgebende Agenzien eingekapselt werden, die zur Tumordetektion dienen [35].

Der ideale Nanoträger ist zwischen 50 nm und 150 nm groß. Wie in Abschnitt 3.1.1 sollte der Nanoträger nicht unter 10 nm groß sein, um nicht über die Nieren aus der Zirkulation herausgefiltert zu werden und nicht größer als 200 nm, da er sonst schneller über das lymphatische System aus der Zirkulation entfernt wird. Weiterhin sollte er eine neutrale oder anionische Ladung aufweisen, um nicht durch die Nieren gefiltert zu werden und für das retikuloendotheliale System unsichtbar sein,

um vor Phagozytose geschützt zu sein [4]. Dies kann durch verschiedene Oberflächenmodifikationen erreicht werden [44]. Die am meisten verwendeten Nanopartikel für das *Drug Delivery* sind Gold-Nanopartikel (AuNPs) [45], Quantum Dots (QDs) [46], Silika-Nanopartikel [47], Liposomen [48], Polymer-Nanopartikel [49], Super-paramagnetische Eisenoxid Nanopartikel [50], Carbonnanotubes [51] und Graphen-verwandte Materialien [52].

Es wurde gezeigt, dass *Targeted* Polymer-Nanopartikel die Behandlung von Krankheiten fördern, indem sie größere Anteile von Wirkstoffen zu den gewünschten Zellen bringen, die intrazelluläre Wirkstofffreisetzung durch die Rezeptorvermittelte Endozytose (3.1.2.5) erhöhen und die unkontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen reduzieren [53]. Nachfolgend werden Polymer-Nanopartikel genauer vorgestellt, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Polymer-Nanopartikel

Im Gegensatz zu den sehr häufig verwendeten Liposomen sind Polymer-Nanopartikel *in vivo* vergleichsweise stabil, haben eine hohe Beladungskapazität und können kontrolliert oder getriggert den Wirkstoff aus ihrem Inneren freisetzen [40]. Außerdem haben Polymer-Nanopartikel die Fähigkeit, Wirkstoffe in ihrem Zielgewebe über definierte Zeiträume und mit einer bestimmten Geschwindigkeit freizusetzen [40]. Polymere wurden in den 1960ern als potentielle *Drug Delivery* Vehikel bekannt [40]. Dass Polymer-Nanopartikel immer mehr an Attraktivität gewinnen, zeigt Abbildung 6.

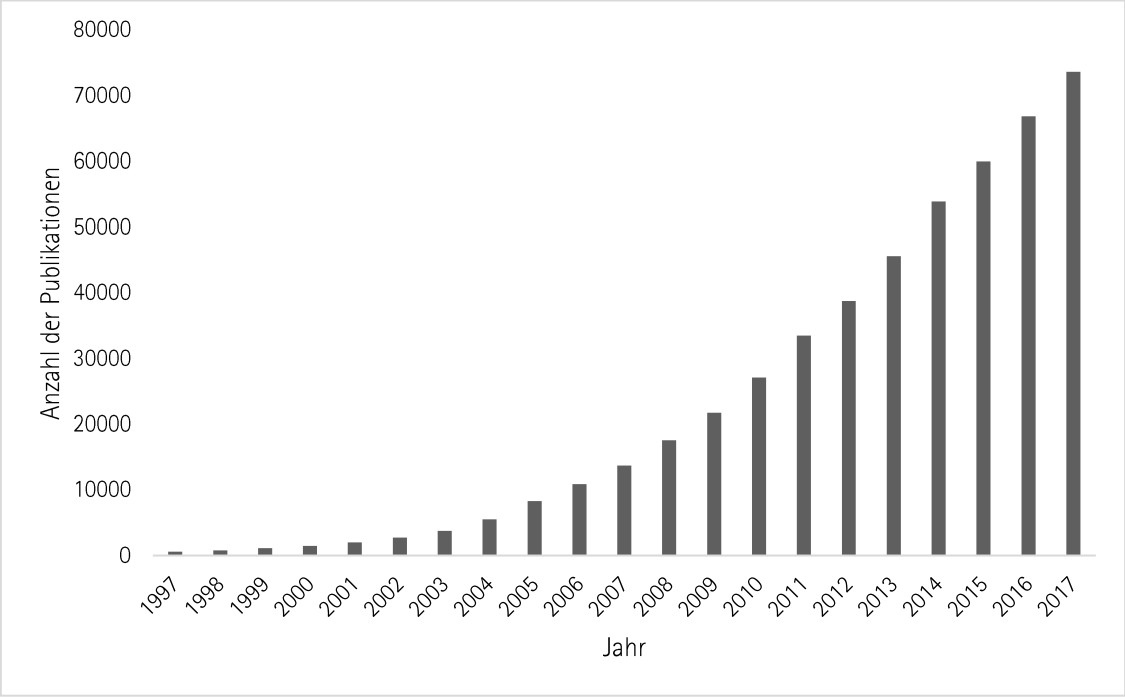

Abbildung 6: Zitierungen (Scopus) über Polymer-Nanopartikel im Zeitraum von 1997-2017

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Publikationen über Polymer-Nanopartikel in einem Zeitraum von 20 Jahren. Das Einsatzgebiet der Polymer-Nanopartikel ist vielfältig und reicht von Elektronik über Photonik, leitenden Materialien, Sensoren, Biotechnologie, Abgaskontrolle und Umwelttechnologie bis zur Medizin [54].

Doch warum sind Polymer-Nanopartikel so interessant für das *Drug Delivery*?

Polymer-Nanopartikel sind Partikel mit einer Größe kleiner als 1 µm und werden aus natürlichen oder synthetischen Polymeren hergestellt [44]. Partikel aus natürlichen Polymeren werden jedoch kaum verwendet, da ihre Reinheit stark variiert und sie oft ein Crosslinking benötigen, das den eingesetzten Wirkstoff zerstören könnte [44]. Daher werden häufig synthetische Polymere im *Drug Delivery* eingesetzt. Die wichtigsten Eigenschaften der Polymere müssen aber ihre Biokompatibilität und Biodegradabilität sein. Biodegradable Polymere sind besonders attraktiv für die Anwendung in *Drug Delivery* Systemen, da sie aus dem menschlichen Körper nicht mehr entfernt oder spezifisch manipuliert werden müssen, nachdem sie dort einmal eingebracht wurden. Ihre Abbauprodukte sind normale Metaboliten des Körpers oder Produkte, die metabolisiert und einfach vom Körper ausgeschieden werden können [10].

Die am meisten verwendeten Polymere für Nanopartikel sind Polymilchsäuren (poly(lactic acid); PLA), Polyglykolsäuren (poly(glyvolic acid); PGA) sowie deren Copolymere und Polylactid-co-Glycolid (PLGA) [44].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Polymer Polycaprolacton (PCL) ist ein semi-kristallines, hydrophobes Polymer mit einer polaren Estergruppe und fünf unpolaren Methylgruppen je Monomer [55]. Der Vorteil von PCL gegenüber PLA und PGLA ist vor allem die längere aliphatische Kette, wodurch das PCL deutlich hydrophober ist. Dies sorgt dafür, dass die späteren Nanopartikel eine größere Stabilität besitzen, als Nanopartikel aus PLA und PGLA [56]. PCL wird unter physiologischen Bedingungen durch die Hydrolyse seiner Esterbindungen abgebaut und hat daher an Bedeutung für das *Drug Delivery* gewonnen [57]. Da PCL jedoch schnell abgebaut wird, muss es mit einer Modifikation versehen werden. Dazu eignet sich unter anderem mPEG (Methoxy-Polyethylenglykol), das für seine Hydrophilizität und seine geringe Toxizität bekannt ist und außerdem keine Immunogenität besitzt [55, 58]. Weiterhin besitzen PEGylierte Nanopartikel eine hohe Zirkulationszeit [59]. PEG ist nicht toxisch, biokompatibel und daher von der *US Food and Drug Administration* (FDA) für die Verwendung im Körper freigegeben [60–62].

Polymer-Nanopartikel können über verschiedene Verfahren hergestellt werden. Die bekanntesten sind [63]:

- Lösemittelverdampfungsmethode (*solvent evaporation*)
- Nanopräzipitation
- Emulsifikation/ Lösemitteldiffusion
- Aussalzen (*Salting out*)
- Dialyse
- *Supercritical fluid technology (SCF)* [54, 63].

Da in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung der Partikel die Lösemittelverdampfungsmethode verwendet wurde, wird nur diese im Folgenden beschrieben. Bei dieser Methode werden die Polymere in ein flüchtiges, organisches Lösemittel gegeben, die wiederum zu einer wässrigen Lösung hinzugegeben wird. Es bildet sich eine Emulsion. Diese Emulsion wird in eine Nanopartikel-Suspension verwandelt, indem das eingesetzte Lösemittel verdampft wird [63]. Die Lösemittelverdampfungsmethode ist die gebräuchlichste Technik, um Polymer-Nanopartikel herzustellen. Während der Herstellung der Partikel werden auch die im TDDS verwendeten Wirkstoffe eingekapselt. Dies geschieht, indem der Wirkstoff zeitgleich mit den Polymeren im Lösemittel gelöst wird. In dieser Arbeit wurden unter anderem Camptothecin (CPT) und Paclitaxel (PTX) eingekapselt. Im nachfolgenden Abschnitt wird näher auf Wirkstoffe in TDDS, insbesondere PTX und CPT und deren Freisetzung eingegangen.

3.1.2.3 Wirkstoffe in Targeted Drug Delivery Systemen

Wirkstoffe, die in einem TDDS zum Einsatz kommen sollen, müssen bestimmte Eigenschaften aufweisen. Dazu gehört zunächst, dass sie nach Wirksamkeit gegen die Zielzellen ausgewählt werden. Weiterhin muss der Wirkstoff nach Kompatibilität zum Träger des verwendeten TDDS ausgewählt werden. Der Wirkstoff kann entweder in den Träger eingekapselt oder an dessen Oberfläche gebunden sein. Eine weitere Möglichkeit ist, wie beispielsweise bei Liposomen, den Wirkstoff in den Zwischenräumen einer Lipiddoppelschicht oder Polymermatrix einzuschließen. Da für die vorliegende Arbeit ein Nanoträger mit hydrophobem Kern die Grundlage des TDDS bildet, wurden entsprechend hydrophobe Wirkstoffe für die Einkapselung ausgewählt.

Ein Vorteil von eingekapselten Wirkstoffen ist ihr größerer therapeutischer Effekt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie benutzten Farokhzad *et al.* mit Cisplatin beladene PGLA Nanopartikel, die mit einem Aptamer gegen PSMA (Prostataspezifisches Membranantigen) gekoppelt wurden, um die

Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln zu untersuchen. Die mit Cisplatin beladenen Partikel hatten einen größeren Effekt (IC_{50} = 0,13 µM) auf die Tumorzellen, als freies Cisplatin (IC_{50} = 2.4 µM) [64].
Weitere Vorteile von an Nanoträger gebundenen oder eingekapselten Wirkstoffen sind nachfolgend beschrieben. Da sich die Vorteile z.T. mit denen des DDS (Abschnitt 3.1) überschneiden, seien hier nur die beiden wichtigsten genannt. Freie Wirkstoffe, insbesondere hydrophobe Wirkstoffe, besitzen eine schlechte Löslichkeit. Dies kann durch den Einsatz von Lipidvesikeln oder Liposomen umgangen werden. Weiterhin kann es durch den freien Wirkstoff zu Gewebeschäden kommen. Durch die kontrollierte Freisetzung aus einem Nanoträger kann dieses Risiko verringert werden.
Es gibt verschiedene Faktoren, die einen Einfluss auf die Freisetzung des eingekapselten Wirkstoffes ausüben. Vor allem die Größe des verwendeten Nanoträgers beeinflusst die Freisetzung massiv. So haben kleinere Partikel ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, weshalb sie den Wirkstoff schneller freisetzen, da dieser eher mit der Partikeloberfläche assoziiert ist. Bei größeren Partikeln ist viel Wirkstoff im Kern eingekapselt, was in einer langsameren und länger andauernden Freisetzung resultiert [42, 44]. Größere Partikel haben außerdem einen kleineren sogenannten *burst release* [44, 57]. Dies bezeichnet die schnelle oder schlagartige initiale Freisetzung eines Wirkstoffes. Die Freisetzung von Wirkstoffen aus Partikeln beginnt mit dem *burst release*, bei dem oberflächennaher Wirkstoff schlagartig freigesetzt wird. Dieser *Release* ist von der Menge des eingekapselten Wirkstoffes und Größe der Partikel abhängig. Der Wirkstoff diffundiert dann schneller aus der Partikelmatrix als der Abbau dieser durch die Zellen erfolgt. In der nächsten Phase folgt dann die Degradation der Polymerpartikel und die kontinuierliche Freisetzung beginnt [42].
In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Zytostatika Paclitaxel und Camptothecin verwendet (Abbildung 7). Sie werden unter anderem zur Bekämpfung von Bronchialkarzinomen eingesetzt. Bei beiden Wirkstoffen handelt es sich um hydrophobe Wirkstoffe. Paclitaxel (PTX) stammt aus der Rinde der pazifischen Eibe, aus der es Anfang der 70er Jahre erstmalig isoliert wurde. Es gehört zu den Taxanen und inhibiert die Mitose von Zellen, indem es das β-Tubulin bindet und somit den Abbau der Mikrotubuli zerstört [65, 66].
Camptothecin (CPT) gehört zur Gruppe der Alkaloide und wurde in den 60er Jahren aus den Wurzeln, der Rinde und den Samen des Chinesischen Glücksbaumes *Camptotheca acuminata* gewonnen. Es handelt sich weiterhin um einen DNA Topoisomerase I Inhibitor [67, 68]. Aufgrund seiner Fluoreszenz ist CPT besonders gut als Modellwirkstoff für die Entwicklung von DDS geeignet. Beide Wirkstoffe können gegen nicht-kleinzellige Lungenkarzinome eingesetzt werden.

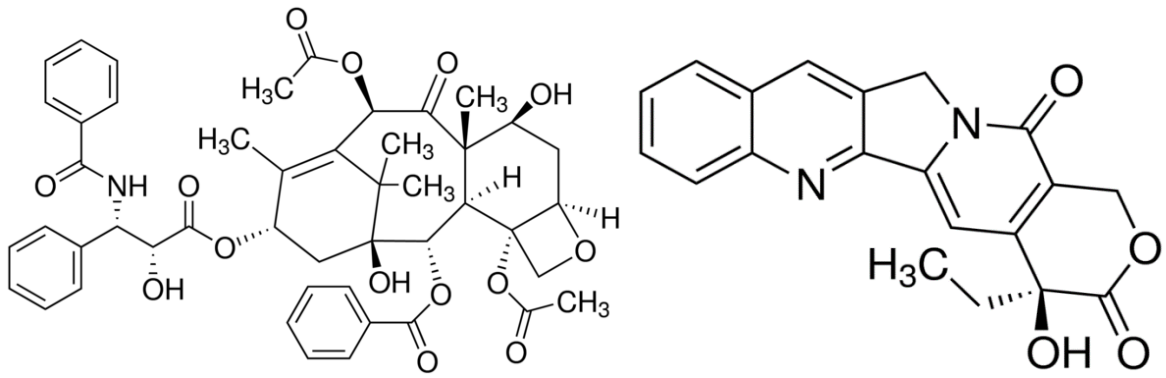

Abbildung 7: links: Paclitaxel (PTX) [69]; Camptothtecin (CPT) [70].

3.1.2.4 Aptamere in Targeted Drug Delivery Systemen

Aptamere

Aptamere wurden erstmals 1990 durch Ellington und Gold erwähnt [48, 71]. Seit ihrer Entdeckung rückten Aptamere immer mehr in den Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit [72]. Es handelt sich dabei um synthetische, kurze einzelsträngige Oligonukleotide aus RNA oder DNA mit einer Länge von 20-80 Nukleotiden. Ihr Name leitet sich vom lateinischen „aptus" – „passend, geeignet" ab [23, 72, 73]. Basierend auf ihrer einzigartigen dreidimensionalen Struktur, bilden Aptamere eine spezifische Bindung zu ihrem Zielmolekül unter anderem über van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Interaktionen aus (Abbildung 8) [72]. Basierend auf ihrer spezifischen Bindungstasche für das Zielmolekül besitzen Aptamere ein hohes Potential in biomedizinischen Anwendungen wie dem *Drug Delivery* und der Entwicklung neuer therapeutischer Systeme. Als Beispiel dient Macugen, ein RNA-Aptamer für VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) für die Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration [74]. Weiterhin eignen sich Aptamere aufgrund ihrer hohen Spezifität und Bindungsaffinität als exzellente Liganden für das *Targeted Drug Delivery*, besonders in der Krebstherapie. Aptamer-konjugierte Wirkstoffe und Nanomaterialien dienen dazu, Wirkstoffe in Krebszellen und Geweben freizusetzen [48]. Beispiele für Aptamer gebundene Wirkstoffe sind unter 3.2 aufgelistet.

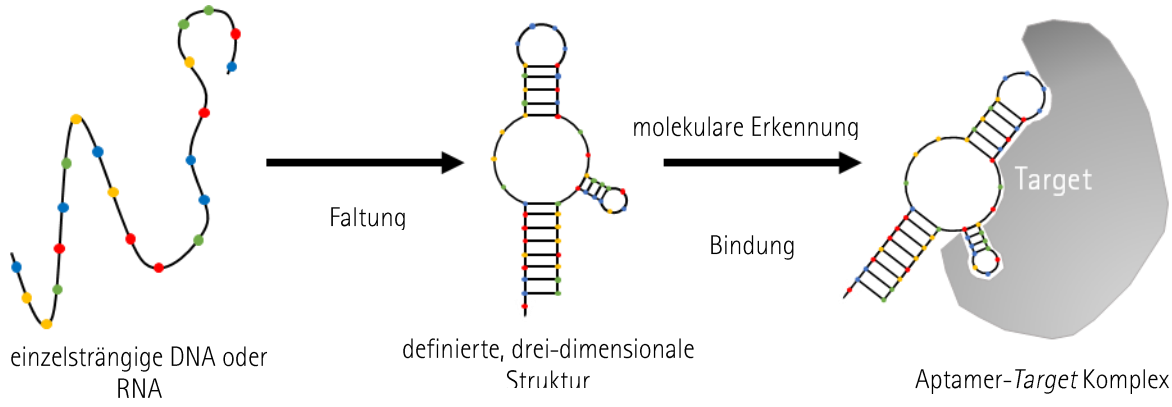

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aptamer-Target-Bindung, modifiziert nach [72].

Ein weiterer Vorteil ihrer Spezifität und hohen Bindungsaffinität liegt darin, Antikörper in vielen Anwendungen ersetzen zu können [23].

Ein Vorteil von Aptameren gegenüber Antikörpern ist, dass Aptamere *in vitro* selektiert und mit hoher Reproduzierbarkeit sowie Reinheit einfach in großen Mengen chemisch synthetisiert werden können, wenn ihre Sequenz bekannt ist [75] [48]. Dies macht den Gebrauch von Zelllinien oder Tieren überflüssig. Weiterhin können Aptamere gegen toxische und nicht-immunogene Ziele selektiert werden, da der Prozess unabhängig von tierischen Immunsystemen ist [48]. Sie können außerdem während der Synthese mit funktionellen Gruppen modifiziert werden, wie beispielsweise Fluorophoren [48]. Ein weiterer wichtiger Vorteil gegenüber Antikörpern ist, dass Aptamere eine niedrige Immunogenität besitzen und sehr stabil in einem großen Temperatur- und pH Wertbereich (pH 4-9) sind. Sie können auch nach einer thermischen Denaturierung wieder ihre ursprüngliche aktive Form annehmen [23, 48, 76]. Außerdem verlieren sie auch in organischen Lösemitteln nicht ihre Bindungseigenschaften [23]. Ein sehr wichtiger Vorteil, gerade für das *Targeted Drug Delivery*, ist ihr im Vergleich zu Antikörpern (~150 kDa) geringes Molekulargewicht von 8-25 kDa. Dies ermöglicht ihnen, schneller und effizienter in Gewebe einzudringen [77]. Außerdem können Aptamere spezifisch eine Vielzahl an Targets erkennen. Dazu gehören große Moleküle wie zum Beispiel Proteine. Sie binden aber auch kleine Moleküle wie Ionen, Wirkstoffe, Toxine, Peptide oder organische Farbstoffe. Weiterhin sind sie in der Lage, auch Viren, Bakterien, Zellen oder sogar Gewebe zu binden [77, 78]. Aptamere binden ihre Zielmoleküle mit einer niedrigen Dissoziationskonstante (K_D), die vom picomolaren ($1x10^{-12}$ M) bis in den nanomolaren ($1x10^{-9}$ M) Bereich reicht [73, 77].

Aptamere werden, wie schon erwähnt, in einem *in vitro* Prozess selektiert. Dieser iterative Prozess, der sogenannten SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*), startet mit einer chemisch synthetisierten Random-Oligonukleotid-Bibliothek, die 10^{13}-10^{16} verschiedene Sequenzen enthält. Der Selektionsprozess besteht im Wesentlichen aus fünf Schritten: 1) die Bibliothek wird mit der Zielsequenz inkubiert; 2) die gebundenen Zielsequenzen werden von den ungebundenen isoliert;

3) es erfolgt die Elution der gebundenen Sequenzen; 4) diese werden amplifiziert und somit ein neuer Pool an Sequenzen geschaffen; 5) abschließend werden die gewünschten Sequenzen aufgereinigt (Abbildung 9) [48, 75]. Während der SELEX können Aptamere ihrer Funktion entsprechend angepasst bzw. modifiziert werden. Es können beispielsweise Affinitätstags oder Fluoreszenzmarkierungen vorgenommen werden [79].

Abbildung 9: Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses zur Generierung von Aptameren, modifiziert nach [72].

Da sich die vorliegende Arbeit mit Aptamer-konjugierten Nanopartikeln beschäftigt, soll im weiteren Verlauf diese Form des TDDS noch näher erläutert werden.

Aptamer-modifizierte Nanopartikel

Ähnlich wie Proteine oder andere biologische Makromoleküle können Nanopartikel in solch kleinen Dimensionen (1-150 nm) biologische Membranen passieren und als Träger für Therapeutika dienen

[75]. Die Konjugation von Aptameren an solche Nanopartikel mit eingekapseltem oder gekoppeltem Wirkstoff resultiert dann in *Targeted Delivery* Trägern für therapeutische Anwendungen [23]. Der entscheidende Vorteil dieser Aptamer-konjugierten Nanostrukturen ist ihre Fähigkeit, die Pharmakokinetik und die Biodistribution der Wirkstoffe so zu verändern, dass Nebeneffekte in Nicht-Zielgeweben minimiert werden [13]. Weiterhin kombiniert die Funktionalisierung mit Aptameren die hohe Ladungskapazität von Nanoträgern mit der hohen Zielspezifität und Affinität, was den therapeutischen Effekt um ein Vielfaches erhöht [75].

Aufgrund ihrer Affinität zu ihren Zielmolekülen können Aptamere den Transport von Aptamer-Nanopartikelkonjugaten zu diesen Zielmolekülen steuern. Farokhzad und seine Mitarbeiter erforschten die Aufnahme von Docetaxol beladenen, PEG beschichteten PGLA Nanopartikeln, die mit dem gegen PSMA gerichteten A10 Aptamer gekoppelt wurden [80]. Sie fanden heraus, dass funktionalisierte Nanopartikel nur an die Tumorzellen gebunden haben, die den Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimierten. Nicht funktionalisierte Nanopartikel haben 77 Mal weniger an den Zielzellen gebunden und Tumorzellen ohne den entsprechenden Rezeptor wurden nicht gebunden [80, 81].

Der Vorteil von Aptamer-Nanopartikel-Konjugaten ist in einer Studie von Dhar und Kollegen dargelegt. Hier wurde das RNA Aptamer A10, welches spezifisch für PSMA ist, an die Oberfläche von Cisplatin beladenen PGLA-PEG Nanopartikeln funktionalisiert. Sie sollten in der Prostatakrebstherapie eingesetzt werden. Anschließend untersuchten die Autoren die Nanopartikel-assoziierte Pharmakokinetik, die Biodistribution und die Effizienz des Systems. Das Ergebnis zeigte, dass die funktionalisierten Partikel eine höhere maximal tolerierte Dosis, eine verlängerte Blutzirkulationsdauer und eine erhöhte Antitumoreffizienz *in vivo* hatten [64][77].

Aravind und Mitarbeiter entwickelten 2012 PGLA Nanopartikel, die mit PTX beladen und dem AS1411 Aptamer funktionalisiert waren. Dieses System zeigte sich im *in vitro* Experiment bzgl. des Zelltargetings und der Zytotoxizität gegenüber Brustkrebszellen als sehr erfolgreich [82].

Die Funktionalisierung der Aptamere erfolgt entweder kovalent oder nicht-kovalent an die Nanopartikel. Verglichen mit der nicht-kovalenten Kopplung hat die kovalente Bindung jedoch den Vorteil, dass *in vivo* eine höhere Stabilität bei verschiedenen pH Werten und Salzkonzentrationen gegeben ist [75]. Die Funktionalisierung kann über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, kurz EDC, erfolgen. Dabei werden die Carboxylgruppen der Partikel aktiviert und die entstandenen Ester reagieren mit den aminomodifizierten Aptameren zu einer stabilen Amidbindung (Abbildung ***10***).

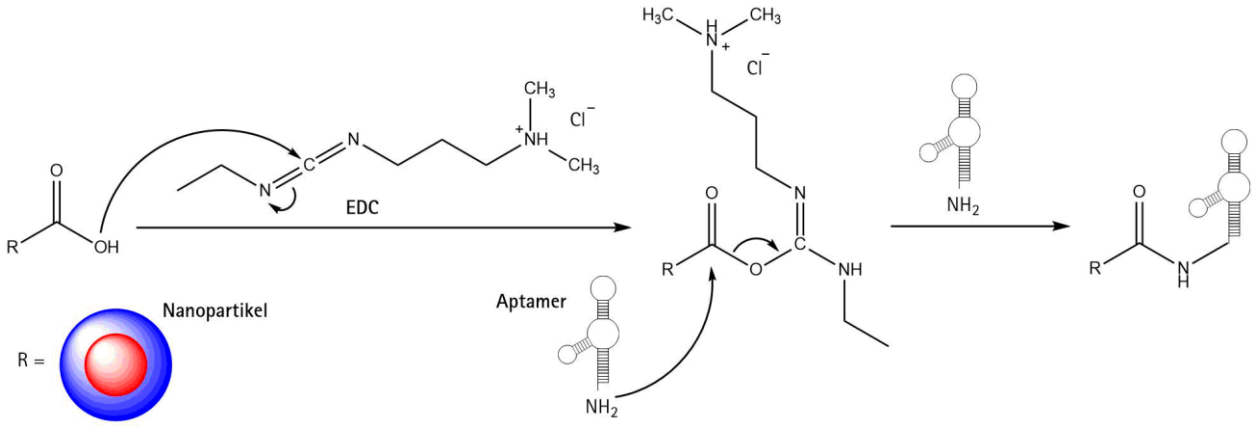

Abbildung 10: Mechanismus der Funktionalisierung der Nanopartikel mit dem Aptamer. Diese Abbildung stammt aus der Masterarbeit von Torsten Schüling[2]

Auf den Mechanismus wird noch einmal im experimentellen Teil eingegangen (Kapitel 4.1.4). Die Funktionalisierung der Nanopartikel mit den Aptameren sorgt dafür, dass die Zielzellen, nach Bindung der Aptamere an die entsprechenden Rezeptoren, den wirkstoffbeladenen Partikel ins Zellinnere aufnehmen. Dies geschieht über Endozytose, welche im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

3.1.2.5 Zelluläre Aufnahme von Targeted Drug Delivery Systemen über Endozytose

Es gibt zwei Hauptwege der Endozytose, über die Partikel und Makromoleküle in die Zellen aufgenommen werden. Sie werden in Phagozytose und Pinozytose unterschieden. Bei der Phagozytose werden vor allem große Partikel mit einem Durchmesser >1 µm internalisiert. Die Aufnahme über Phagozytose ist dabei aktin-abhängig und wird unter anderem durch die Immunantwortzellen wie Makrophagen ausgelöst [40, 83]. Die Pinozytose wird weiter in Makro- und Mikropinozytose unterschieden, wobei die Makropinozytose ein unspezifischer Prozess ist, um Fluide und Partikel zusammen in die Zelle aufzunehmen. Sie selektiert dabei nicht über Rezeptoren. Bei der Mikropinozytose wird in clathrin- und caveolae-vermittelte Endozytose unterschieden. Hierbei handelt es sich um Rezeptorvermittelte Endozytosewege. Über sie werden vor allem Nanomaterialien, wie Viren und Nanopartikel aufgenommen [84]. Dabei binden die Partikel über Liganden an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen und werden internalisiert. Der Zelltyp und die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel, wie die Größe, ihre Form und ihre Oberflächenbeschaffenheit bestimmen den entsprechenden Endozytoseweg. So werden Polystyrenlatex Nanopartikel, die kleiner als 200 nm sind, über den clathrin-vermittelten Weg

[2] Untersuchungen zum Zell-Targeting und zur zellulären Aufnahme von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln; 2017

aufgenommen, während größere Partikel über die caveolae- vermittelte Endozytose in die Zelle gelangen. Abbildung 11 zeigt die verschiedenen Endozytosewege.

Um herauszufinden, welchen Endozytoseweg die Nanopartikel nehmen, werden entsprechende Endozytose Inhibitoren, wie beispielsweise Dynasor, welches Dynamin inhibiert, eingesetzt. Dynamin ist ein Protein, das im clathrin-vermittelten Endozytoseweg an der Vesikelbildung beteiligt ist. Weiterhin kann über den Einsatz von Amilorid (Inhibitor der Pinozytose) herausgefunden werden, ob die Nanopartikel über Pinozytose aufgenommen werden [83].

Da Polymer-Nanopartikel hauptsächlich über den clathrin-abhängigen Endozytoseweg (*clathrin-mediated endocytosis*, CME) in die Zelle aufgenommen werden und diese im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen, soll im Folgenden nun näher auf diesen Rezeptorvermittelten Endozytoseweg eingegangen werden.

Die Rezeptorvermittelte Endozytose ist einer der wichtigsten Prozesse zur Aufnahme von Viren und Biopartikeln (z.B. Makromoleküle oder Feststoffpartikel) in die Zelle [85].

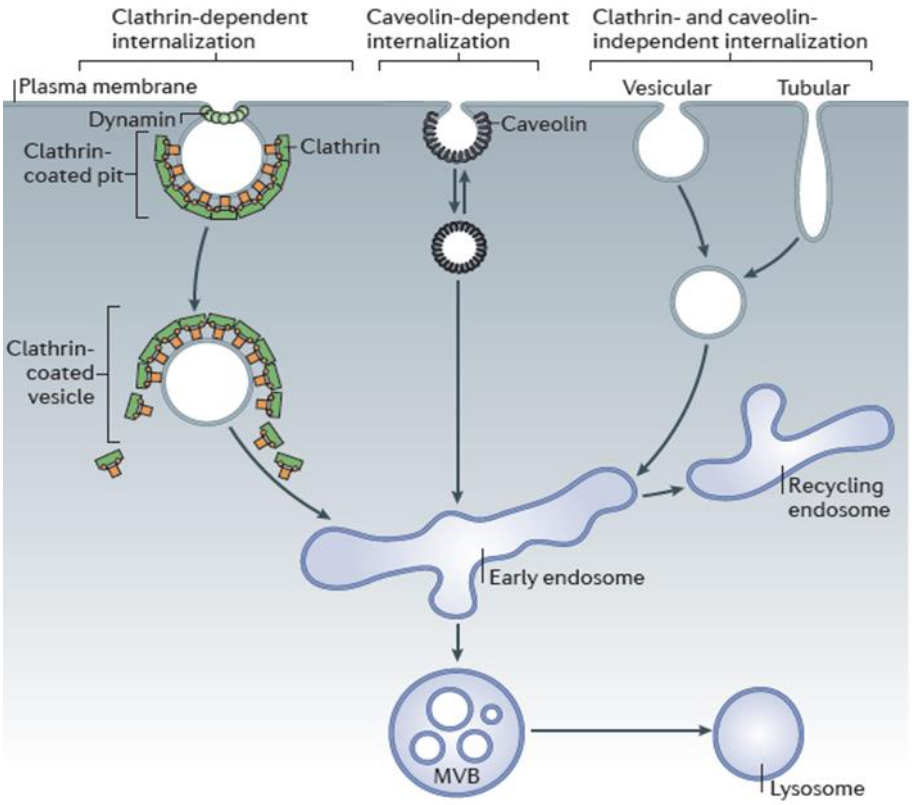

Abbildung 11: Schema der verschiedenen Endozytosewege nach [86].

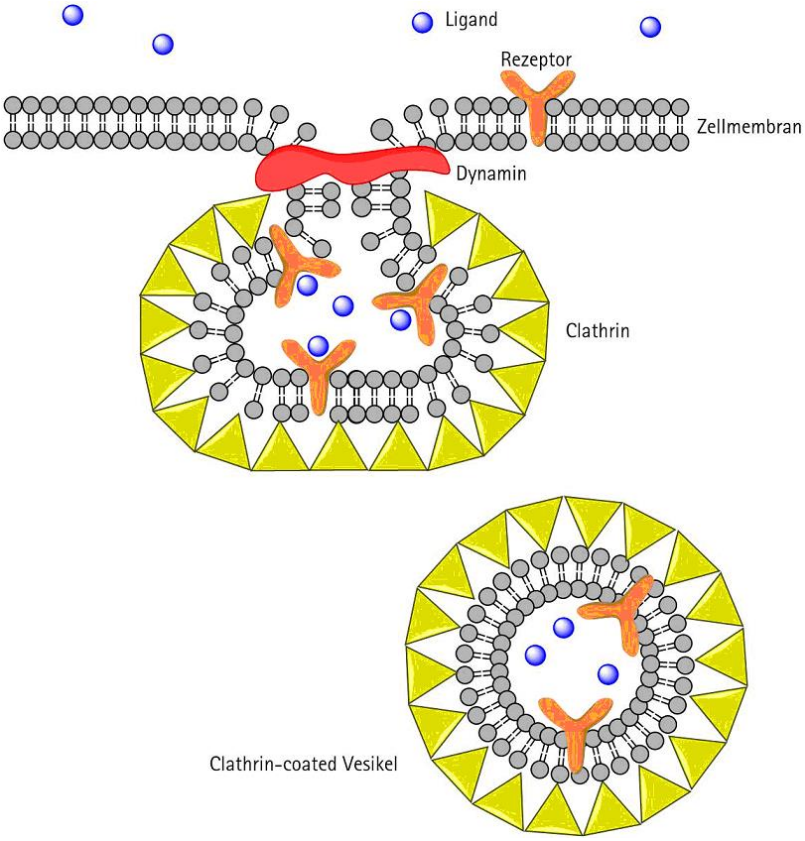

Abbildung 12: Bildung eines Vesikels bei der Endozytose.

Dabei binden die auf dem TDDS vorhandenen Liganden an spezifische Rezeptoren auf der Außenseite der Zellmembran. Dies ist der initiale Schritt der Rezeptorvermittelten Endozytose. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor bildet sich eine Vertiefung in der Zellmembran [85]. Es kommt zu einer Erhöhung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. Sobald genug Wechselwirkungen vorhanden sind, legt sich das Protein Clathrin von Innen um die Zellmembran und polymerisiert, wodurch sich eine Clathrin-Hülle bildet (Abbildung 12). Das Protein Dynamin sorgt dann dafür, dass sich die Hülle inklusive der gebundenen Liganden abschnürt und sich ein Vesikel bildet. Die Clathrin-Hülle wird nach der Abschnürung abgestreift, was mit der Bildung des frühen Endosoms gleichzusetzen ist. Diese wandeln sich über bestimmte Fusionsprozesse zu den späten Endosomen um. Durch relativ saure pH-Werte von 4.5 – 5 dissoziieren Liganden sowie Rezeptoren und die Degradation der aufgenommenen Substanzen bzw. die Freisetzung von Wirkstoffen aus Partikeln beginnt. Liganden und Rezeptoren werden in kleinen Vesikeln abgeschnürt und recycelt [87].

3.2 Drug Delivery Systeme in der klinischen Anwendung

Der Einsatz von Nanotechnologie im Bereich der Wirkstofffreisetzung hat bereits einen großen Einfluss auf viele Bereiche der Medizin. Derzeit gibt es mehr als 20 nanopartikelbasierte Therapeutika, die sich in der klinischen Anwendung befinden [58]. Weitere 250 befinden sich in verschiedenen präklinischen und klinischen Phasen [40]. Nach wie vor werden jedoch noch deutlich mehr passive als aktive DDS eingesetzt.

Doxil® war das erste von der FDA genehmigte Nanotherapeutikum, welches 1995 für das AIDS bedingte Kaposi Syndrom zugelassen wurde. Bei dieser Form ist Doxorubicin in ein PEGlyiertes Liposom eingekapselt [40]. Ein weiteres liposomenbasiertes Nanotherapeutikum ist das **Myocet®**. Hier ist Doxurubicin ebenfalls in Liposomen eingekapselt, besitzt aber keine PEG Schicht. Durch die Einkapselung in die Liposomen konnte die Halbwertszeit des Medikaments im Körper von 0.2 h auf 2.5 h (**Myocet®**) und 55 h (**Doxil®**) ausgedehnt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass **Doxil®** eine geringere Kardiotoxizität aufweist als freies Doxorubicin [4]. Der Nachteil von Liposomen ist jedoch, dass sie im Vergleich zu polymerbasierten Nanotherapeutika weniger stabil sind [40].

Andere vielversprechende liposomale Nanotherapeutika in klinischen Phasen sind u.a. **ThermoDox®,** eine temperatursensitive liposomale Doxorubicin-Arzneiform, die den Wirkstoff bei Temperaturen >39 °C freisetzt; auch NL CPT-11, ein Ableger von Irinotecan, wird im Moment in der klinischen Phase I gegen Gliomazellen getestet [39].

Abraxane® (2005) ist eine Albumin-gebundene Form von Paclitaxel gegen Brustkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs sowie Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom [58]. Im Vergleich zu **Cremophor® EL** (Taxol), zeigte **Abraxane®** in Studien stärkere Tumorantworten [40]. Ein weiteres Paclitaxel- gebundenes Nanotherapeutikum ist das **Genexol® PM** (2007). Es handelt sich hierbei um Polymer-Mizellen, die den Wirkstoff eingekapselt haben. In den USA befindet sich das Medikament in der klinischen Phase II [40].

Seit Januar 2011 ist das sogenannte **„BIND-014"** in der ersten klinischen Phase. BIND-014 ist ein Polymer-Nanopartikel-System, das Docetaxel eingekapselt hat und spezifisch für PSMA Zellen ist [40]. **CALAA-01** ist das erste Transferrin-modifizierte, *targeted* Nanopartikel-System, das 2008 die klinische Phase für die Freisetzung von siRNA erreichte. Es dient der Inhibierung von Tumorwachstum sowie zur Reduzierung der Tumorgröße [40].

In Tabelle 1 sind einige passive sowie aktive *Targeting* Systeme, die bereits auf dem Markt oder in klinischen Studien sind, aufgelistet [4] [39].

Tabelle 1: *Drug Delivery* Systeme in der klinischen Entwicklung.

Bezeichnung	Was?	Ligand	Eingesetzt bei?	Status	Aktives/ passives DDS	Referenz
Abraxane®	Albuminbasierte NPs, die PTX enthalten		Brustkrebs	Zugelassen	passiv	[39]
CALAA-01	Cyclodextrinbasierte NPs, die anti-RRM2 siRNA enthalten	Transferrin	Verschiedene bösartige Tumore	Phase I	aktiv	[39]
Myocet®	Liposomales Doxorubicin		Brustkrebs	Zugelassen	passiv	[39]
DaunoXome®	Liposomales Daunorubicin		Kaposi Sarkom	Zugelassen	passiv	[39]
Doxil®/Caelyx®	PEGyliertes Liposomales Doxorubicin		Brustkrebs, Eierstockkrebs, Kaposi Sarkom, u.a.	Zugelassen	passiv	[39]
Xyotax®	PTX verlinktes Polyglutamat Polymer		Brust-/ Eierstockkrebs	Phase II	passiv	[4]
Taxoprexin®	PTX verlinkt mit Docosahexaensäure		Verschiedene Tumore	Phase II-III	passiv	[4]
BIND-014	Polymer-NPs, die Docetaxel enthalten	*Small molecule*	Solide Tumore	Phase I	aktiv	[40]

Eine Vielzahl weiterer solcher Systeme befindet sich in verschiedenen klinischen Phasen. Diese sind jedoch der Übersicht wegen nicht weiter aufgeführt.

4 Experimenteller Teil

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Entwicklung und Charakterisierung eines *in vitro* Modellsystems für die gezielte Wirkstofffreisetzung (*Targeted Drug Delivery*). Solche Modellsysteme bestehen in den meisten Fällen aus einem Trägermaterial, einem Wirkstoff und einem spezifischen Liganden, der den Träger am gewünschten Wirkort anreichern soll. Dort wird der im System enthaltene Wirkstoff freigesetzt.

Die Grundlage des in der vorliegenden Arbeit entwickelten *Targeted Drug Delivery* Systems bilden Nanopartikel. Als Trägermaterial dienen zwei biokompatible Polymere, mPEG-PCL und HOOC-PEG-PCL., die zuvor aus ihren Monomeren hergestellt werden müssen. Während der anschließenden Partikelherstellung können dann hydrophobe Wirkstoffe eingekapselt werden. Als spezifische Liganden werden Aptamere auf der Oberfläche der Partikel immobilisiert (Abbildung 13). Die eingesetzten Aptamere sind gegen die Lungenkrebszelllinie A549 selektiert worden [88].

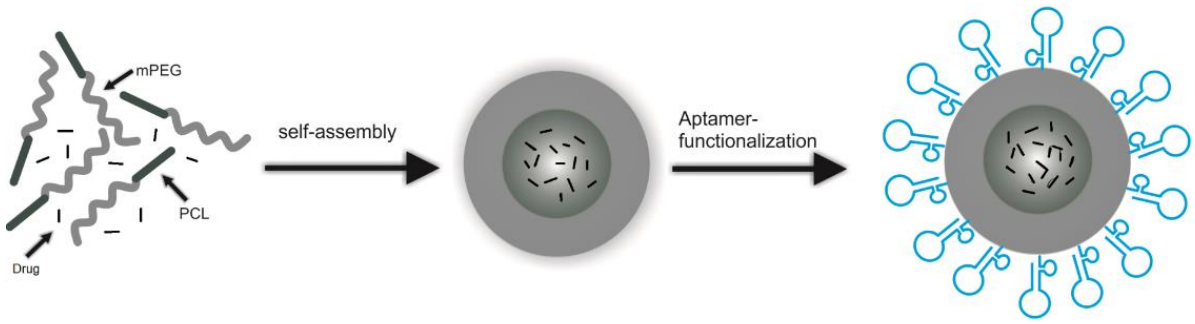

Abbildung 13: Schematische Darstellung der Partikelassemblierung und deren Funktionalisierung mit dem Aptamer.

In der vorliegenden Arbeit werden nach der Partikelherstellung zunächst die Partikel charakterisiert, deren Herstellung optimiert, Wirkstoffe eingekapselt und anschließend Aptamere an der Oberfläche der Partikel immobilisiert. Nach erfolgreicher Immobilisierung wird die Menge des immobilisierten Aptamers und die spezifische Interaktion der Konjugate mit Zellen bestimmt.

Um die Bindung der funktionalisierten Partikel an Zellen und ihre Aufnahme in die Zellen zu charakterisieren, werden für die Versuche zunächst Modellpartikel (Quantum Dots (QDs)) verwendet. Quantum Dots sind aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften leichter zu detektieren. Die QDs besitzen an ihrer Oberfläche, genau wie die PEG-PCL Nanopartikel, Carboxylgruppen, um die verwendeten Aptamere immobilisieren zu können. Nach erfolgreicher Charakterisierung der Modellpartikel und paralleler Entwicklung von PEG-PCL Nanopartikeln werden die Experimente auch mit den ebendiesen Partikeln durchgeführt.

Im Folgenden wird zunächst auf die Entwicklung des *Targeted Drug Delivery* Systems mit der Polymersynthese und Partikelherstellung sowie deren Charakterisierung eingegangen.

4.1 Entwicklung des *Targeted Drug Delivery* Systems

4.1.1 Polymersynthese

Vor der Produktion der Nanopartikel wurden zunächst die beiden Polymere Methoxy-Polyethylenglykol-Polycaprolacton (mPEG-PCL) und HOOC-PEG-PCL synthetisiert. Dies konnte über eine Ringöffnungscoplymerisation des ε-Caprolactons und des mPEGs mit Zinkoktoat als Katalysator realisiert werden [89, 90]. Die Abbildung 14 zeigt beispielhaft die Ringöffnungsreaktion des Caprolacton-Rings.

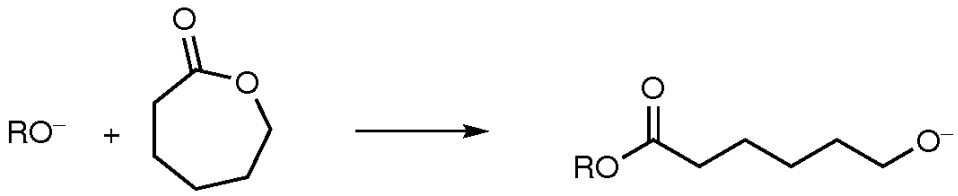

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Ringöffnungscopolymerisation des ε-Caprolactons.

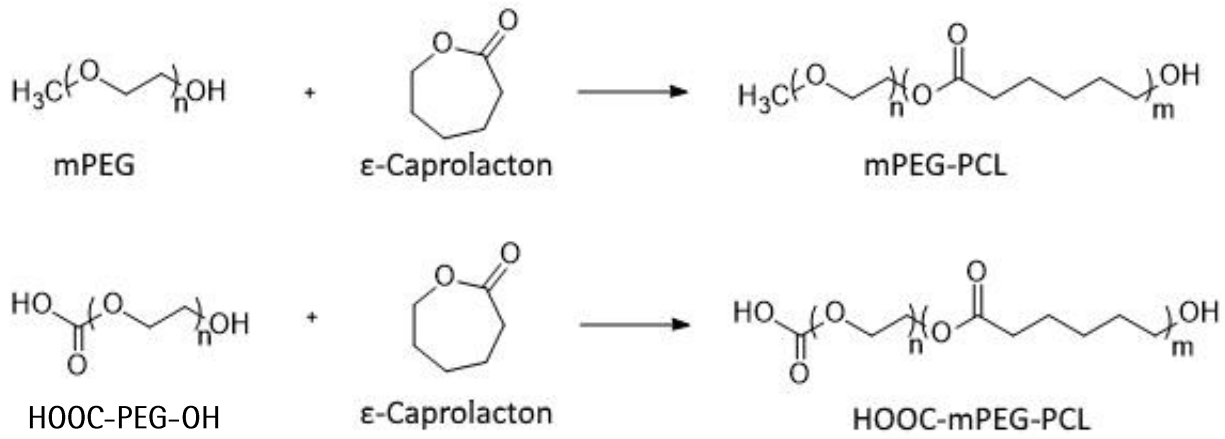

Abbildung 15: Synthese von mPEG-PCL (oben) aus ε -Caprolacton und mPEG; Synthese von HOOC-PEG-PCL aus ε -Caprolacton und HOOC-PEG-OH.

Um mPEG-PCL (Abbildung 15) zu synthetisieren, musste das mPEG zunächst mittels einer azeotropen Destillation in wasserfreiem Toluol dehydratisiert werden. Anschließend wurde es unter einem Vakuum getrocknet, um das Toluol zu entfernen. Das ε-Caprolacton wurde vor seinem Einsatz unter Stickstoffatmosphäre getrocknet. Das Zinkoktoat wurde in wasserfreiem Toluol, ebenfalls unter Stickstoffatmosphäre, gelöst. Anschließend wurden das ε-Caprolacton, das mPEG und der Katalysator miteinander vermischt und die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre und unter ständigem Rühren für 24 h bei 130 °C durchgeführt.

Das HOOC-PEG-PCL wurde aus HOOC-PEG-OH und ε-Caprolacton hergestellt. Die Synthese erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Herstellung von mPEG-PCL. Der Erfolg der Copolymerisation von HOOC-PEG-OH und dem ε-Caprolacton sowie dem mPEG und dem ε-Caprolacton wurde zunächst mit Hilfe der Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie untersucht (FTIR; IFS 66 Bruker; 45 ° ZnSe Kristall; deuterierter Triglycin Sulfat Detektor). Abbildung 16 zeigt das FTIR Spektrum der beiden Polymere mPEG-PCL und HOOC-PEG-PCL. Im Spektrum von HOOC-PEG-PCL (grüne Linie) lassen sich die Signale bei 1724 cm^{-1} und 1376 cm^{-1} Ester- (C=O) und Ethergruppen (C-O) zuordnen [91]. Das gleiche Ergebnis kann bei dem Spektrum des mPEG-PCL (orangene Linie) beobachtet werden. Das starke Signal in beiden Spektren bei 1726 cm^{-1} und 1727 cm^{-1} kann der Carbonyl-Schwingung des PCLs zugeordnet werden [92]. Das Signal bei 1170 cm^{-1} können den Schwingungen der C-O-C Einheiten zugeordnet werden [92]. Die Signale bei 1265 cm^{-1} und1347 cm^{-1} können Estergruppen zugeordnet werden [91]. Auch diese Ergebnisse lassen auf den Erfolg der Copolymerisation schließen. Allerdings ist anhand des Spektrums des HOOC-PEG-PCL kein eindeutiges Signal der Carboxylgruppe zuzuordnen. Aus diesem Grund und für eine Bestätigung der Copolymerisation wurde anschließend ein ^{1}H NMR durchgeführt.

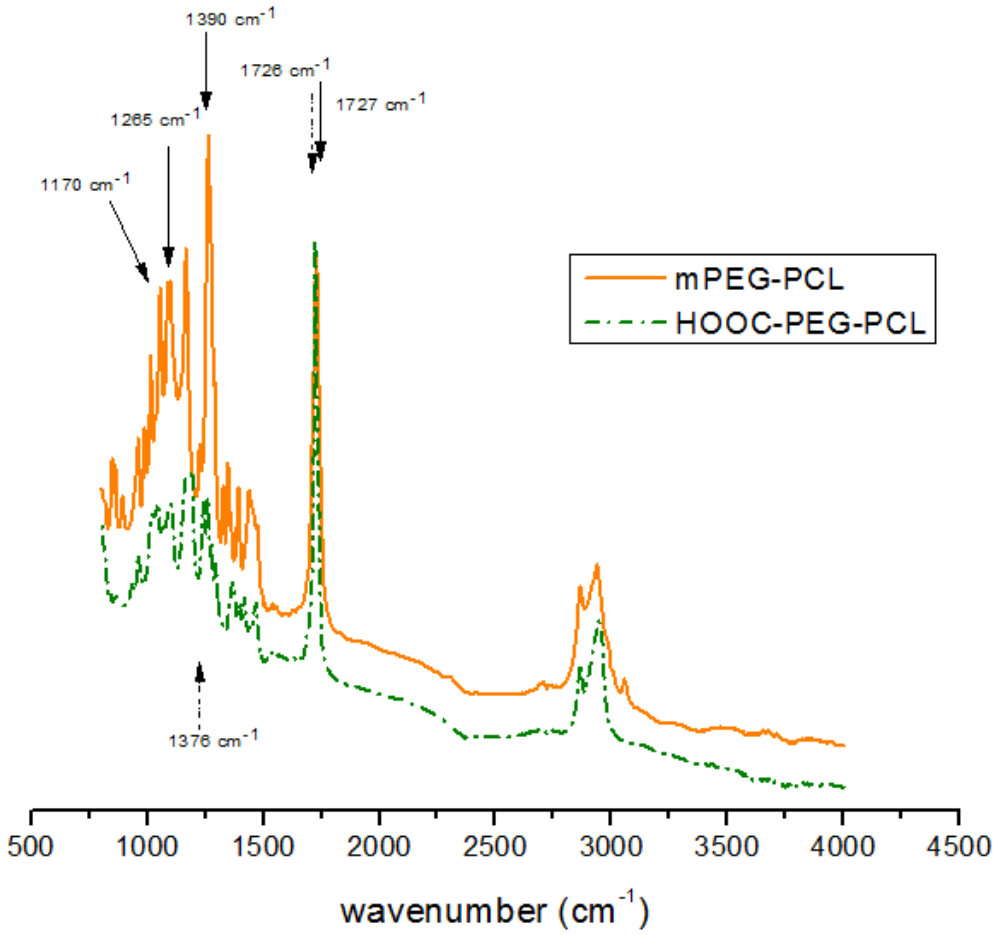

Abbildung 16: FTIR Spektrum der Polymere HOOC-PEG-PCL und mPEG-PCL.

Mit Hilfe eines ^{1}H NMR ((Varian VNMRS 400, 400 MHz, $CDCl_3$) Spektrums konnte eine genauere Analyse der Copolymerisation durchgeführt werden (Abbildung 17 und Abbildung 18). Die Tabellen 2 und 3 zeigen die Zuordnungen der Peaks der ^{1}H NMR Spektren von HOOC-PEG-PCL (Tabelle 2) und mPEG-PCL (Tabelle 3).

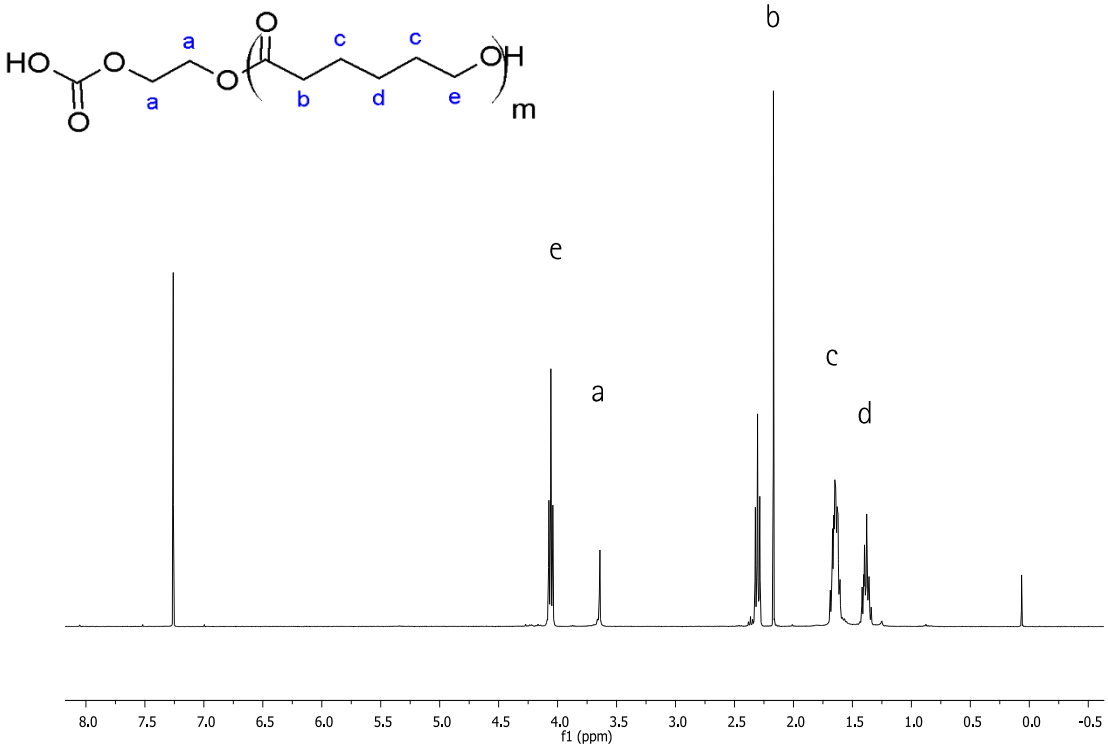

Abbildung 17: ^{1}H NMR von HOOC-PEG-PCL.

Tabelle 2: Zuordnung der Peaks des ^{1}H NMR Spektrums von HOOC-PEG-PCL (vgl. Abbildung 17).

Peakbezeichnung	Verschiebung [ppm]	Gruppe
a	3,6	Protonen der Kohlenstoffe des HOOC-PEGs
b	2,3	Protonen des Kohlenstoffs neben der Carbonylgruppe der PCL-Einheit
c	1,6	Protonen der Kohlenstoffe der PCL-Einheit
d	1,4	Protonen des mittleren Kohlenstoffs der PCL-Einheit
e	4,1	Protonen des Kohlenstoffs neben der Hydroxylgruppe der PCL-Einheit

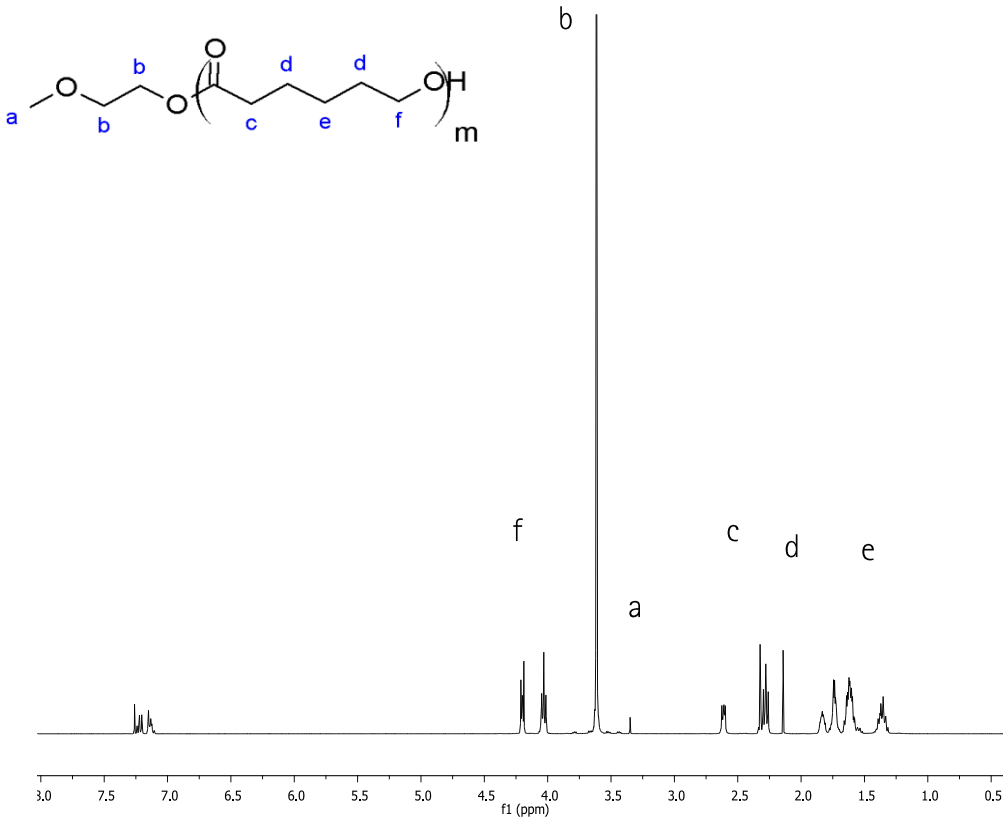

Abbildung 18: ^{1}H NMR von mPEG-PCL.

Tabelle 3: Zuordnung der Peaks des ^{1}H NMR Spektrums von mPEG-PCL (vgl. Abbildung 18).

Peakbezeichnung	Verschiebung [ppm]	Gruppe
a	3,3	Protonen der Methylgruppe der mPEG-Einheit
b	3,6	Protonen der Kohlenstoffe der mPEG-Einheit
c	2,3	Protonen des Kohlenstoffes neben der Carboxylgruppe der PCL-Einheit
d	1,6-1,8	Protonen des Kohlenstoffes der PCL-Einheit
e	1,4	Protonen des mittleren Kohlenstoffes der PCL-Einheit
f	4,1 und 4,2	Protonen des Kohlenstoffs neben der Hydroxylgruppe der PCL-Einheit [93, 94].

Die Synthesen beider Polymere als Ausgangsstoffe für die Nanopartikel können als erfolgreich betrachtet werden.

Über das ^{1}H NMR Spektrum lassen sich außerdem Aussagen über das Molekulargewicht beider Polymere treffen. Es ergibt sich für das mPEG-PCL ein Molekulargewicht von 13,7 kDa und für das HOOC-PEG-PCL eines von 102,4 kDa (Kapitel 6.2.1.3). Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgt mit Hilfe des Programms „TopSpin". Dieses gibt unter anderem einen Polymerisierungsgrad an, der

mit in die Berechnung einfließt. Bei HOOC-PEG-PCL war dieser mit DP = 13 deutlich höher als bei mPEG-PCL (DP = 0,675). Dies kann ein möglicher Grund für den großen Unterschied der Molekulargewichte der Polymere sein. Da dies jedoch nicht Teil der vorliegenden Arbeit war, wird im Folgenden nicht näher darauf eingegangen.

Nach der erfolgreichen Copolymerisation der beiden Polymere, wird im Folgenden die Herstellung der Nanopartikel aus den Polymeren beschrieben sowie deren Optimierung dargestellt. Den Abschluss des Kapitels bildet die Charakterisierung der hergestellten Partikel.

4.1.2 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Die Nanopartikel wurden durch die sogenannte *solvent evaporation* (Lösemittelverdampfung) Methode hergestellt (Abbildung 19) [63, 93]. Dazu wurden die beiden Polymere mPEG-PCL (28 mg) und HOOC-PEG-PCL (3 mg) zusammen mit dem Wirkstoff in einem organischen Lösemittel (Dichlormethan (DCM)) gelöst und tropfenweise zu einer Natriumcholat-Hydrat Lösung hinzugegeben. Dabei ist es wichtig, dass die Lösung gerührt wird, da sich sonst Aggregate bilden. Es bildete sich bei Hinzugabe der in DCM gelösten Polymere eine zweiphasige Lösung. Anschließend wurde diese mittels Ultraschalles homogenisiert. Das organische Lösemittel wurde im Anschluss am Rotationsverdampfer aus der wässrigen Lösung entfernt. Um dann die Lösung mit den darin enthaltenen Nanopartikeln zu reinigen, wurde diese gegen Wasser dialysiert (MWCO kDa 3,5) und anschließend für 15 min zentrifugiert, um mögliche Aggregate zu entfernen. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), *Nanoparticle Tracking* Analyse (NTA) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Außerdem wurde die Oberflächenladung der Partikel mittels Zeta-Potential Messung bestimmt.

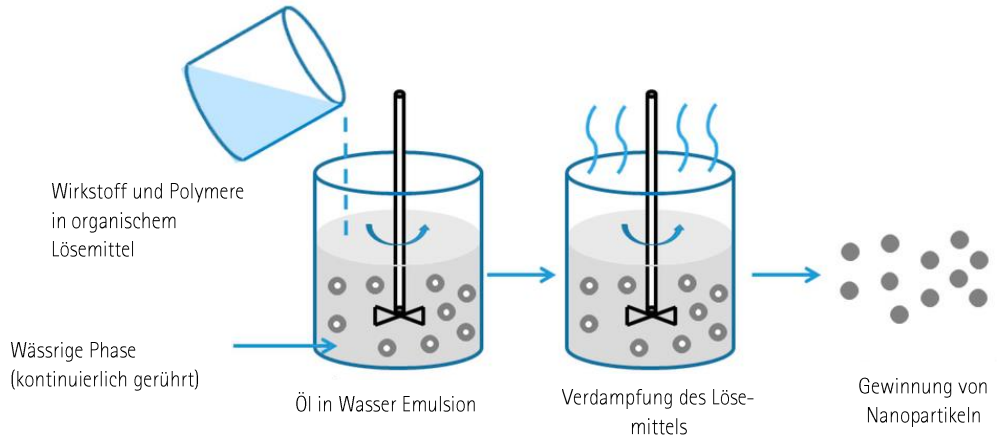

Abbildung 19: *Solvent Evaporation* Methode nach [95].

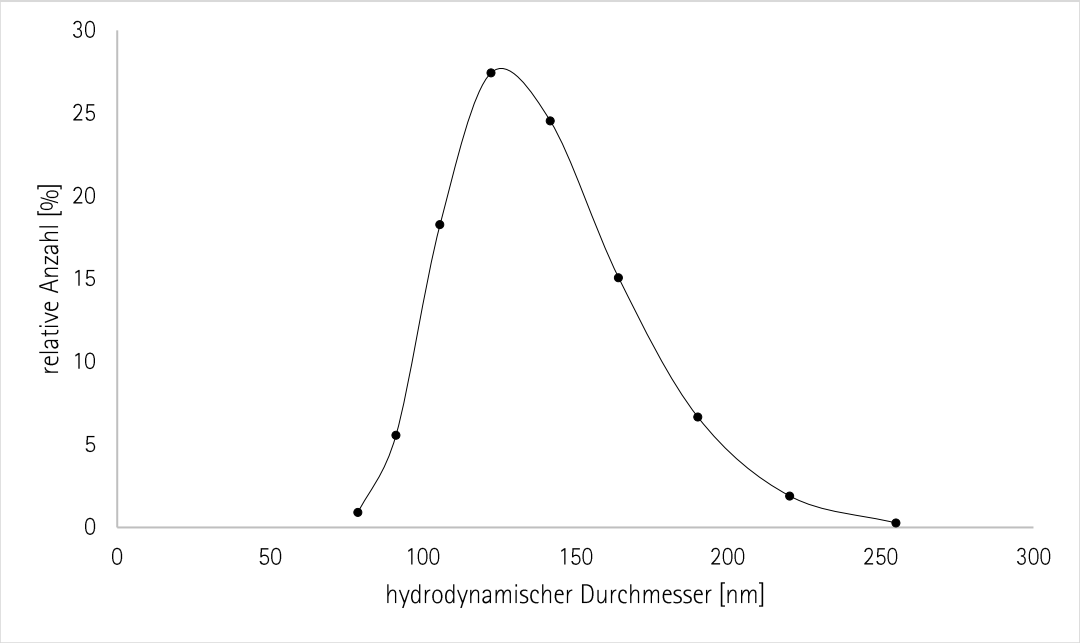

Abbildung 20: Ergebnis der dynamischen Lichtstreuungsmessung der Nanopartikel aus mPEG-PCL und HOOC-PEG-PCL.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuungsmessung der Nanopartikel. Mit Hilfe der DLS Messung, wird die Brown'sche Molekularbewegung von Partikeln in einer Lösung detektiert. Die Brown'sche Molekularbewegung ist die zufällige Bewegung von Partikeln in den umgebenden Lösemittelteilchen. Je größer die Partikel sind, desto langsamer ist ihre Bewegung. Kleinere Partikel werden leichter durch die Lösemittelteilchen bewegt und sind daher schneller [96]. Die durch die DLS Messung aufgenommene Größenverteilung der Partikel zeigt eine Streuung der Partikelgröße zwischen 75 nm und 255 nm. Partikel mit einer Größe von etwa 120 nm treten in dieser Verteilung am häufigsten auf. Laut [85] sollten die Partikel eine maximale Größe von unter 150 nm haben, um eine effiziente zelluläre Aufnahme zu ermöglichen. Die Partikelgröße ist einer der wichtigsten Parameter, welcher das Verhalten von TDDS sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestimmt. Es wurde gezeigt, dass Nanoträger zwischen 100 und 200 nm dafür bekannt sind, über den EPR Effekt (*enhanced permeability and retention*; vgl. Kapitel 3.1.1) vermehrt in Tumorzellen als in gesunde Zellen einzudringen, denn Tumorzellen besitzen eine durchlässigere Permeabilität als gesunde Zellen [97]. Da bei der vorliegenden Arbeit im Folgenden spezifische Liganden auf der Oberfläche der Partikel immobilisiert werden sollten, durften die Partikel eine Größe von 150 nm somit nicht überschreiten. Dementsprechend wurde in den nachfolgenden Experimenten versucht, die Herstellung der Partikel zu optimieren, um erstens eine Lösung mit Partikeln gleicher Größe und zweitens einen Partikeldurchmesser von unter 150 nm zu erhalten. Ein weiteres Ziel der Optimierung war außerdem, eine monodisperse Partikelsuspension herzustellen; d.h. eine möglichst enge Größenverteilung zu erhalten. Die Breite der Größenverteilung wird über den Polydispersitätsindex

(PDI) bestimmt, der ebenfalls durch die DLS Messung ermittelt wird. Der PDI gibt an, wie polydispers eine Partikelsuspension ist, also ob die Suspension Partikel vieler verschiedener Größen enthält oder nur solche einer einheitlichen Größe. Liegt der PDI bei 0, liegt eine vollständig monodisperse Lösung vor. In ihr sind nur Partikel einer Größe enthalten. Bei sehr engen Größenverteilungen liegt der PDI zwischen 0,1 und 0,2. Ab Werten von 0,3 sind die Größenverteilungen etwas breiter. In diesen Lösungen sind Partikel verschiedener Größen enthalten. Ab einem PDI von 0,5 sind die Größenverteilungen sehr breit und es handelt sich um polydisperse Lösungen. Für die optimierte Nanopartikelsuspension ist daher eine Größenverteilung mit einem PDI zwischen 0 und 0,2 erstrebenswert [98].

Im ersten Schritt der Optimierung wurde zunächst die Dauer der Ultraschallhomogenisation angepasst.

Optimierung der Ultraschallhomogenisation

Die Polymere wurden zu Beginn der Herstellung in eine Natriumcholat-Hydrat-Lösung getropft. Diese Lösung muss kontinuierlich gerührt werden. Nach [93] folgte nach dem dreistündigen Rühren die Homogenisation der Partikelsuspension durch die Ultraschallsonde. Da diese Methode dafür bekannt ist, sehr kleine Partikel hervorzubringen, wurde zunächst untersucht, ob die Dauer der Homogenisation einen Einfluss auf die Größenverteilung der Nanopartikel hat [99]. Die Dauer und die Amplitude der Ultraschallhomogenisation kann maßgeblich zur Größenverteilung der Partikel beitragen [54]. Nach Variation der Dauer der Homogenisation wurden die Partikelsuspensionen mittels DLS Messung charakterisiert. Dazu wurde die entsprechende Partikelsuspension zunächst jeweils 75 s, 90 s oder 120 s (Amplitude: 100 %, Cycle: 0,6) homogenisiert. Die Herstellung wurde ansonsten wie am Anfang dieses Kapitels beschrieben durchgeführt. Die Größenverteilungen der verschiedenen Partikelsuspensionen bei den gewählten Ultraschallzeiten sind in Abbildung 21 zu sehen.

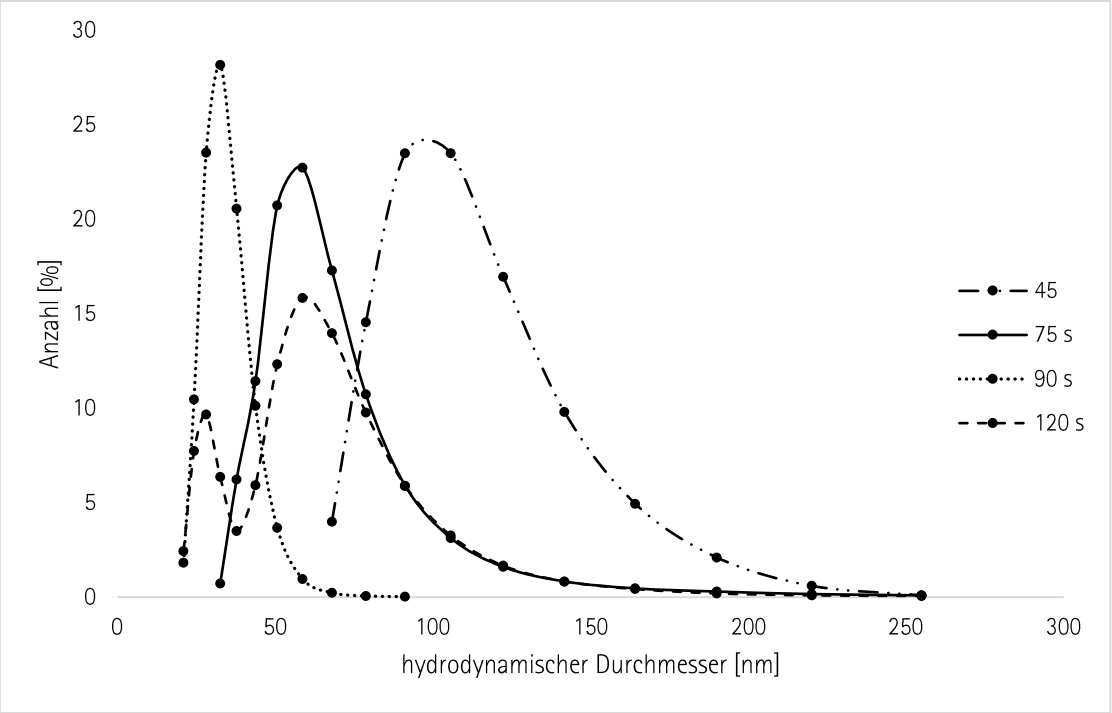

Abbildung 21: Ergebnisse der DLS Messung von Partikellösungen, die bei unterschiedlich langer Ultraschalldauer homogenisiert wurden.

Hierbei ist deutlich zu sehen, dass sich bei kürzeren Ultraschallzeiten (45 s) noch große Nanopartikel oder Agglomerate in den Partikelsuspensionen befinden, die Auswirkungen auf eine sehr breite Größenverteilung und damit einen hohen Polydispersitätsindex von > 0,5 haben. Bei einer Ultraschallzeit von 120 s weisen die Nanopartikel eine sehr breite Größenverteilung mit zwei verschiedenen Maxima auf. Dabei hat ein Teil der Partikel sein Maximum bei einer Größe von etwa 40 nm und der weitaus größere Teil ist etwa 60-70 nm groß. Eine längere Ultraschallzeit wirkt sich vermutlich schädlich auf die Partikel aus, wodurch sie wieder zerfallen. Laut [100] kann die hohe Energie, die zur Homogenisation durch Ultraschall benötigt wird, dafür verantwortlich sein.

Bei 75 s Ultraschalldauer zeigt sich eine größere Verteilung der hydrodynamischen Durchmesser der Partikel. Im Mittel sind diese etwa 90 nm groß und weisen einen PDI von 0,45 auf, was für eine Partikelsuspension mit Partikeln verschiedener Größen spricht. Dennoch ist das die optimale Größe für das zu entwickelnde *Targeted Drug Delivery* System.

Bei einer Ultraschalldauer von 90 s ergibt sich eine enge Größenverteilung. Die Partikelgröße beträgt im Mittel 40 nm und weist einen PDI von 0,2 auf. Somit lässt sich auf eine monodisperse Partikelsuspension schließen, in der sich weitestgehend Partikel einer Größe befinden. Die Größenverteilung dieser Partikel stellt ein nahezu optimales Ergebnis dar. Somit war das Ziel für den folgenden Optimierungsschritt, bei 75 s Ultraschall (und damit einer mittleren Partikelgröße von 90 nm) einen PDI von 0 – 0,2 zu erhalten.

Optimierung der Rührparameter

Da das Ziel für diesen Optimierungsschritt war, eine mittlere Partikelgröße von 90 nm und einen PDI zwischen 0 und 0,2 zu erhalten, wurde die Rührgeschwindigkeit und-dauer angepasst. Dafür war es notwendig, große Aggregate (vgl. Abbildung 21) zu vermeiden. Je stärker eine Lösung gerührt wird, desto kleiner sollten die Partikel werden [101, 102]. Weiterhin werden Nanopartikel größer, je länger sie gerührt werden [103, 104]. Damit die Partikel jedoch nicht kleiner als 10 nm werden, da sie sonst von den Nieren aus dem Organismus herausgefiltert würden, wurden verschiedene Rührgeschwindigkeiten untersucht. Es wurde zunächst die Rührgeschwindigkeit erhöht und anschließend die Rührdauer verlängert. Um deren Einfluss auf die Größe sowie die Größenverteilung der Partikel zu erhalten, wurden als Vergleich dazu eine kurze Rührdauer und anschließend eine langsame Rührgeschwindigkeit gewählt. So war es möglich, eine optimale Rührdauer zu ermitteln. Die fertigen Partikelsuspensionen wurden im Anschluss über die DLS Messung charakterisiert. Abbildung 22 zeigt die unterschiedlichen Größenverteilungen der Partikellösungen bei verschiedenen Rührzeiten und Rührgeschwindigkeiten.

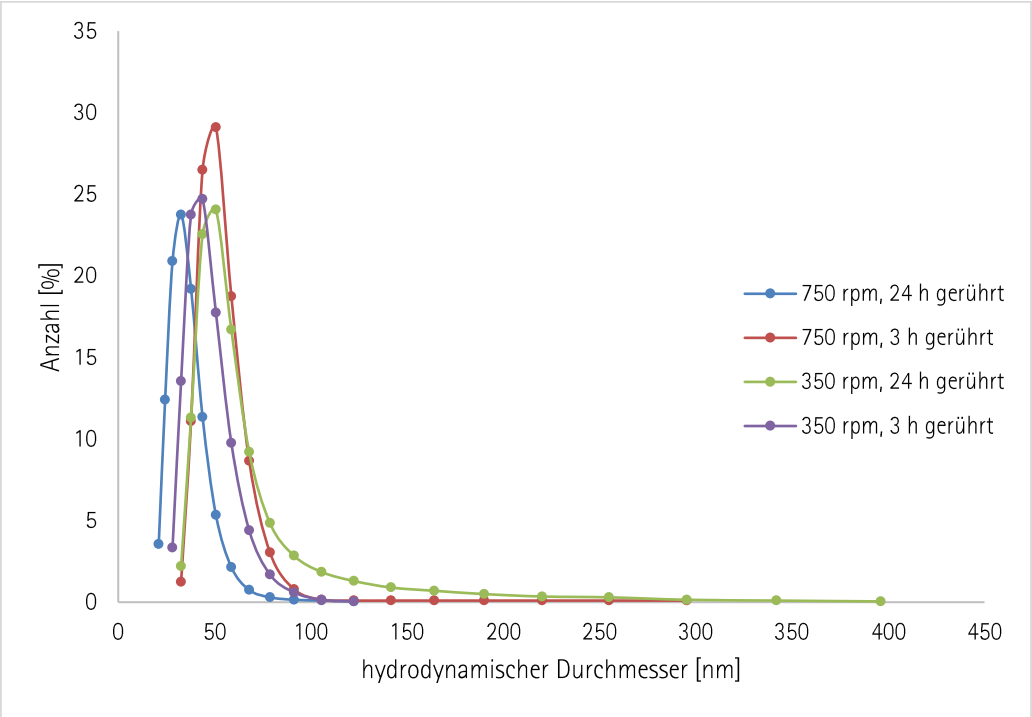

Abbildung 22: Ergebnisse der DLS Messung verschiedener Partikellösungen bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten und -zeiten.

Die Rührgeschwindigkeiten von 750 rpm und 350 rpm wurden gemäß [93] ausgewählt. Die Rührdauer von 3 h war ebenfalls aus der Literatur übernommen. Die 24 h Rührdauer wurde als Vergleich herangezogen. Aus Abbildung 22 geht hervor, dass eine lange Rührdauer von 24 h im

Vergleich zu einer kurzen von 3 h etwa zu gleich breiten Größenverteilungen führt. Diese sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: PDI bei verschiedenen Rührzeiten und -geschwindigkeiten.

Rührdauer [h]	Rührgeschwindigkeit [rpm]	PDI
24	750	0,35
24	350	0,7
3	750	0,4
3	350	0,55

Ein PDI von 0,35 spricht für eine relativ breite Größenverteilung mit Partikeln verschiedener Größen. Der PDI von 0,7 deutet auf eine polydisperse Partikelsuspension hin. Auch die beiden PDIs der kurzen Rührdauer von 3 h von 0,4 und 0,55 sprechen für eine polydisperse Suspension. Die Maxima aller Größenverteilungen waren jedoch bei einem hydrodynamischen Partikeldurchmesser von unter 100 nm. Das heißt, für folgende Partikelherstellungen kann eine Rührdauer von 3 h gewählt werden, so dass die Herstellung weniger zeitintensiv wird. Der PDI aller Größenverteilungen musste jedoch nach wie vor optimiert werden. Dieser sollte einen Wert zwischen 0 und 0,2 haben. Daher wurde untersucht, ob eine Kombination aus beiden Rührgeschwindigkeiten eine noch engere Größenverteilung und somit einen niedrigeren PDI hervorbringt. Die Partikellösung wurde die erste Stunde mit 750 rpm und die letzten beiden Stunden bei 350 rpm gerührt. Die Ergebnisse der entsprechenden DLS Messung sind in Abbildung 23 dargestellt. Die gestrichelten, bunten Linien sind dabei die Ergebnisse aus Abbildung 22. Die rote Linie der Abbildung 23 stellt die Kombination aus drei Stunden stark und schwach gerührter Partikelsuspension dar.

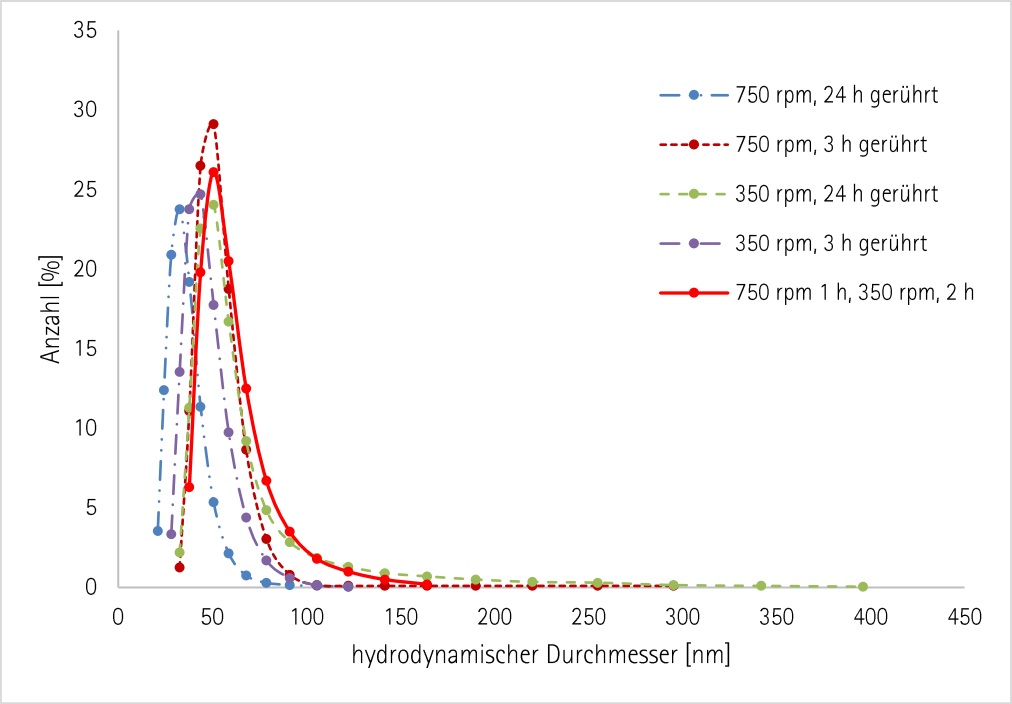

Abbildung 23: Ergebnisse der Partikelsuspensionen, nachdem Rührdauer und -geschwindigkeit variiert wurden.

Abbildung 23 zeigt, dass die Größenverteilung nach der Kombination aus einer starken und einer schwachen Rührgeschwindigkeit (rote Linie). Es lässt sich feststellen, dass die Kombination der Rührgeschwindigkeiten, eine enge Größenverteilung der Partikelsuspension hervorbringt. Der PDI lag bei 0,2. Es handelt sich somit um eine monodisperse Lösung. Im Mittel sind die Partikel etwa 70 nm groß. Somit ist die Zielgröße der Nanopartikel erreicht. Diese Kombination aus 1 h bei 750 rpm und 2 h bei 350 rpm für Rührgeschwindigkeit und –dauer wurde im weiteren Verlauf für alle Partikelherstellungen beibehalten. Das Problem, dass immer noch große Partikel oder Aggregate zu detektieren waren, konnte durch die Anpassung der Rührgeschwindigkeit und -dauer jedoch nicht vollständig gelöst werden. Daher wurde als letzter Optimierungsschritt nach Abschluss der Dialyse ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei höchster Umdrehungszahl hinzugefügt. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels DLS vermessen. Nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis dieses Optimierungsschrittes.

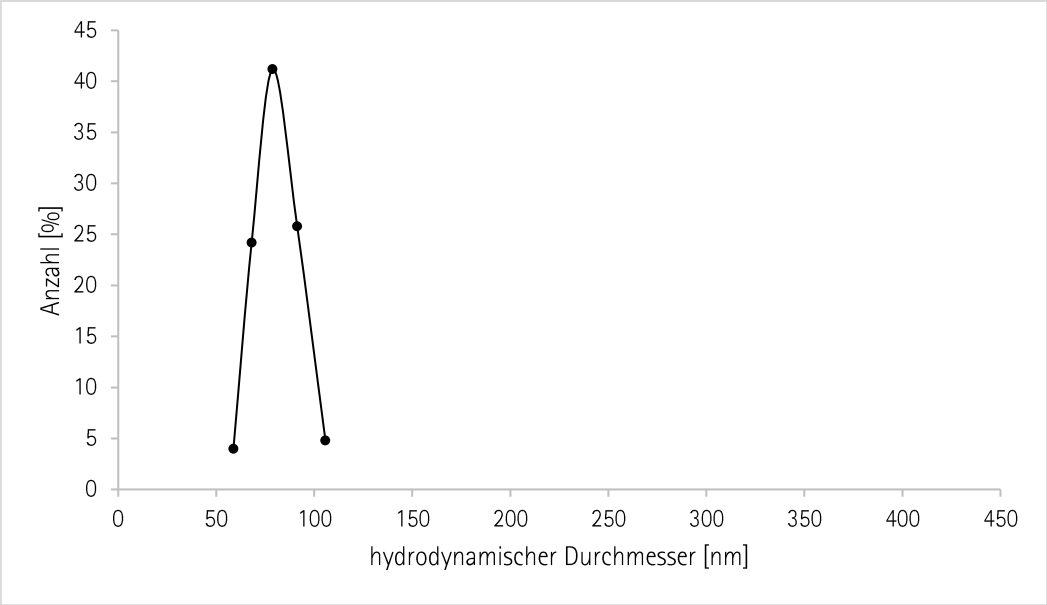

Abbildung 24: Ergebnisse des Optimierungsschritts mittels Zentrifugation.

Abbildung 24 zeigt, dass der Überstand frei von großen Aggregaten ist und nur noch Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser zwischen 60 nm und 100 nm aufweist. Das Maximum befindet sich bei etwa 80 nm. Somit war das Ziel der Optimierung, eine mittlere Partikelgröße von etwa 90 nm und einen PDI von 0 – 0,2 zu erhalten, erreicht.

Bisher konnte also die Herstellung der Nanopartikel hinsichtlich der Dauer der Ultraschallhomogenisation sowie der Rührdauer und –geschwindigkeit optimiert werden. Alle Optimierungen wurden für zukünftige Herstellungen verwendet. Anschließend wurde untersucht, ob verschiedene Mengen der Polymere einen direkten Einfluss auf die Größenverteilung der Nanopartikel haben.

Einfluss der eingesetzten Polymermenge

Dazu wurde zunächst die eingesetzte Menge des HOOC-PEG-PCLs variiert. Es wurden 2 mg, 3 mg, 4 mg und 5 mg eingesetzt. Die Partikel wurden gemäß dem optimierten Protokoll hergestellt und anschließend mittels DLS Messung charakterisiert. Bei Betrachtung der Größenverteilungen (Abbildung 25), lässt sich feststellen, dass das Verhältnis von mPEG-PCL (28 mg) zu HOOC-PEG-PCL (3 mg) eine ideale Größenverteilung hervorruft. Wird mehr oder weniger HOOC-PEG-PCL eingesetzt, kommt es zu einer Verbreiterung der Verteilungen. Möglicherweise haben sich Aggregate oder sehr große Nanopartikel gebildet. Ein weiterer Grund für die Verbreiterung der Verteilungen, gerade beim Einsatz einer höheren Menge an HOOC-PEG-PCL, kann auf das deutlich höhere Molekulargewicht dieses Polymers zurückzuführen sein. Mit Zunahme der eingesetzten Menge an HOOC-PEG-PCL werden die Verteilungen breiter bzw. die Partikel deutlich größer.

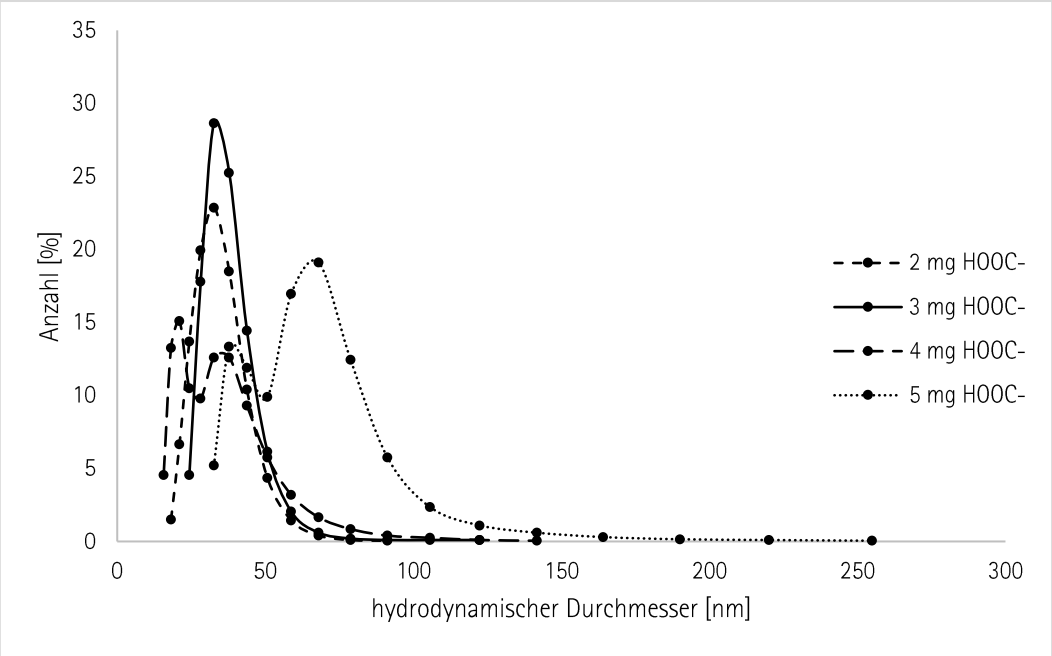

Abbildung 25: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuungsmessung mit Partikeln, bei denen die Menge eines Polymers variiert wurde.

Eine Veränderung der Menge an mPEG, bei gleichbleibender Menge an HOOC-PEG-PCL, hat auf die Größe der Nanopartikel keinen Einfluss. Die Menge des mPEG-PCLs wurde im Verhältnis 1:9, 1:10, 1:11 und 1:12 variiert.

Da es für die späteren Untersuchungen des TDDS wichtig war, auch die Konzentration der Partikelsuspensionen zu kennen, wurde hierfür die *Nanoparticle Tracking* Analyse (NTA) eingesetzt (Abbildung 26). Dabei werden die Partikel in einer wässrigen Lösung mit einem Laser bestrahlt. Die Partikel streuen das Licht, das von einem Mikroskop über eine Kamera aufgenommen werden kann. Die Partikel können individuell verfolgt und über das Programm NanoSight2.3 visualisiert werden. Kleine Partikel bewegen sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung schneller. Große Partikel bewegen sich langsamer und weisen eine größere Streuung des eingestrahlten Lichts auf.

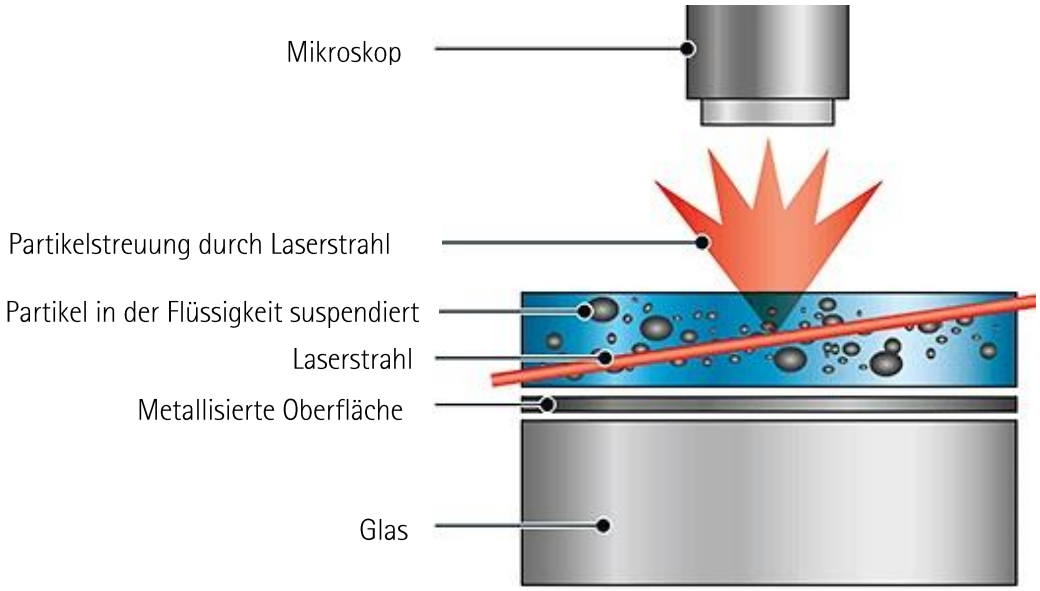

Abbildung 26: Schematische Darstellung der NTA Messung nach [105].

Mit Hilfe der NTA Messung kann sowohl die Konzentration der Partikel ermittelt werden, als auch der hydrodynamische Durchmesser bestimmt werden, ähnlich der DLS-Messung. Der Hauptunterschied von NTA und DLS Messung ist, dass die NTA Technik auf der Nachverfolgung einzelner Partikel basiert, während bei der DLS Messung alle Partikel vermessen werden und größere Partikel auch in geringen Mengen stärker ins Gewicht fallen als kleinere [106]. Dies liegt an der, bei der dynamischen Lichtstreuung gemessenen, Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität. Kleinere Partikel rufen eine schnellere Schwankung dieser Streulichtintensität hervor als größere Partikel. Dies hängt mit der Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel zusammen. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist auf die Brown'sche Molekularbewegung zurückzuführen. Kleinere Partikel bewegen sich in einer Suspension schneller als größere. Das liegt daran, dass die Moleküle des Suspensionsmediums ihre kinetische Energie auf die Partikel übertragen. Größere Partikel werden durch die gleiche Übertragung der Energie langsamer bewegt als kleinere. Bei einer langsameren Diffusionsgeschwindigkeit wird also eine wenig veränderte Streulichtintensität gemessen als bei einer schnelleren Diffusionsgeschwindigkeit [96].

Für polydisperse Proben ist das NTA im Allgemeinen, aufgrund der direkten Messung einzelner Partikel, besser geeignet. Das DLS misst alle Partikel zur selben Zeit und bildet einen Mittelwert der Partikelgröße, indem die größeren Partikel deutlich mehr ins Gewicht fallen als kleinere. Das geschieht beim NTA nicht. Für monodisperse Lösungen eignet sich demnach das DLS besser. Denn in einer polydispersen Lösung geben größere Partikel, auch bei geringerer Anzahl, ein höheres Signal, was die DLS Messung verfälschen würde.

Weiterhin wird beim DLS der Brechungsindex der eingesetzten Materialien benötigt, was bei einem Gemisch zu Schwierigkeiten führt [107].
Eine quantitative Aussage über die Partikelkonzentration lässt sich bei der DLS Messung nicht machen, weshalb dafür in der vorliegenden Arbeit die NTA Messung verwendet wurde.
Im Rahmen der Bachelorarbeit von Lena Harmening[3] wurde untersucht, inwiefern sich die Messungen des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel bei NTA und DLS Messung unterscheiden. Dabei stellte sich heraus, dass sich für die Polymerpartikel beide Arten der Größenbestimmung gut eigneten. Mittels DLS Messung konnten aber reproduzierbare Ergebnisse erzeugt werden. Da im NTA die Partikel direkt verfolgt werden, entscheidet eine zufällige Verteilung der Software (NanoSight 2.3), ob große oder kleine Partikel detektiert werden. Wie bereits erwähnt, wird beim DLS der Mittelwert der Messungen gebildet, was deutlich repräsentativer für die Größendarstellung ist. Zur Größenbestimmung wurde also im weiteren Verlauf der Arbeit die DLS Messung und für die Konzentrationsbestimmung die NTA Messung angewendet.
Dabei ergab sich für die Nanopartikel eine Konzentration von $11{,}83 \times 10^8$ Partikel/mL, was 1,96 nM entspricht. Da die Partikelkonzentration relativ niedrig ist, wurde die Suspension anschließend mittels SpeedVac-Vakuumkonzentrator aufkonzentriert. Daraus ergaben sich Werte von etwa 4,2 nM für die Nanopartikel.
Eine andere Möglichkeit zur Erhöhung der Partikelkonzentration war, die Menge der eingesetzten Polymere zu erhöhen. Eine Erhöhung der Menge des mPEG-PCLs um den Faktor 10 und analog dazu des HOOC-PEG-PCLs ergab auch eine um den Faktor 10 erhöhte Konzentration der Partikel. Somit wurde eine finale Partikelkonzentration von 42 nM bestimmt. Die Partikelgröße lag hier jedoch im Schnitt bei etwa 170 nm und lag somit über der gewünschten Größe von maximal 150 nm. Somit wurde diese Methode der Konzentrationserhöhung verworfen. Sollte das entwickelte TDDS in großem Maßstab produziert werden, sollte die Konzentration der Partikel/ mL jedoch unbedingt weiter erhöht werden.

Die Morphologie der Partikel wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) charakterisiert. Da es sich bei den für die Partikel verwendeten Polymeren um organische Polymere handelt, war die Charakterisierung mittels TEM sehr schwierig. Die Messung findet in einem Hochvakuum statt, um eine Streuung des Elektronenstrahls in die Gasphase zu verhindern. Dies und der auf die Partikel gelenkte Elektronenstrahl sorgt vermutlich für ein Schrumpfen der Partikel bzw.

[3] Untersuchung der Einkapselungseffizienz von Polycaprolactonpartikeln; 2017

Schmelzen der Polymere, da es sich um organisches Material handelt. Dennoch war es möglich, die Morphologie der Partikel in Ansätzen zu charakterisieren, wie in Abbildung 27 zu erkennen ist.

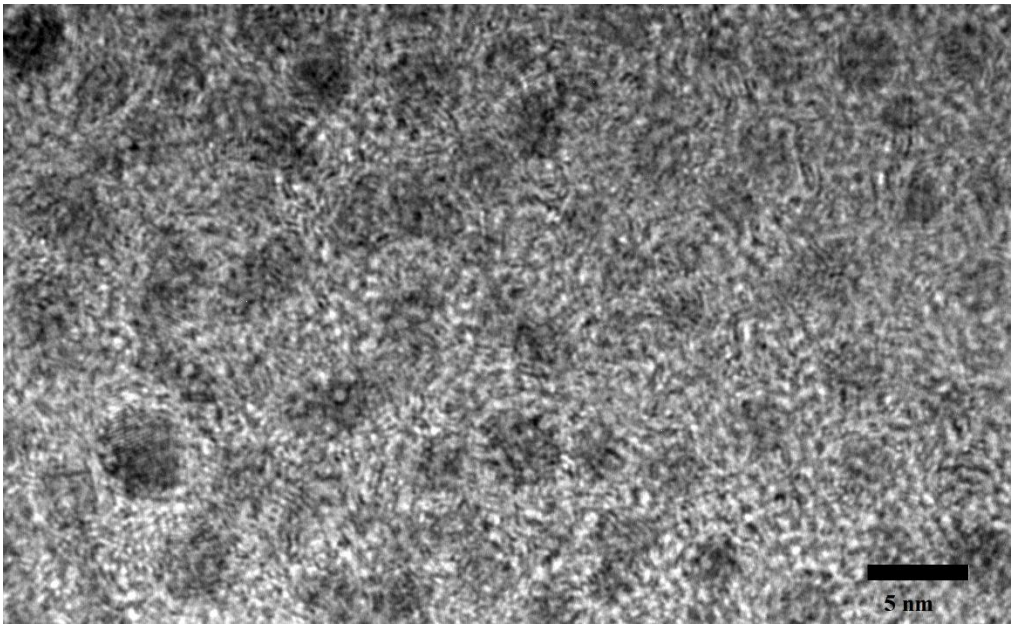

Abbildung 27: TEM Analyse der Nanopartikel.

Die Partikel weisen eine runde Form auf. Die geringe Größe von etwa 3 nm könnte durch die Trocknung der Proben vor der Messung und das verwendete Hochvakuum zu erklären sein. Das bedingt das Schrumpfen der Partikel. Diese Beobachtung wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gemacht [108, 109]. Mit Hilfe des NTA lässt sich ebenfalls die Partikelform betrachten. Abbildung 28 zeigt, dass auch hier die Partikel eine runde Form aufweisen. Eine runde Form sorgt dafür, dass die Aptamere, die nach der Partikelsynthese an der Oberfläche funktionalisiert werden sollen, gleichmäßig auf den Partikeln verteilt werden. Die Partikelherstellung kann hier also als erfolgreich betrachtet werden.

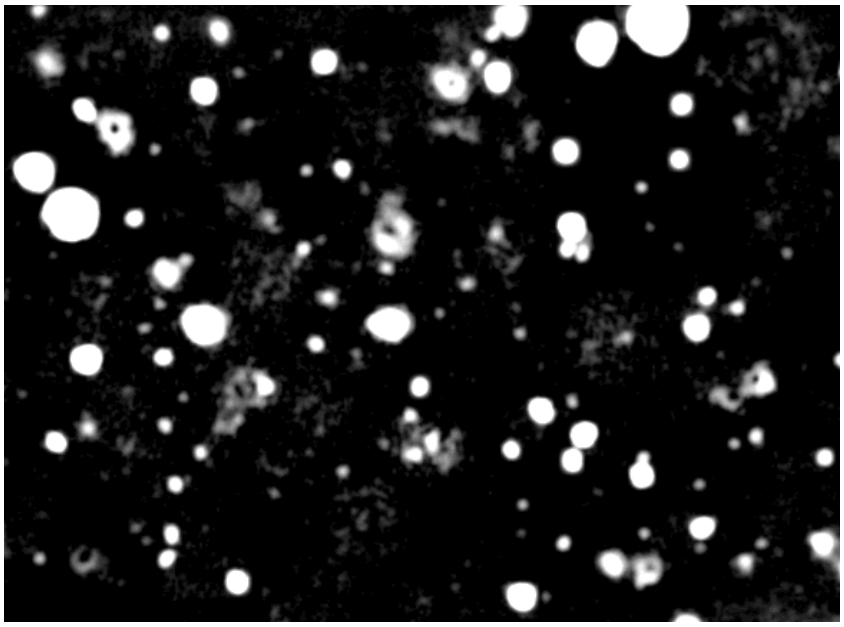

Abbildung 28: NTA Aufnahme der Partikel.

Abschließend wurde das Zeta-Potential der Nanopartikel bestimmt. Das Zeta-Potential wird ausgebildet, wenn eine feste Oberfläche mit einer wässrigen Lösung in Kontakt kommt. Dadurch bildet sich eine elektrische Ladung an der Grenzfläche aus. Diese Oberflächenladung beeinflusst die Ionen in der Nachbarschaft und bildet die sogenannte elektrische Doppelladungsschicht [110]. Nanopartikel mit einem Zeta-Potential zwischen -10 und +10 mV gelten als neutral, während Partikel mit einem Zeta Potential größer als +30 mV oder kleiner als -30 mV als stark kationisch oder anionisch gelten [111].

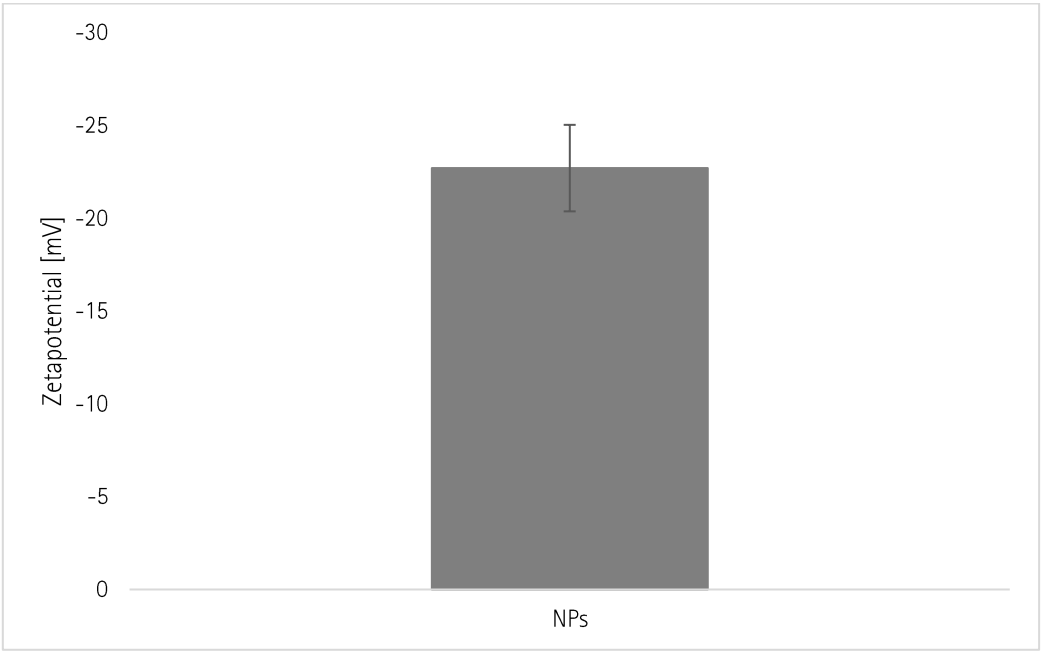

Abbildung 29: Zetapotential der Nanopartikel (NPs).

Wie in Abbildung 29 zu sehen, beträgt das Zetapotential der Nanopartikel etwa -20 mV. Die Partikel haben also einen anionischen Charakter. Andere Arbeitsgruppen haben vergleichbare Werte mit Polymer-Nanopartikeln [97]. Nach [28] und [29] werden neutrale oder anionische Partikel über die Nieren in den Organismus aufgenommen, weshalb das negative Zetapotential der Partikel von Vorteil ist. Laut [112] ist die Aufnahme von negativ oder positiv geladenen Nanopartikeln abhängig von dem jeweiligen Zellverband.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Nanopartikel erfolgreich als Trägersystem für das zu entwickelnde TDDS hergestellt wurden und deren Herstellung optimiert werden konnte. Nach Anpassung der Dauer der Ultraschallhomogenisation wurde auch die Rührdauer und Rührgeschwindigkeit optimiert. Die Rührdauer betrug nach der Optimierung 3 h und die Rührgeschwindigkeit zunächst 750 rpm (1 h) und später 350 rpm (2 h). Nach Abschluss der Optimierung betrug die durchschnittliche Größe der Nanopartikel etwa 80 nm. Die Partikelkonzentration betrug 4,2 nM. Die Partikel besitzen eine runde Form und haben einen anionischen Charakter. Im folgenden Teilkapitel wurde untersucht, ob die Partikel über einen längeren Zeitraum lagerstabil sind.

4.1.3 Lagerstabilität der Partikel

Zur Untersuchung der Lagerstabilität der Nanopartikel wurden diese über einen Zeitraum von vier Wochen bei 4 °C in Wasser gelagert und anschließend mit Hilfe der DLS Messung untersucht. Laut Harush und Kollegen gibt ein Gleichbleiben der Größe der Partikel einen Hinweis darauf, dass die Partikel stabil sind [113]. Zum Vergleich wurden die Nanopartikel direkt nach der Herstellung mittels DLS Messung untersucht und anschließend für vier Wochen gelagert. Nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der DLS Messung der Partikel nach Herstellung und nach vier Wochen Lagerung.

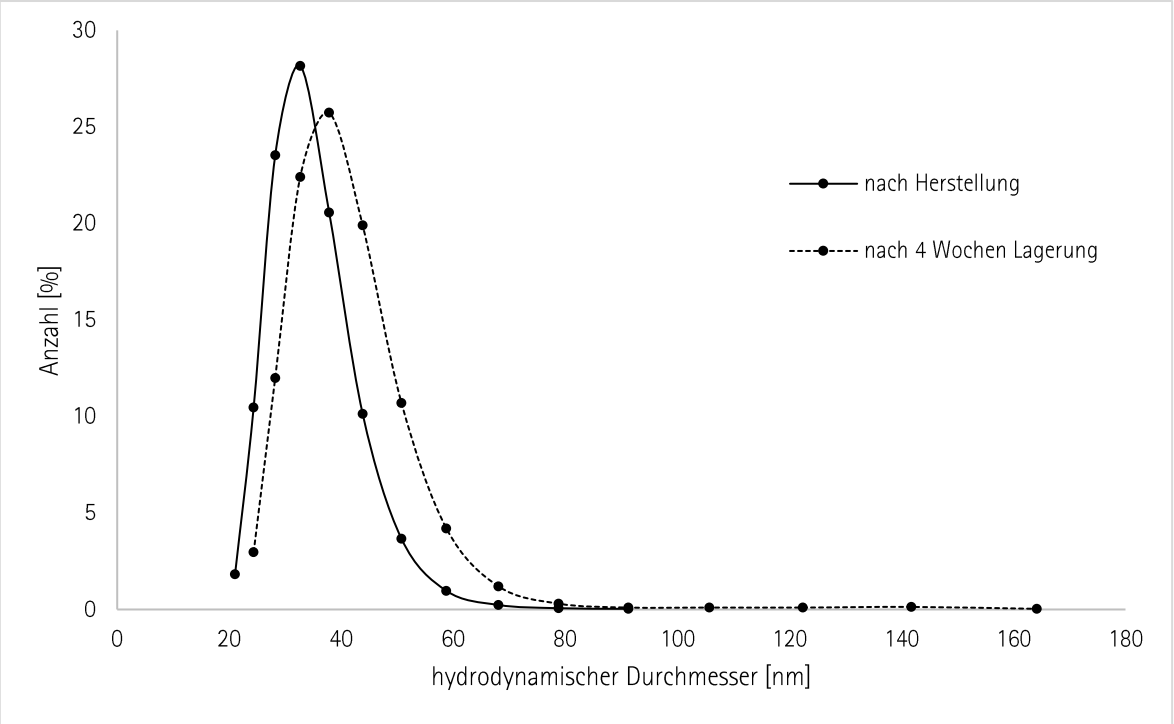

Abbildung 30: Ergebnisse der DLS Messung der Nanopartikel direkt nach der Herstellung und nach vier Wochen Lagerung bei 4 °C in Wasser.

Die Abbildung zeigt, dass es kaum eine Veränderung der Größenverteilung der Partikel gibt. Direkt nach der Herstellung weist die Mehrheit der Partikel eine Größe von etwa 30 nm auf. Nach vier Wochen Lagerung hat die Mehrheit der Partikel etwa eine Größe von 40 nm. Die Partikel sind nach vier Wochen Lagerung somit 10 nm größer, allerdings im Mittel immer noch ausreichend klein, um für das TDDS zum Einsatz kommen zu können. Es bilden sich jedoch nach Lagerung einige Aggregate mit höherem Durchmesser (100 nm – 160 nm) aus. Vor dem Einsatz der gelagerten Probe, sollte die Partikellösung noch einmal durchmischt werden.

Bei der Größenabweichung von 10 nm zwischen beiden Partikellösungen kann davon ausgegangen werden, dass die Partikel in Wasser bei 4 °C stabil sind.

4.1.4 Funktionalisierung der Partikel

Polymer-Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nanopartikel mit Aptameren funktionalisiert. Aptamere sorgen für die spezifische Bindung an Krebszellen, was der Anreicherung des Wirkstoffes in den Zielzellen dient. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Aptamere sind DNA-Aptamere. Der Vorteil gegenüber RNA-Aptameren ist ihre höhere Stabilität aufgrund der fehlenden 2'-OH Gruppe. Dies sorgt dafür, dass DNA-Aptamere nicht hydrolysiert werden können und in biologischer Umgebung stabil sind [77]. Für das entwickelte *Drug Delivery* System kam das S15 Aptamer zum Einsatz. Als

spezifischer Ligand sorgt es für die spezifische Bindung an die Zielzellen. Das verwendete Aptamer S15 ist gegen die Lungenkrebszelllinie A549 gerichtet, das genaue Target jedoch ist unbekannt. Als Kontrolle diente eine randomisierte Oligonukleotidsequenz, die nicht an die A549 Zellen bindet. Es handelte sich hierbei um eine Zufallssequenz gleicher Länge und mit der gleichen Anzahl an GC-reichen Regionen wie beim verwendeten S15 Aptamer. Die Sequenzen dazu finden sich im Abschnitt 6.1.5.

Der Mechanismus der Immobilisierung ist bei Aptamer und randomisierter Sequenz identisch. Beide, S15 und randomisierte Sequenz, besitzen einen terminalen Aminolinker. Auf der Partikeloberfläche befinden sich die Carboxylgruppen des HOOC-PEG-PCLs. Diese müssen zunächst aktiviert werden, was mit Hilfe des 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) geschieht. Es entsteht eine stabile Amidbindung zwischen Aptamer oder randomisierter Sequenz und dem Nanopartikel (Abbildung *31*).

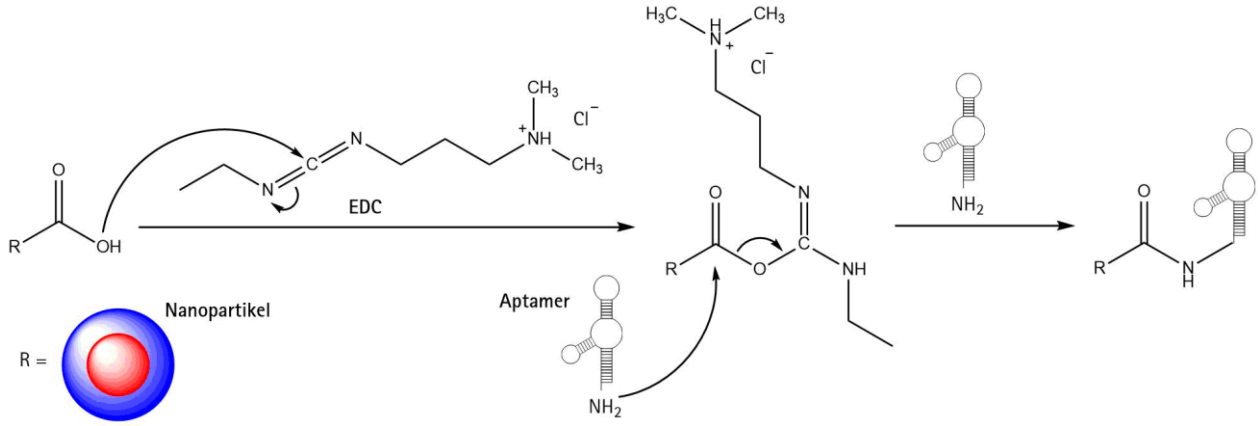

Abbildung 31: Mechanismus der Funktionalisierung der Partikel mit dem Aptamer sowie der randomisierten Sequenz. Die Abbildung stammt aus der Masterarbeit von Torsten Schüling[4].

Für die Immobilisierung wurde zunächst ein molares Verhältnis von Nanopartikel zu Aptamer zu EDC von 1:25:1900 gewählt. Die Menge an EDC wurde aus den am Institut für Technische Chemie von Jonczyk und Ulusoy entwickelten Protokollen übernommen [114, 115]. Im ersten Schritt der Immobilisierung wird bei einem pH von 7,4 das EDC aktiviert. EDC dient als Crosslinker und verbindet sich mit der Carboxylgruppe der HOOC-PEG-PCL-Einheit der Nanopartikel. Das Intermediat reagiert anschließend mit der Aminogruppe des Aptamers. Um die Reaktion des EDCs zu stoppen, wird der pH-Wert der Reaktionslösung mit Hilfe eines 50 mM Natriumboratpuffers auf 8,3 erhöht. Hierbei werden die aktiven Gruppen des EDCs blockiert. Anschließend wird die Nanopartikel-Aptamer-Suspension acht Mal über die Membran eines Zentrifugalkonzentrators (MWCO: 100 kDa) gewaschen, wodurch noch freies Aptamer und Nebenprodukte vollständig entfernt werden sollen.

[4] Untersuchungen zum Zell-Targeting und zur zellulären Aufnahme von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln; 2017

Die aufgereinigten Konjugate werden auf einem Agarosegel aufgetragen und somit der Erfolg der Immobilisierung überprüft (Abbildung 32). Dabei werden die Banden im Gel mit Hilfe des Farbstoffes Roti® GelStain sichtbar gemacht.

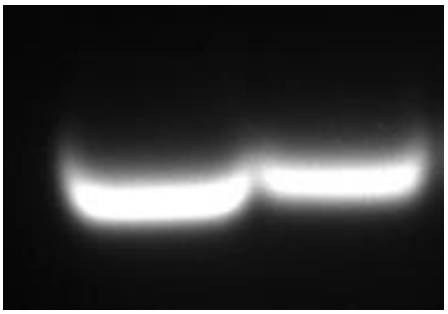

Abbildung 32: Mit S15 immobilisierte mPEG-PCL Nanopartikel. Links: S15; Rechts: S15-NP-Konjugat (mPEG-PCL Nanopartikel).

Bei der Kopplung der Nanopartikel mit dem Aptamer wird der Durchmesser der Partikel größer, wodurch sie im Agarosegel stärker zurückgehalten werden als das reine Aptamer. Allerdings tragen die Partikel durch die Kopplung mit dem negativ geladenen Aptamer eine noch stärker negative Ladung, was dazu führt, dass sie schneller durch das Gel wandern. Daher ist der Shift zwischen den Partikeln mit und ohne gebundenes Aptamer nicht deutlich feststellbar. Wird also ausschließlich das Gel betrachtet, so lässt sich keine 100 %ige Aussage darüber treffen, ob die Aptamere erfolgreich an die Partikel immobilisiert wurden. Daher wurden als weitere Messungen sowohl die DLS als auch die Zeta-Potenzial Messung herangezogen.

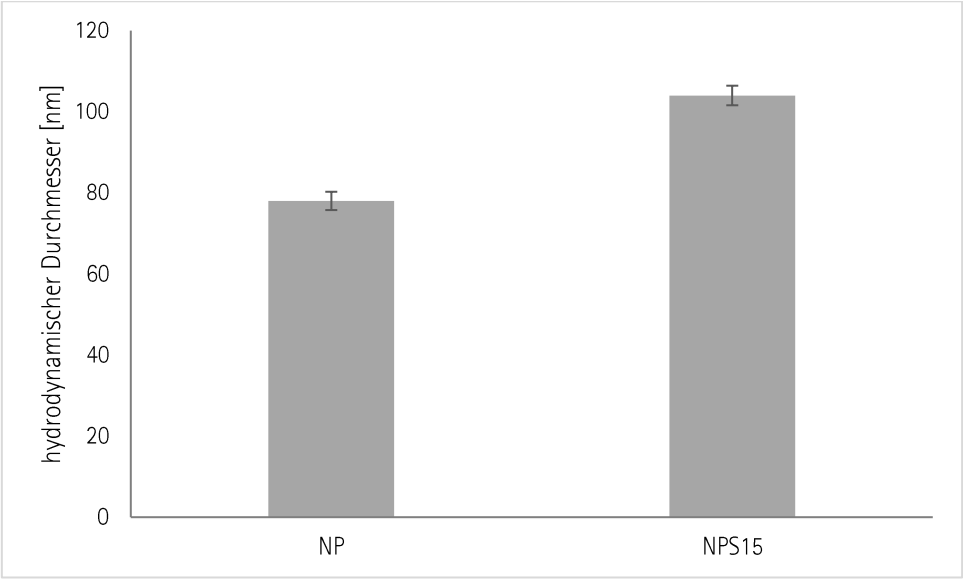

Abbildung 33: Hydrodynamischer Durchmesser von gekoppelten und ungekoppelten mPEG-PCL Partikeln. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung in Dreifachbestimmung.

Abbildung 33 zeigt, dass mit Aptameren funktionalisierte Nanopartikel einen größeren hydrodynamischen Durchmesser (105 nm) besitzen als unmodifizierte Nanopartikel (etwa 80 nm). Da bei der DLS Messung der hydrodynamische Durchmesser und nicht der reale Durchmesser der

Partikel bestimmt wird, kann ein möglicher Grund dafür sein, dass die Partikel mit immobilisierten Aptameren, eine größere Hydrathülle bilden. Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass das verwendete Aptamer eine Sequenzlänge von 85 Nukleotiden hat, wobei 1 Nukleotid eine Größe von etwa 0,43 nm besitzt. Somit sind die Partikel mit immobilisiertem Aptamer größer. Da es diese Differenz im hydrodynamischen Durchmesser gibt, ist dies als weiterer Beweis für eine erfolgreiche Immobilisierung anzusehen. Um diese Vermutung jedoch untermauern zu können, wurde als weitere Charakterisierung des Erfolgs der Immobilisierung die Zeta-Potenzial Messung durchgeführt (Abbildung 34).

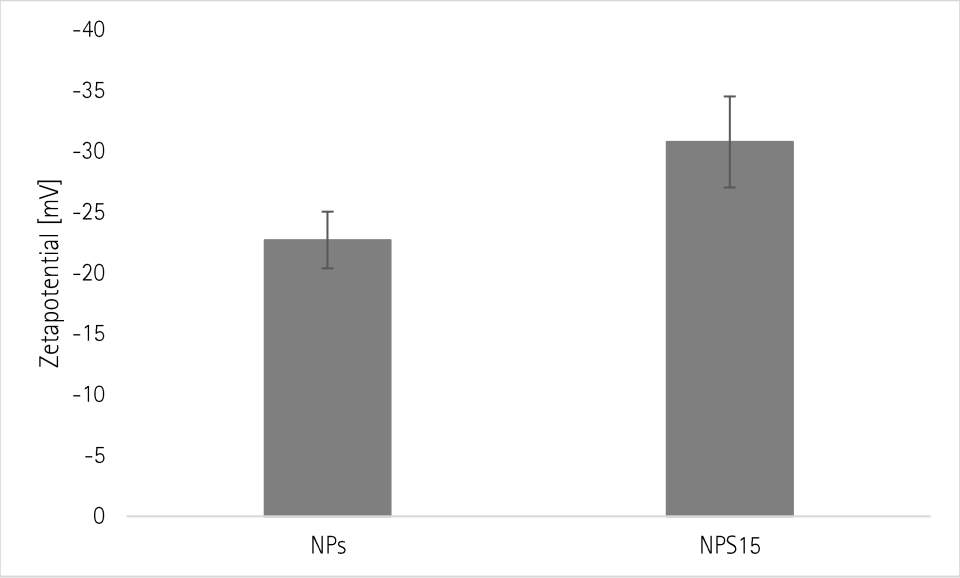

Abbildung 34: Zeta-Potential der Nanopartikel und der funktionalisierten Nanopartikel.

Abbildung 34 zeigt, dass die Partikel, auf deren Oberfläche Aptamere immobilisiert wurden, ein stärker negatives Zeta-Potential haben, als Partikel ohne entsprechende Funktionalisierung. Dies deutet auf die erfolgreiche Immobilisierung hin. Bei Aptameren handelt es sich, wie erwähnt, um einzelsträngige DNA oder RNA. Dementsprechend weisen sie eine negative Ladung auf und führen auf dem Partikel zu einem stärker negativen Zeta-Potential. Da durch das achtmalige Waschen überschüssige Aptamere aus der Nanopartikellösung entfernt wurden, ist davon auszugehen, dass es sich um funktionalisierte Partikel mit einem Zeta-Potential von etwa -32 mV handelt.

Laut Mohanraj und Kollegen sind Nanopartikel mit einem Zetapotential über +/- 30 mV in einer Suspension stabil. In einer Suspension, in der ein hohes Zetapotential vorliegt, sind die Abstoßungskräfte größer als die Anziehungskräfte zwischen den Partikeln, was zu einem stabilen System führt. Eine Aggregation der Partikel bleibt somit aus [116, 117]. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die funktionalisierten Nanopartikel stabil sind.

Aufgrund ihrer negativen Ladung werden die Partikel später, wenn sie *in vivo* zum Einsatz kommen, nicht durch die Nieren filtriert – und somit nicht wirkungslos ausgeschieden [4].

Quantum Dots

Da in der vorliegenden Arbeit die Experimente zur Bestimmung der Menge des immobilisierten Aptamers und zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der Partikel über Endozytose (Kapitel 4.2.4) mit Quantum Dots (QD) durchgeführt wurden, wird im Folgenden auch die Immobilisierung mit den QDs beschrieben (Abbildung 31). Diese wurden aufgrund der im Vergleich zu den Polymerpartikeln besseren Detektierbarkeit eingesetzt. Die Kopplung der QDs ist identisch zu der Kopplung der Aptamere an die Partikel. Auch die QDs besitzen HOOC- Gruppen auf ihrer Oberfläche, die erst durch das EDC aktiviert werden müssen, bevor die Bindung der Aptamere stattfinden kann. Eine erfolgreiche Immobilisierung kann auch hier mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft werden. Die QDs mit immobilisiertem Aptamer sind größer als die ungekoppelten QDs (Abbildung 35). Sie wandern daher weniger weit im Gel, da sie durch sterische Hinderungen im Gel zurückgehalten werden. Die Kopplung von Aptameren und QDs ist somit als erfolgreich anzusehen. Die unmodifizierten QDs sind kleiner als die Konjugate und wandern weiter im Gel. Es ist ein deutlicher Shift zu sehen. Im Vergleich zu Abbildung 32 ist der Shift zwischen unmodifizierten Nanopartikeln (QDs) und den Konjugaten in Abbildung 35 größer. Dies liegt an der Größe der QDs. Sie sind kleiner als die Polymernanopartikel und wandern somit weiter im Gel.

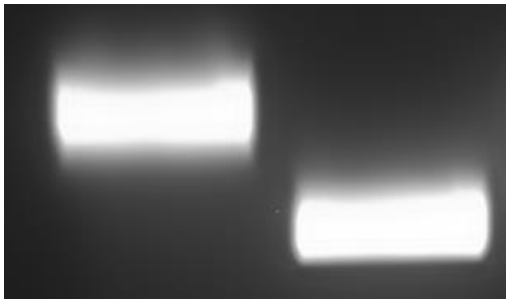

Abbildung 35: Gekoppelte QDs. Links: QDS15; Rechts: QDs.

Über die Immobilisierung der Aptamere an die QDs bzw. die hergestellten PEG-PCL Nanopartikel lassen sich bislang nur qualitative Aussagen treffen. Für die Experimente zur zellulären Aufnahme des TDDS ist es jedoch wichtig, auch quantitative Aussagen über die Immobilisierung treffen zu können. Je höher die Dichte an immobilisiertem Aptamer auf der Partikeloberfläche ist, desto besser werden die Partikel über Rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Eine zu große Dichte an Aptameren auf der Partikeloberfläche jedoch kann zu einem Aktivitätsverlust führen, da die Faltung der Aptamere sterisch gehindert wird [118–120].

Im folgenden Unterkapitel werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Immobilisierungseffizienz dargestellt. Diese sind im Rahmen der Masterarbeit von Torsten Schüling[5] entwickelt und optimiert worden.

4.1.4.1 Bestimmung der Menge des immobilisierten Aptamers

Messung der Optischen Dichte zur Bestimmung der Menge des immobilisierten Aptamers

Die Bestimmung der Menge des immobilisierten Aptamers ist wichtig für die Berechnung des Verhältnisses von Aptamer zu Partikel. Wie im vorangegangenen Absatz erläutert, kann eine zu hohe Dichte an Aptameren auf der Oberfläche von Partikeln dafür sorgen, dass eine korrekte Faltung aus sterischen Gründen verhindert wird und die Aptamere somit ihre Bindungseigenschaften einbüßen. Weiterhin muss aber eine ausreichend große Aptamerdichte auf der Partikeloberfläche vorhanden sein, damit eine möglichst effiziente, zelluläre Aufnahme der Partikel gewährleistet werden kann. Im Rahmen der Masterarbeit von Torsten Schüling[5] wurden zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Menge des immobilisierten Aptamers untersucht und verglichen. Die erste Methode beruhte dabei auf der spektrometrischen Messung der DNA. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Aptamere lag auf der Bindung an einen Fluoreszenzfarbstoff.

Die Immobilisierung der Aptamere auf den Partikeln erfolgte, wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert. Da sich beim achtmaligen Waschen der Partikel-Aptamer-Konjugationsansätze ungebundenes Aptamer in den Durchläufen sammelt, wurden diese gesammelt, vereinigt und getrocknet. Über die Differenz zur ursprünglich eingesetzten Menge kann so berechnet werden, welche Menge Aptamer auf den Partikeln immobilisiert wurde.

Zunächst musste allerdings überprüft werden, ob ungebundenes Aptamer an die Membran des verwendeten Zentrifugalkonzentrators (MWCO: 100 kDa), über die die Reaktionslösung gewaschen wurde, bindet. Dazu wurde reine Aptamerlösung, deren Konzentration spektrometrisch vermessen wurde, auf die Membran gegeben und acht Mal gewaschen, die Durchläufe vereinigt, getrocknet und mit Hilfe eines Agarosegels die Menge an Aptamer in den Durchläufen charakterisiert. Anschließend kann diese mit der ursprünglich eingesetzten Menge verglichen werden. Nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis der gemessenen Aptamerkonzentrationen in den beiden Lösungen.

[5] Untersuchungen zum Zell-Targeting und zur zellulären Aufnahme von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln; 2017

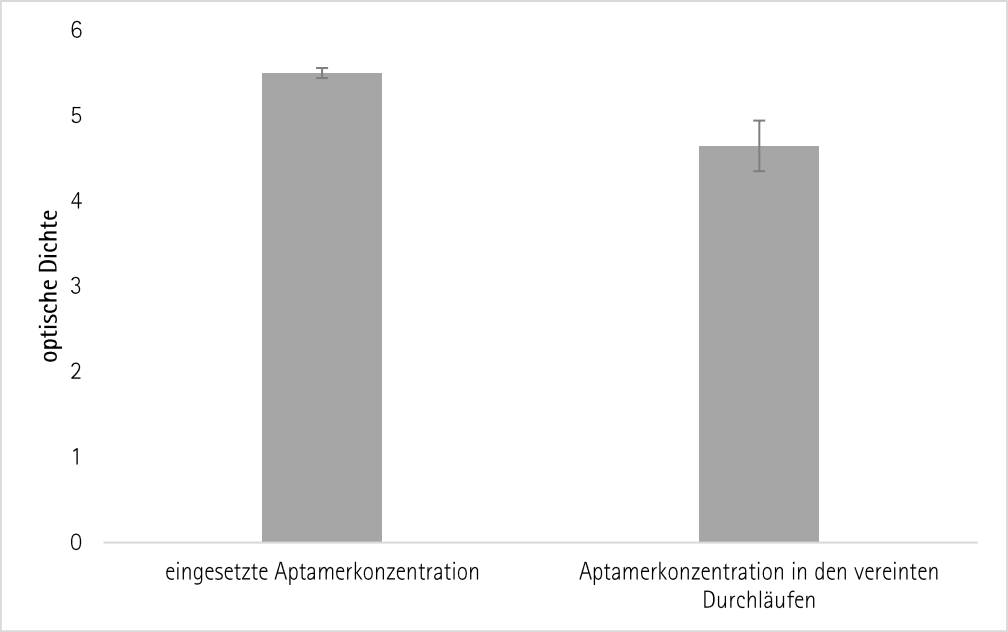

Abbildung 36: Optische Dichte (260 nm) der Aptamerlösungen vor und nach dem Aufkonzentrieren mittels Zentrifugation.

Die optische Dichte der ursprünglich eingesetzten Menge an Aptamer betrug 5,47. Die Durchläufe wiesen eine optische Dichte von 4,83 auf. Somit bleiben etwa 10 % der Aptamere auf der Membran. Dies macht eine genaue Bestimmung der Menge des immobilisierten Aptamers schwierig, weshalb andere Methoden zur Charakterisierung untersucht werden mussten.

Eine weitere Methode, bei der auch die optische Dichte charakterisiert wird, ist die Quantifizierung über eine spektrometrische Messung des DNA Gehaltes (also des Aptamer Gehaltes) in den Reaktionslösungen. Es wurden drei Ansätze vermessen; darunter ein Ansatz mit Aptameren und EDC. Ein weiterer Ansatz enthielt Nanopartikel, die mit Aptamer über EDC gekoppelt wurden. Es wurde der DNA Gehalt in den Durchläufen der achtmaligen Waschschritte, die anschließend vereinigt, getrocknet und in einem definierten Volumen gereinigtem Wasser aufgenommen wurden, bestimmt. Der dritte Ansatz diente als Kontrolle und enthielt nur reines Aptamer. Nachfolgende Abbildung stellt die Ergebnisse der spektrometrischen Charakterisierung dar.

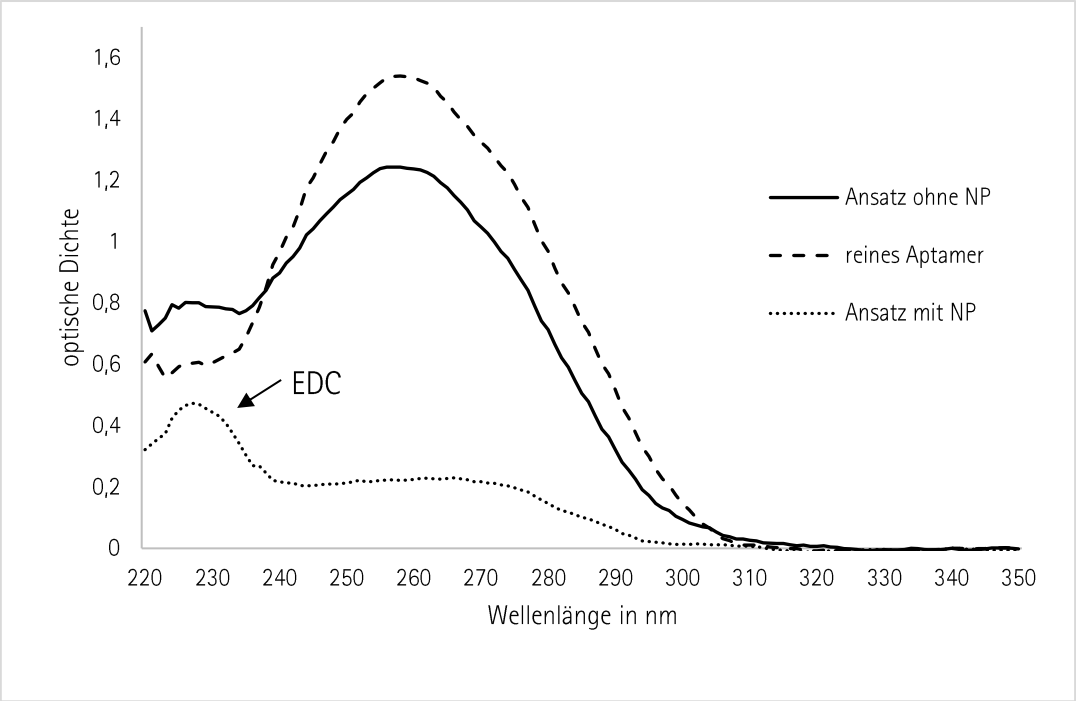

Abbildung 37: Absorptionsspektren einer Kopplung der NP mit dem Aptamer (gepunktete Linie); dem reinen Aptamer (gestrichelte Linie) und einem Kopplungsansatz ohne Nanopartikel (durchgezogene Linie).

Abbildung 37 zeigt drei verschiedene Absorptionsspektren. Das reine Aptamer besitzt sein Maximum bei 260 nm mit einer optischen Dichte von 1,534. Im Vergleich dazu hat die Kontrolle (vereinigte Durchläufe nach achtmaligem Waschen; ohne Nanopartikel) ein Maximum von 1,253. Dies entspricht etwa 82 % der ehemals eingesetzten Aptamermenge. Dieses Ergebnis stimmt mit dem aus (Abbildung 36) überein. Dies bedeutet im Umkehrschluss jedoch auch, dass etwa 18 % des Aptamers während der Reaktion oder der Aufarbeitung während der Kopplung verloren geht. Ein Beispiel hierfür könnte das Binden der Aptamere an die Membranen der Zentrifugalkonzentratoren sein.
Das dritte gezeigte Absorptionsspektrum gehört zu den vereinigten Durchläufen der Kopplung von Aptameren an die Nanopartikel. Dort liegt die optische Dichte bei etwa 0,23. Es konnten 85,5 % der Aptamere auf den Nanopartikeln immobilisiert werden, da sich in den vereinigten Durchläufen noch 14,5 % des ursprünglich eingesetzten Aptamers befanden. Allerdings liegt das Maximum dieses Spektrums bei 230 nm. Da das verwendete EDC bei einer Wellenlänge von 230 nm absorbiert, ist davon auszugehen, dass das Ergebnis der photometrischen Messung bei 260 nm beeinflusst wird. Wird die DNA Reinheit (Verhältnis der optischen Dichte bei 260/230 nm) des beschriebenen Ansatzes und des Kontrollansatzes ohne Nanopartikel berechnet, liegen diese Werte bei 0,5 für den Ansatz mit NPs und bei 1,6 für den Ansatz ohne NPs. Reine DNA ohne Verunreinigungen besitzt ein Verhältnis von 2-2,2 [121]. Die Quantifizierung der DNA mittels Spektrometer ist also nur möglich, wenn die Proben frei von Verunreinigungen sind [122]. Dazu müssen störende Komponenten, wie das EDC, in einem weiteren Schritt abgetrennt werden. Dies könnte beispielsweise durch eine DNA Fällung

erreicht werden. Anschließend könnte das Aptamer durch Zentrifugation von dem EDC getrennt werden. Eine Fällung wäre beispielsweise mit Ethanol denkbar [123]. Dies wurde im Experiment überprüft. Dazu wurden zwei identische Kopplungsansätze mit je verschiedenen Nanopartikelsuspensionen durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Nanopartikel. Die Durchläufe der Waschschritte wurden wiedervereinigt, getrocknet und anschließend in Natriumboratpuffer resuspendiert. Dann wurden die Lösungen mit Ethanol und NaCl-Lösung versetzt. Die drei Ansätze wurden anschließen über Nacht bei -80 °C gelagert, um die Löslichkeit des Aptamers weiter zu senken. Nachdem die Lösungen zentrifugiert und getrocknet wurden, wurden die Pellets jeweils in Wasser gelöst und die Aptamerkonzentration spektrometrisch bestimmt. Nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der spektrometrischen Charakterisierung.

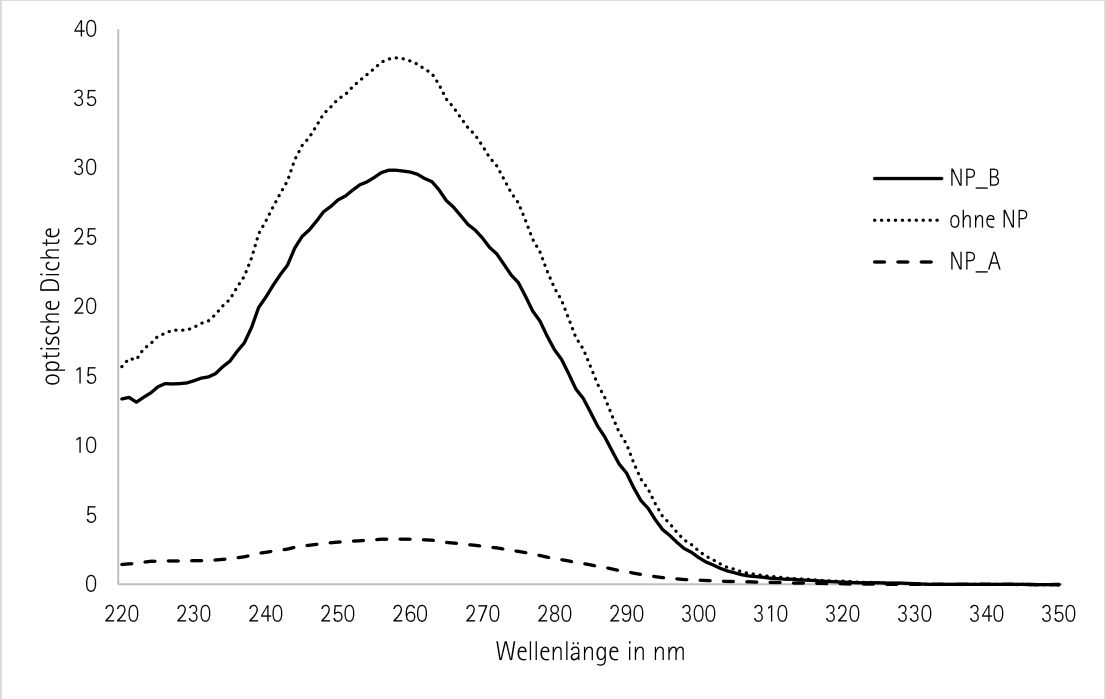

Abbildung 38: Absorptionsspektren der Durchläufe der beiden Kopplungen zwischen Nanopartikeln und Aptamer (durchgezogene und gestrichelte Linie) und der Kontrolle ohne NPs (gepunktete Linie).

Bei dem Verlauf des Absorptionsspektrums der Nanopartikel mit gekoppeltem Aptamer ist die störende Absorption des EDC bei 230 nm nicht mehr zu erkennen (vgl. Abbildung 37). Dies lässt darauf schließen, dass das EDC erfolgreich vom Aptamer getrennt werden konnte. Die optische Dichte des NP_A Kopplungsansatzes liegt bei 3.24 und somit knapp 90 % unter dem Wert der optischen Dichte der Kontrolle. Der Wert der optischen Dichte für den NP_B Ansatz liegt mit 29.71 deutlich höher als der Wert des NP_A Kopplungsansatzes. Da beide Kopplungsansätze eine so große Differenz der optischen Dichte aufweisen, ist davon auszugehen, dass die Ethanolfällung erhebliche Fehlerquellen birgt. Somit musste nach einer alternativen Methode zur Bestimmung der Menge des

immobilisierten Aptamers gesucht werden. Im Folgenden wurde dies über die Bindung des Aptamers an einen Fluoreszenzfarbstoff experimentell untersucht.

Gelelektrophoretische Ermittlung der Menge des immobilisierten Aptamers

Die Menge der immobilisierten Aptamere auf den Partikeln wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese bestimmt [124]. Zur Kopplung wurden sowohl QDs als auch PEG-PCL Nanopartikel (NP_B; vgl. Abbildung 38) verwendet. Zunächst wurde eine Kalibrationsreihe des Aptamers im Bereich von 20 µM bis 0,625 µM aufgenommen. Die entsprechende Menge Aptamer wurde in deionisiertem Wasser gelöst. Gleichzeitig wurden die Durchläufe, die während der Kopplung der Aptamere an die QDs und PEG-PCL Nanopartikel durch achtmaliges Waschen entstehen gesammelt, getrocknet und ebenfalls in deionisiertem Wasser gelöst. Das Agarosegel wurde mit dem Farbstoff Roti® GelStain gefärbt, welcher mit der DNA interkaliert und somit mit Hilfe von UV Licht im Gel sichtbar gemacht werden kann. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und mittels der Software ImageJ ausgewertet. Mit Hilfe des Programms kann über die Intensität der Gelbanden die Aptamer-Konzentration in den gesammelten Durchflüssen ermittelt werden und von der ursprünglich eingesetzten Aptamermenge abgezogen werden (Abbildung 39). Mit Hilfe der Kalibration lässt sich somit eine quantitative Aussage darüber treffen, wie viel Aptamer auf der Partikeloberfläche immobilisiert werden konnte.

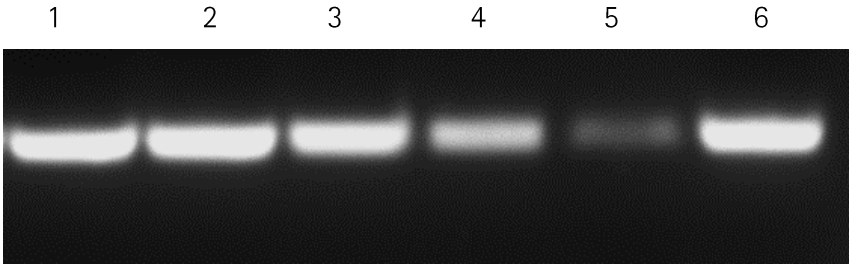

Abbildung 39: Kalibration des S15 Aptamers im Konzentrationsbereich von 10 µM bis 0,625 µM sowie den gekoppelten Nanopartikeln. 1: 10 µM, 2: 5 µM, 3: 2,5 µM, 4: 1,25 µM, 5: 0,625 µM, 6: S15 im Durchlauf.

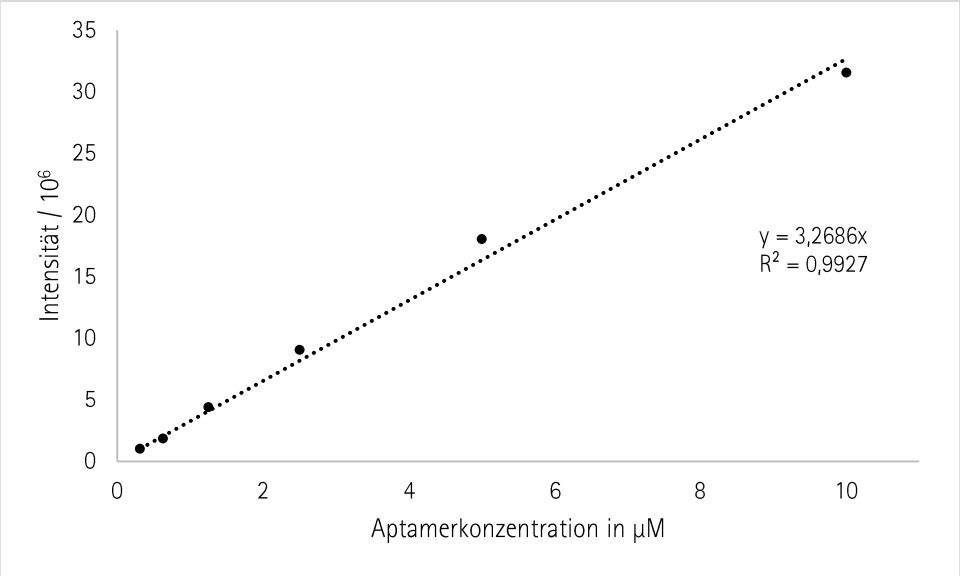

Abbildung 40: Kalibrationsgerade des S15 Aptamers im Bereich 0.625 µM bis 10 µM.

Abbildung 40 zeigt beispielhaft die Kalibrationsreihe das S15 Aptamers im Bereich von 0,625 µM bis 10 µM. Für die Kopplung wurden 15 µL des Aptamers (178 µM) mit Puffer auf 100 µL aufgefüllt. Anschließend wurde die Reaktion mit 400 µL Boratpuffer abgestoppt. Im Falle, dass keine Kopplung stattfand, liegt die maximale Aptamerkonzentration in der Lösung bei 5,5 µM.

Abbildung 39 zeigt die Kalibrationsreihe des Aptamers sowie die Probe des S15 Aptamers aus den Durchläufen (Bande 7). Aus der Rechnung mit Hilfe der ermittelten Geradengleichung können zunächst die Mengen des Aptamers [mol] unter Berücksichtigung der verwendeten Volumina berechnet werden. Anschließend kann die jeweilige Konzentration Aptamer [µM] in den Durchläufen angegeben werden. Nach Bildung der Differenz kann bestimmt werden, welche Menge des Aptamers auf den Partikeln immobilisiert werden konnte. Es konnten 25 Aptamere pro Quantum Dot und etwa 740 Aptamere pro Polymer-Nanopartikel immobilisiert werden. Dieser Unterschied liegt vor allem an der Größe der Quantum Dots und der Polymer-Nanopartikel. Die QDs sind etwa 5 nm groß und haben somit eine viel kleinere Oberfläche, so dass dort weniger Aptamere immobilisiert werden können. Die Polymer-Nanopartikel sind fast 20 Mal so groß und können daher auch deutlich mehr Aptamer auf ihrer Oberfläche binden. Nachfolgende Tabelle zeigt außerdem die prozentualen Verhältnisse der Mengen des immobilisierten Aptamers bei verschiedenen Partikellösungen.

Tabelle 5: Menge des immobilisierten Aptamers in den Kopplungsansätzen.

Partikelart	Menge des immobilisierten Aptamers [%]	Aptamer/Partikel
Quantum Dots	97	25
NP_B	92,23	740

Die Menge des immobilisierten Aptamers auf den Quantum Dots liegt bei 97 %. Auf Partikeln der Lösung NP_B konnten 92,23 % des eingesetzten Aptamers immobilisiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Charakterisierung der Menge des immobilisierten Aptamers auf den Nanopartikeln mit Hilfe spektrometrischer Methoden weniger gut funktioniert hat. Mit Hilfe der Bindung an einen Fluoreszenzfarbstoff und mittels der Agarosegelelektrophorese ließen sich verlässliche und reproduzierbare Aussagen darüber treffen, wie viele Aptamere auf den Partikeln immobilisiert wurden. So konnten 25 Aptamere pro Quantum Dot und etwa 740 Aptamere pro Polymer-Nanopartikel immobilisiert werden.

4.1.5 Einkapselung von Wirkstoffen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene hydrophobe Wirkstoffe in die Partikel eingekapselt. Dies waren Paclitaxel (PTX) und Camptothecin (CPT). Sowohl PTX als auch CPT werden für die Behandlung von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs eingesetzt. Die mit Wirkstoff beladenen Partikel sollten später an Zellen getestet werden und die Zytotoxizität mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt werden. Zunächst wurde PTX in die Partikel eingekapselt. PTX wird in der Chemotherapie bei nicht-kleinzelligen Lungenkrebsarten sowie in einigen DDS eingesetzt. PTX wurde zusammen mit den Polymeren in Dichlormethan gelöst und anschließend tropfenweise zur wässrigen Natriumcholatlösung zugegeben. Während der Partikelherstellung wurde nach jedem Schritt eine Probe aus der Lösung entnommen und nach Fertigstellung der Partikel zunächst mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) vermessen. Dabei wurde der Wirkstoff mit einem Diodenarraydetektor (DAD) detektiert.
Aufgrund seiner besseren Detektierbarkeit wurde auf den fluoreszierenden Wirkstoff Camptothecin zurückgegriffen. Die Einkapselung erfolgte analog zu PTX. Die Detektion des verkapselten Wirkstoffes erfolgte über das Fluorospektrophotometer.

Bestimmung der eingekapselten Wirkstoffmenge

Um bestimmen zu können, ob und wie viel Wirkstoff in die Partikel eingekapselt wurde, mussten diese zunächst hergestellt werden. Dafür wurde eine definierte Menge des Wirkstoffes während der Herstellung der Nanopartikel mit den Polymeren im organischen Lösemittel gelöst. Gemäß Danhier *et al.* [125] wurde die Menge des eingekapselten PTX zunächst mittels HPLC bestimmt. Dazu wurden die Partikel abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in DCM aufgenommen, um die Partikel aufzulösen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, um möglicherweise vorhandene Nanopartikelreste abzutrennen. Anschließend wurde der Überstand in der HPLC vermessen. So konnten Rückschlüsse darauf gezogen werden, wie viel des eingesetzten Wirkstoffes in die Partikel eingekapselt wurde.

Nach der Herstellung der Partikel konnten etwa 113,35 µM Wirkstoffkonzentration im Überstand nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass von den ursprünglich 1,17 mM etwa 90 % des Wirkstoffes in die Partikel eingekapselt wurden. Diese Werte finden sich auch in der Literatur wieder [126]. Bei einer Konzentration der Partikel von 4,6 nM, ist ein Partikel mit etwa 230 000 Molekülen Wirkstoff beladen.

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuungsmessung kann außerdem der hydrodynamische Durchmesser der Partikel mit eingekapseltem Wirkstoff bestimmt werden. Abbildung 41 zeigt, dass diese Partikel größer sind, als Partikel ohne eingekapselten Wirkstoff. Dies könnte somit ein Hinweis sein, dass Wirkstoff eingekapselt wurde. Diese Beobachtungen sind auch in der Literatur zu finden [127–129]. Hier wird die zunehmende Größe der Partikel damit erklärt, dass sich der Wirkstoff in die Polymermatrix bzw. den Kern der Partikel einlagert [128, 129].

Es muss weiterhin auf einen niedrigen PDI geachtet werden. Denn eine enge Größenverteilung, also mit niedrigem PDI, der Partikel mit eingekapseltem Wirkstoff kann auf eine gute Einkapselung hindeuten. Gute Einkapselung meint, dass die Wirkstoffe direkt in den Kern der Nanopartikel integriert und nicht in die Polymermatrix eingelagert sind. Ist der Wirkstoff nicht nur im Kern eingekapselt, sondern auch mit der Partikeloberfläche assoziiert sein, resultiert dies, obwohl eine vermeintlich hohe Wirkstoffmenge eingekapselt wurde, in einem hohen Polydispersitätsindex [97][127, 130]. Der PDI der PEG-PCL Partikeln mit eingekapseltem PTX betrug in der vorliegenden Arbeit etwa 0,35. Allerdings ist der PDI im Vergleich zu Partikeln ohne Wirkstoff höher, was darauf hindeuten kann, dass ein Teil des Wirkstoffes nicht im Kern eingekapselt, sondern mit der Oberfläche der Polymer-Partikel assoziiert ist. Im Folgenden wurde daher versucht, die Einkapselung zu optimieren. Dies geschah mit Hilfe von Camptothecin.

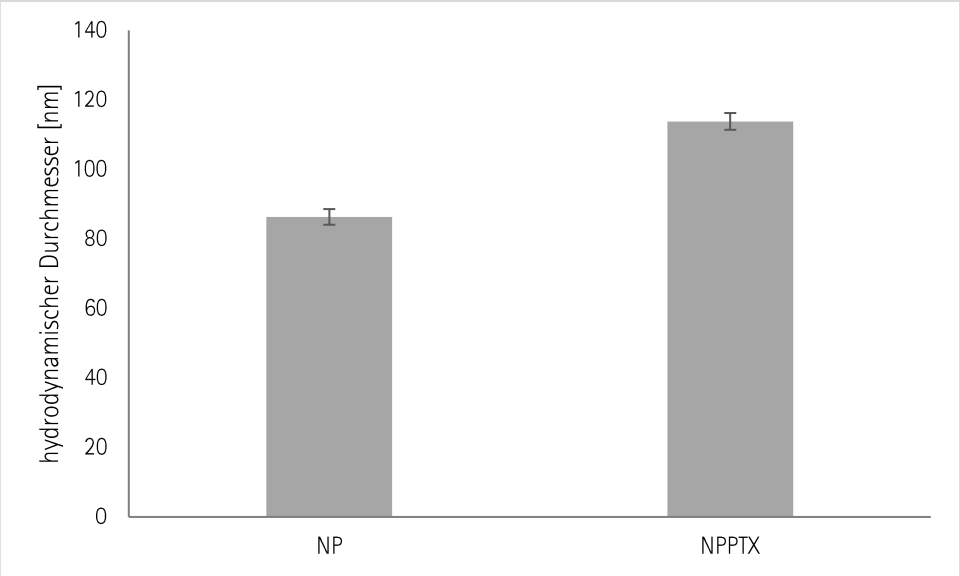

Abbildung 41: Ergebnisse der DLS Messung von PEG-PCL Partikeln mit eingekapseltem Wirkstoff (rechts) und ohne eingekapselten Wirkstoff (links).

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der besseren Detektierbarkeit auf einen anderen Wirkstoff, der gegen nicht-kleinzelligen Lungenkrebs gerichtet ist, zurückgegriffen. Ein großer Vorteil dieses Wirkstoffes (CPT) ist, dass er fluoreszent ist und somit über ein Fluoreszenzspektrophotometer detektiert werden kann. Somit kann die aufwendige Detektion über die HPLC vermieden werden.

Zur Bestimmung der eingekapselten Menge des CPT wurden die Partikel wieder wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, hergestellt und der Wirkstoff entsprechend verkapselt. Dabei wurden zur Verkapselung 1 mg/mL CPT eingesetzt [125, 131]. Nach der Herstellung wurde die Partikellösung am Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend in Dichlormethan gelöst, um die Partikel wieder zu zerstören und den Wirkstoff freizusetzen. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert, um die Partikelreste vom Wirkstoff zu trennen. Dieser sollte sich nach der Zentrifugation im Überstand befinden, welcher anschließend mittels Fluorospektrophotometer charakterisiert wurde. Als Negativkontrollen wurden Partikel ohne Wirkstoff sowie reines DCM mitgeführt. Dies diente der Überprüfung, ob die Polymere oder das DCM eine Eigenfluoreszenz besitzen, die die Ergebnisse der Quantifizierung verfälschen. Beide Kontrolllösungen zeigten keinerlei Fluoreszenz. Für den aus den Partikeln freigesetzten Wirkstoff konnte eine Konzentration von 215,3 µM bestimmt werden. Dies entspricht 7,5 % der ursprünglich eingesetzten Wirkstoffmenge. Dies entspricht bei einer Partikelkonzentration von 5,52 nM etwa 40 000 Molekülen Wirkstoff pro Partikel. Somit kann bei der großen Menge an Wirkstoffmolekülen und unter Beachtung des PDIs von 0,26 sowie einer Größe von 169 nm davon ausgegangen werden, dass CPT erfolgreich eingekapselt wurde. Um zu überprüfen, ob die Menge an eingekapseltem Wirkstoff ausreichend ist, um einen toxischen Effekt

auf die Zielzellen zu haben, wurden diese im nächsten Schritt mit verschiedenen Konzentrationen an freiem CPT inkubiert. Dazu wurden in einer 96 Wellplatte A549 Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit freiem Wirkstoff im Konzentrationsbereich von 100 µM bis 50 nM für 24 h inkubiert. Zur Überprüfung der Viabilität der Zellen wurde eine CellTiter Blue Test (Abschnitt 6.2.4.7) durchgeführt. Als Kontrolle wurde serumfreies Medium mitgeführt.

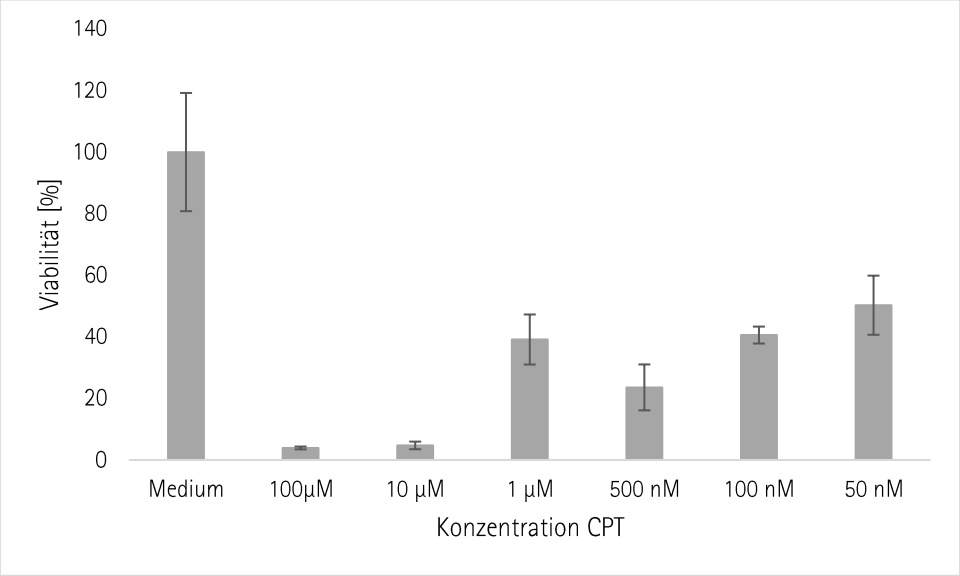

Abbildung 42: Viabilität der A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an freiem CPT.

Abbildung 42 zeigt, dass die A549 Zellen mit fallender Konzentration des freien CPT eine höhere Viabilität aufweisen. Der Wert bei 1 µM wich von den Erwartungen ab, da hier die Zellviabilität ansteigt. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass A549 Zellen, die mit freiem Paclitaxel in einer Konzentration über 1 µM eine gesteigerte Viabilität zeigen [132]. Dies ist möglicherweise durch einen gegenläufigen Effekt zu erklären, dass der Wirkstoff die Zellen einerseits tötet, andererseits, bevor er sie tötet, die Zellen jedoch ihre Stoffwechselaktivität steigern und den Wirkstoff abbauen. Bei CPT gibt es dazu keine Beobachtungen. Da diese Beobachtungen bei 10 µM und 100 µM nicht zu machen sind, ist der Wert bei 1 µM möglicherweise auf einen Messfehler zurückzuführen.

Bei einer Konzentration des freien CPT von 50 nM zeigen die Zellen eine etwa 50 %ige Viabilität. Laut Datenblatt ist der IC_{50} bei A549 Zellen bei 67 nM. Somit liegt die Konzentration (215,3 µM) des eingekapselten Wirkstoffes weit über dem bestimmten IC_{50} Wert.

Mit diesem Ergebnis konnte abschließend untersucht werden, ob der PDI der mit Wirkstoff beladenen Partikel noch optimiert werden konnte. Mit 0,26 deutet dieser zwar auf eine relativ gute Einkapselung hin, könnte aber niedriger sein. Um also eine sehr gute Einkapselung des Wirkstoffes zu erreichen, wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht, wie sich die Ausgangsmenge des CPT von 0,5 mg/mL auf den PDI der Partikelsuspension verhält. Es wurde, wie zuvor beschrieben die

verkapselte Menge bestimmt. Weiterhin wurde die Größe Partikel charakterisiert. Der PDI wies durchschnittlich einen Wert von 0,18 auf. Die Größe Partikel war im Durchschnitt 121 nm. Mit Hilfe der oben genannten Methode, konnte eine Konzentration des CPTs von 11 µM bestimmt werden. Pro Partikel wurden etwa 2000 Moleküle Wirkstoff bzw. 3 nmol CPT/nmol Partikel eingekapselt.
Da das entwickelte TDDS später auch mit dem zuvor eingesetzten PTX getestet werden sollte, wurde abschließend versucht, Paclitaxel ebenfalls in geringerer Menge in die Polymerpartikel einzukapseln. Es konnte, mit oben genannter Methode, eine Konzentration von etwa 30 µM bestimmt werden (9 nmol PTX/nmol Partikel). Die Größe der Partikel war im Durchschnitt etwa 140 nm und der PDI lag bei 0,19. Somit konnten in die Partikel zwei verschiedene Wirkstoffe erfolgreich eigekapselt werden.

4.1.5.1 Charakterisierung der Partikel mit eingekapseltem Wirkstoff

Stabilität des eingekapselten Wirkstoffes im Partikel

Um die Stabilität der Partikel mit Wirkstoff zu charakterisieren, wurde CPT eingekapselt und anschließend gegen deionisiertes Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen dialysiert (Abbildung *43*).

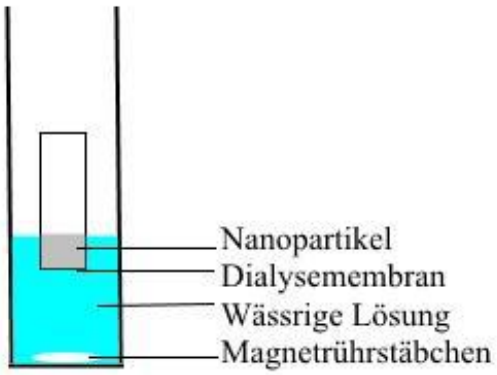

Abbildung 43: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Stabilität (und später der Wirkstofffreisetzung) der Nanopartikel[6]

Die verwendete Dialysemembran besitzt einen *Molecular weight cut-off* (MWCO) von 4 kDa (entspricht etwa einer Porengröße von 2 – 3 nm) und ist damit deutlich kleiner als die in der Lösung enthaltenen Nanopartikel mit etwa 120 nm Durchmesser. Es wurden in definierten zeitlichen Abständen Proben aus dem Wasser entnommen und mittels Fluoreszenzspektrophotometrie vermessen. Es sollte die darin enthaltene Menge an abgegebenem Wirkstoff bestimmt werden. Das deionisierte Wasser bzw. der Puffer wurde anschließend komplett ausgetauscht.

[6] Sandra Kuhlmeier, Untersuchung aptamerbasierter Targeted Drug Delivery Systeme, 2016

Für das Experiment wurde CPT in die Partikel eingekapselt und dann bei 37 °C, was der physiologischen Temperatur entspricht, sowie bei 4 °C die Freisetzung des Wirkstoffes charakterisiert. Dazu wurde Partikellösung für 72 h gegen Wasser bei physiologischem pH-Wert dialysiert. Es wurden regelmäßig Proben genommen, das Wasser getauscht und die mittels Fluoreszenzspektrophotometrie detektierte Wirkstoffmenge kumuliert. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung dargestellt.

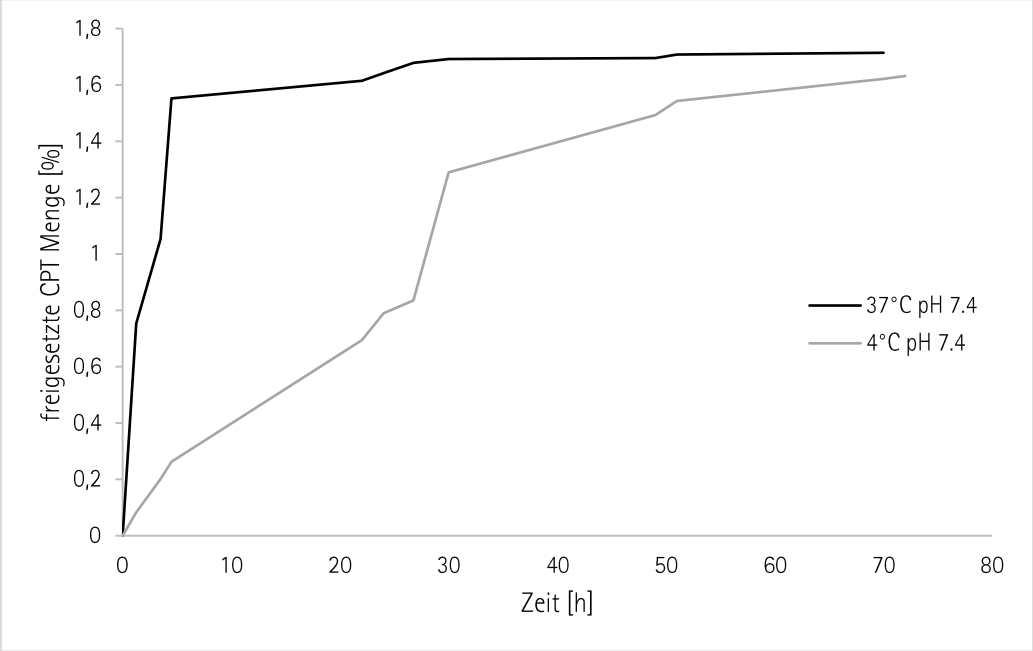

Abbildung 44: Stabilitätstest des in den Nanopartikeln verkapselten Wirkstoffes CPT bei unterschiedlichen Temperaturen.

Aus Abbildung 44 geht hervor, dass die Partikel bei beiden Temperaturen (4 °C und 37 °C) nahezu keinen Wirkstoff an die Umgebung abgeben. Wie in Kapitel 3.1.2.3 erwähnt, haben kleine Partikel aufgrund ihres großen Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis einen höheren sogenannten *burst release*, was die schnelle und schlagartige Freisetzung eines (mit der Oberfläche assoziierten) Wirkstoffes meint. Dieser *burst release* ist in Abbildung 44 sehr gut zu beobachten. Allerdings ist die hier freigesetzte Wirkstoffmenge mit 1,6 % so gering, dass auf eine hohe Lagerstabilität der Partikel geschlossen werden kann. Außerdem sind die Partikel sowohl über einen längeren Zeitraum als auch bei unterschiedlichen Temperaturen gut lagerbar. Weiterhin bedeutet dies, dass die Wirkstofffreisetzung, welche im Anschluss charakterisiert wurde, nahezu temperaturunabhängig ist. Im Abschnitt 4.2.1 wird die Wirkstofffreisetzung in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte untersucht.

Zetapotenzial

Im letzten Schritt wurde untersucht, ob der eingekapselte Wirkstoff einen Einfluss auf die Ladung der Partikel hat. Dazu wurde das Zetapotenzial der PEG-PCL Partikel mit eingekapseltem PTX und CPT bestimmt. Als Vergleich ist in Abbildung 45 das Zetapotenzial der PEG-PCL Nanopartikel ohne eingekapselten Wirkstoff dargestellt.

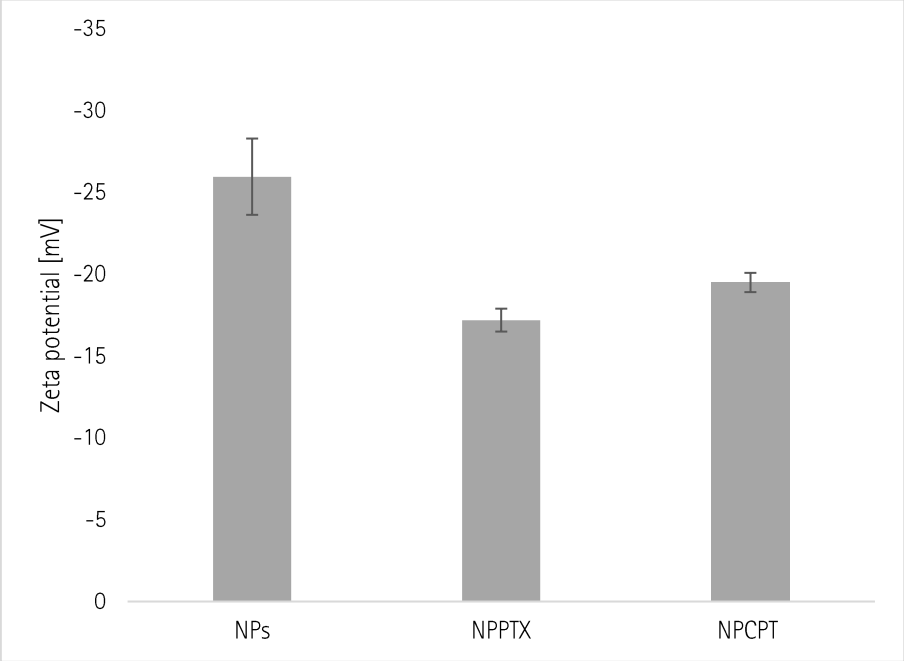

Abbildung 45: Zetapotenzial der PEG-PCL Nanopartikel mit eingekapseltem PTX (NPPTX) und eingekapseltem CPT (NPCPT).

Abbildung 45 zeigt, dass der eingekapselte Wirkstoff in den PEG-PCL Nanopartikeln dafür sorgt, dass deren Ladung im Vergleich zu Nanopartikeln ohne Wirkstoff geringer wird. Ohne Wirkstoff haben die PEG-PCL Nanopartikel ein Zetapotenzial von etwa -26 mV. Die Nanopartikel mit eingekapseltem PTX weisen ein Zetapotenzial von etwa -17 mV auf; die Nanopartikel mit eingekapseltem CPT eines von etwa -19 mV. Damit ist das Zetapotenzial von Nanopartikeln mit Wirkstoff im Schnitt etwa 20 % geringer als von Nanopartikeln ohne Wirkstoff. Diese Beobachtungen finden sich auch in der Literatur wieder [128, 129]. Die Vermutung ist, dass der Wirkstoff in der Partikelmatrix eingekapselt ist und somit das Zetapotential beeinflusst.

4.1.6 Schlussfolgerung/ Zusammenfassung 4.1

Das entwickelte Modellsystem bestehend aus Polycaprolatcon-Nanopartikeln konnte erfolgreich hergestellt werden. Als Ausgangsstoffe für die Nanopartikel dienten die biodegradablen Polymere mPEG-PCL und HOOC-PEG-PCL. Nach Optimierung der Partikelherstellung wurden die Partikel anschließend mit einem hydrophoben Wirkstoff im Kern hergestellt und charakterisiert. Ihr mittels

dynamischer Lichtstreuung bestimmter hydrodynamischer Durchmesser beträgt 80-100 nm, ihre mittels NTA Messung bestimmte Konzentration betrug etwa 4,2 nM. Mit Hilfe des TEMs konnte festgestellt werden, dass die Partikel eine runde Form haben. Außerdem sind sie in ihrem Lagerungsmedium Wasser bei 37 °C und bei 4 °C über einen Zeitraum von 30 Tagen stabil.

Sowohl PTX als auch CPT konnten erfolgreich in die Polymer-Nanopartikel eingekapselt werden. Außerdem wurden mittels NTA die Partikelkonzentrationen bestimmt – diese betrugen 4,6 nM für die PTX beladenen Partikel und 5,52 nM für die CPT beladenen Partikel.

Auf der Oberfläche der Partikel konnten erfolgreich Aptamere als Targeting Liganden immobilisiert werden. Weiterhin konnte die Menge des immobilisierten Aptamers bestimmt werden. Es wurden pro Quantum Dot etwa 25 Aptamere und pro PEG-PCL Nanopartikel etwa 740 Aptamere immobilisiert.

Nachfolgend wurde das entwickelte System hinsichtlich seiner pH-Wert abhängigen Wirkstofffreisetzung charakterisiert und an Zellen getestet.

4.2 In Vitro Untersuchungen des entwickelten *Targeted Drug Delivery* Systems

In Kapitel 4.1 wurde die Entwicklung des *Targeted Drug Delivery Systems* sowie dessen Charakterisierung vorgestellt. Im nachfolgenden Abschnitt soll das TDDS hinsichtlich seines *in vitro* Einsatzes charakterisiert werden. Zunächst wurde die Freisetzung des Wirkstoffes bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Anschließend wurde das System hinsichtlich seiner Toxizität auf Zellen untersucht (4.2.2).

4.2.1 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Im folgenden Abschnitt sollte die Wirkstofffreisetzung aus den Polymer-Nanopartikel bei verschiedenen pH-Werten untersucht werden. Dazu wurden die wirkstoffbeladenen Partikel gegen PBS dialysiert und in regelmäßigen Abständen Proben aus dem Puffer entnommen. Zunächst musste jedoch die Analytik zur Quantifizierung optimiert werden.

Optimierung der Analytik zur Quantifizierung der Wirkstoffmenge

Bei der Detektion der freigesetzten Menge an CPT ergab sich vor allem bei der Löslichkeit des Wirkstoffes in verschiedenen Puffern, in denen die Freisetzung des Wirkstoffes untersucht wurde, ein analytisches Problem. Die meisten Puffer sind wasserbasierte Salzlösungen, da sie den Körperflüssigkeiten am ähnlichsten sind. CPT ist jedoch ein hydrophober Wirkstoff. Daher musste zunächst bestimmt werden, inwiefern sich der Wirkstoff in den Salzlösungen löst und wie hoch die Löslichkeitsgrenze ist. Dies geschah im Rahmen der Bachelorarbeit von Lisa Gülker[7].

Es wurde also zunächst die Löslichkeit des freien Wirkstoffes in verschiedenen Puffern bei unterschiedlichen Bedingungen getestet. Es wurde unter anderem das im Puffer verwendete Lösemittel und der pH-Wert verändert. Ist die Löslichkeitsgrenze des Wirkstoffes überschritten, fällt dieser im Puffer aus und kann nicht detektiert werden bzw. verfälscht das Ergebnis. Daher war es notwendig, zunächst denjenigen Konzentrationsbereich zu bestimmen, bei dem der Wirkstoff quantifiziert werden kann.

Als Puffer kamen PBS mit Zusatz von 1 % Dimethylsulfoxid (DMSO), im Folgenden kurz als PBS(DMSO) bezeichnet, oder PBS mit Zusatz von 0,1 % TWEEN® 80, im Folgenden kurz als PBS(TWEEN) bezeichnet, zum Einsatz. Beide Zusätze dienten dazu, die Löslichkeit des hydrophoben Wirkstoffes zu erhöhen und damit eine gute Charakterisierung der Freisetzungsmenge zu ermöglichen. Ohne diese Zusätze würde sich der Wirkstoff bei Freiwerden aus den Partikeln auf dem

[7] Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus Polycaprolacton-Nanopartikeln; 2017

Boden der Reaktionsgefäße anlagern, da er im wässrigen Medium nicht löslich ist. Eine andere Möglichkeit wäre, in sehr großes Verhältnis von Nanopartikeln zu Freisetzungsmedium zu wählen. Allerdings wird dann die Analyse des freigesetzten Wirkstoffs aufgrund der geringen Konzentration sehr schwierig. Daher wird bei Freisetzungsuntersuchungen auf den Zusatz von Lösemitteln gesetzt [133]. Als zweiter Schritt wurde die Löslichkeit des Wirkstoffes bei verschiedenen pH-Werten getestet. Dabei wurden die pH-Werte 5,2; 7,4; 6,8 und 8 gewählt. Da das entwickelte TDDS in Zukunft über den oralen Weg in den Körper aufgenommen werden soll, erreicht es nach der Magenpassage, in der die Chitosan-Schutzhülle (die Beschichtung wird durch die israelischen Kooperationspartner Frau Engelberg und Assoc. Prof. Livney durchgeführt) abgebaut wird, den Darm. Dort herrscht etwa ein pH von 8. Die Nanopartikel werden anschließend ins Blut aufgenommen (pH 7.4) und erreichen dann das Tumorgewebe, welches einen leicht sauren pH Wert von 6,8 aufweist [134]. Über (Rezeptorvermittelte) Endozytose (Kapitel 3.1.2.5) werden die Partikel in den Tumor aufgenommen. Der pH-Wert der späten Endosomen beträgt zwischen 4,5 und 5,2 [4].

Es wurden Kalibrationsgeraden im Konzentrationsbereich von 0,1 µg/mL bis 1 µg/mL aufgenommen.

In einem höheren Konzentrationsbereich wurden keine Kalibrationen aufgenommen, da sich in den Experimenten zeigte, dass der Wirkstoff an den Wänden der Reaktionsgefäße adsorbierte. Die Abbildung 46 zeigt exemplarisch die Kalibrationsgeraden für die Puffer mit den verschiedenen pH-Werten und dem Zusatz von 0.1 % DMSO. Alle anderen Graphen befinden sich im Abschnitt 6.2.4.6.

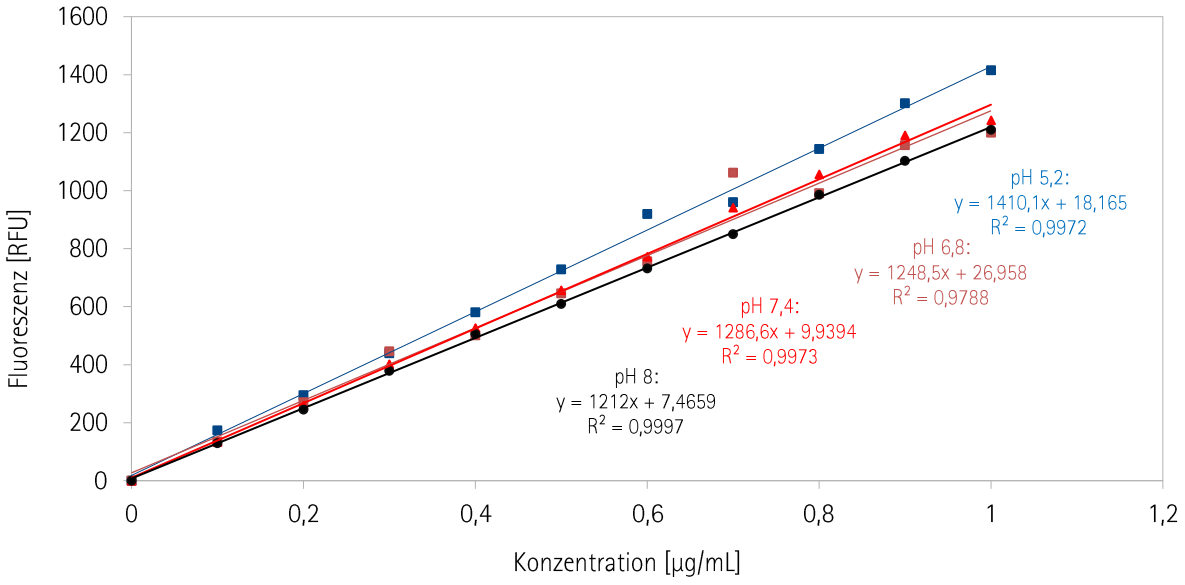

Abbildung 46: Kalibrationsgeraden von CPT in PBS (DMSO) bei den pH-Werten 5,2; 6,8; 7,4 und 8.

Alle Kalibrationsgeraden weisen ein Bestimmtheitsmaß nahe $R^2=1$ auf. Damit kann davon ausgegangen werden, dass sich das CPT im Konzentrationsbereich bis 1 µg/mL vollständig in den verwendeten Puffern löst. Im folgenden Abschnitt wird die Freisetzung des Wirkstoffs aus den PEG-PCL Nanopartikeln dargestellt.

Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Zur Bestimmung der Wirkstofffreisetzung aus den Nanopartikeln wurde zunächst bei der Herstellung der Wirkstoff eingekapselt. Die Abgabe des Wirkstoffes CPT wurde in PBS mit Zusatz von 1 % DMSO untersucht. DMSO wird dazu gegeben, da CPT ein hydrophober Wirkstoff ist und sich daher nicht bzw. nur schwer in dem wässrigen PBS Puffer löst. Die Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung und zur Löslichkeit des eingekapselten Wirkstoffes wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Lisa Gülker[8] durchgeführt. Es wurden 1 mL der Nanopartikel Suspension in einem Dialysegefäß gegen 5 mL des Puffers unter Rühren bei 37 °C untersucht (Abbildung 43). Die Freisetzung von CPT aus den Nanopartikeln wurde bei fünf verschiedenen pH-Werten getestet. pH 4,7; 5,2; 6,8; 7 und 8. Wie in im vorherigen Abschnitt erwähnt, soll das entwickelte TDDS in Zukunft über den oralen Weg in den Körper aufgenommen werden. Nach der Magenpassage, erreicht es den Darm, wo ein pH-Wert von etwa 8 herrscht. Die Nanopartikel werden anschließend ins Blut aufgenommen (pH 7.4). Nach Erreichen des Tumorgewebes, in dem ein leicht sauren pH-Wert von 6.8 herrscht, wird das TDDS über die rezeptorvermittelte Endozytose (3.1.2.5) in den Tumor aufgenommen. Der pH-Wert der späten Endosomen beträgt zwischen 4,5 und 5,2 [4, 134].

Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben aus den Pufferlösungen entnommen und das gesamte Puffervolumen ersetzt. Die Menge an CPT in den Proben wurde mit Hilfe der Fluoreszenzspektrophotometrie bestimmt und kumuliert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Wirkstofffreisetzung des CPT aus den Nanopartikeln bei unterschiedlichen pH-Werten.

[8] Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus Polycaprolacton-Nanopartikeln; 2017

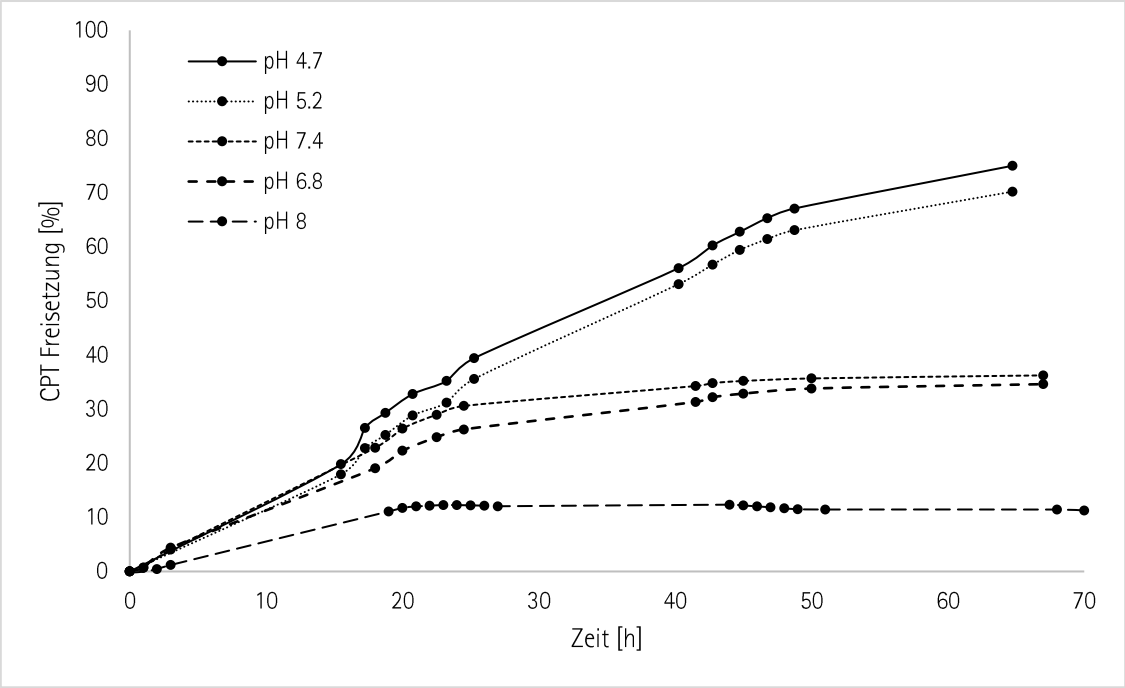

Abbildung 47: Freisetzung des Wirkstoffes bei verschiedenen pH-Werten (mit Zusatz von DMSO).

Aus Abbildung 47 geht hervor, dass bei einem pH-Wert von 8 nach 70 h etwa 11 % des Wirkstoffs freigesetzt wird. Innerhalb der ersten 20 h ist der größte Anstieg der Freisetzung zu beobachten, anschließend stagniert die Freisetzung bei etwa 11 %. Die Wirkstofffreisetzung kann nach zwei verschiedenen Mustern ablaufen. Da der sogenannte *burst release* in den ersten 12 h stattfindet, kann davon ausgegangen werden, dass dort nur der Wirkstoff frei wird, der schlecht eingekapselt ist oder sich in der Partikelmatrix befindet. Hier sind die Bindungskräfte weniger stark, so dass der Wirkstoff schneller an das umgebende Medium abgegeben wird [42]. Die kontinuierliche Freisetzung hingegen, die in den darauffolgenden Stunden bis Tagen stattfindet, kann dem Wirkstoff zugeordnet werden, der gut eingekapselt und im Kern der Partikel lokalisiert ist [97]. Somit ist es möglich, dass die 11 % CPT, die in den ersten 20 h bei einem pH-Wert von 8 freiwerden, lediglich Wirkstoff war, der schwach an der Partikeloberfläche assoziiert war. Nach elf Stunden wird bei pH 8 nahezu kein Wirkstoff mehr freigesetzt. Bei einem physiologischen pH-Wert, von pH 7,4, wie er im Blut vorherrscht, werden bis 24 h etwa 30 % Wirkstoff freigesetzt. Danach wird kaum noch Wirkstoff freigesetzt. Möglicherweise kann durch die Immobilisierung des Liganden auf der Partikeloberfläche verhindert werden, dass der Wirkstoff schon im Blut, vor Erreichen der Tumorzellen, frei wird. In zukünftigen Experimenten muss dies untersucht werden.

Für saure pH-Werte kann eine deutliche Abhängigkeit der Wirkstofffreisetzung vom pH-Wert beobachtet werden. Je niedriger der pH-Wert, desto mehr Wirkstoff wird freigesetzt. Da Tumorzellen ein leicht saures extrazelluläres Milieu ausbilden, ist dieses Ergebnis als positiv zu bewerten. Im

Gegensatz zu normalen Zellen, die ein pH-Wert von 7,4 umgibt, liegt dieser bei Tumorzellen bei etwa 6,0 [4]. Der saure pH-Wert resultiert aus der hohen Glykolyserate, gefolgt von der Umsetzung von Laktat auch unter anaeroben Bedingungen in Tumorzellen. Dieses Phänomen ist auch als Warburg Effekt bekannt. Wird die Freisetzung bei sauren pH-Werten von 5,2 oder 4,7 betrachtet, findet eine nahezu lineare Freisetzung des Wirkstoffes statt. Diese beiden pH-Werte befinden sich im Inneren der Tumorzellen, nachdem die Partikel über Rezeptorvermittelte Endozytose (Kapitel 3.1.2.5 und 4.2.4) aufgenommen wurden. Dies bedeutet, nachdem die Partikel in die Zellen aufgenommen wurden, gibt es eine hohe Freisetzungsrate bei sauren pH-Werten.

In diesem Kapitel konnte erfolgreich die Freisetzung des eingekapselten Wirkstoffes bei unterschiedlichen pH-Werten charakterisiert werden. Vor allem bei sauren pH-Werten findet eine vermehrte Freisetzung statt. Insgesamt lässt sich sagen, dass das TDDS hinsichtlich seiner Größe, Funktionalisierung mit Liganden, Stabilität und Einkapselung von Wirkstoffen sowie deren Freisetzung bei unterschiedlichen Bedingungen erfolgreich entwickelt werden konnte. Nun wird nachfolgend seine *in vitro* Wirkung charakterisiert.

4.2.2 Untersuchung der Toxizität des entwickelten TDDS auf die Zellen

Im nächsten Schritt sollte das entwickelte System hinsichtlich seiner Toxizität auf Zellen charakterisiert werden. Dazu wurden die Zielzellen A549 und die Kontrollzelllinie HeLa mit den Nanopartikeln für 24 h inkubiert. Beide Zelllinien wurden mit S15 gekoppelten, PTX beladenen PEG-PCL Partikeln inkubiert. Die Konzentration des PTX in den Partikeln betrug dabei etwa 30 µM.
Außerdem wurden die Zellen als Kontrolle mit der Partikelsuspension, in der sich die PEG-PCL Partikel ohne eingekapselten Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer befanden, inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität am Durchflusszytometer bestimmt. In Experimenten am Institut für Technische Chemie wurde bereits bewiesen, dass das S15 Aptamer nur die A549 Zelllinie spezifisch bindet [135]. Allerdings konnten diese Beobachtungen mittels Durchflusszytometrie nur teilweise bestätigt werden. Dies zeigt die Abbildung 49.
Nach der Inkubation mit Partikeln ohne eingekapselten Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer war die Viabilität der Zellen beider Zelllinien etwa dieselbe (4,2 % und 4,9 %) (Abbildung 48).

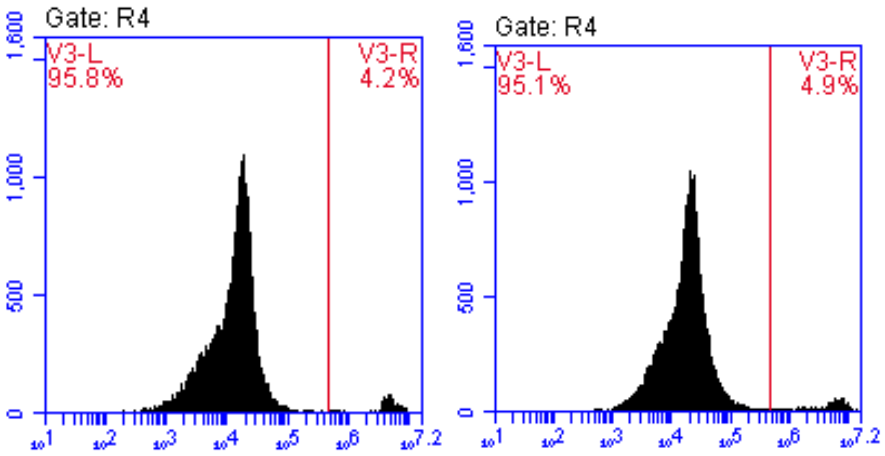

Abbildung 48: Links: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL Nanopartikeln ohne Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer Rechts: HeLa Zellen inkubiert mit PEG-PCL Nanopartikeln, ebenfalls ohne eingekapselten Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer

Die Abbildung zeigt links der roten Linien jeweils den prozentualen Anteil der lebenden Zellen, rechts der roten Linie die toten Zellen. Anhand der Abbildung 48 lässt sich feststellen, dass bei beiden Zelllinien über 90 % der Zellen lebendig sind. Die PEG-PCL Nanopartikel ohne eingekapselten Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer haben demnach keinen toxischen Effekt auf die Zellen beider Zelllinien haben.

Nachfolgend sollte nun noch bestätigt werden, dass die mit S15 funktionalisierten und wirkstoffbeladenen Partikel die Zellviabilität einschränken und damit einen toxischen Effekt auf die Zellen haben. Dies konnte im Durchflusszytometer jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 49).

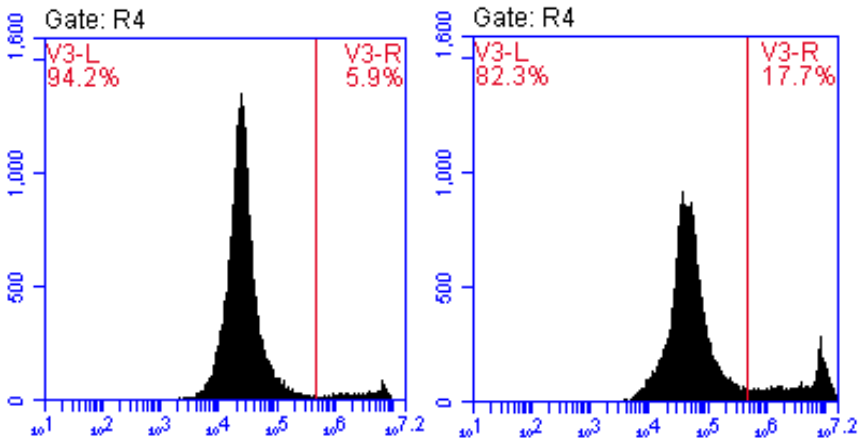

Abbildung 49: Links: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL Nanopartikeln mit eingekapseltem PTX und immobilisiertem S15 Aptamer (NPPTXS15); rechts: HeLa inkubiert mit NPPTXS15.

In Abbildung 49 links ist zu sehen, dass die A549 Zelllinie eine Viabilität von über 90 % aufweist. Lediglich knapp 6 % der Zellen sind tot. Gegenteilig verhält es sich bei den HeLa Zellen. Bei der Kontrollzelllinie (Abbildung 49, rechts) liegt die Viabilität der Zellen bei etwa 82 %. Eine mögliche

Erklärung für diese Ergebnisse könnte mit der Behandlung der Zellen vor der Charakterisierung zusammenhängen. Für die Charakterisierung mittels Durchflusszytometer müssen die Zellen mit Hilfe von Trypsin von ihrer Oberfläche gelöst werden. Da das Target des S15 Aptamers unbekannt ist, liegt die Vermutung nahe, dass dieses auf der Oberfläche der Zellen sitzt; somit könnte es beispielsweise ein Rezeptor auf der Zelle sein. Da beim Ablösen der Zellen von ihrer Kulturoberfläche mit Trypsin die Proteine an der Zelloberfläche zerstört werden, kann das Aptamer die Zellen möglicherweise nicht mehr binden. Daher muss zunächst eine geeignete Ablösemethode gefunden werden, die mit der Bindung des Aptamers an die Zellen kompatibel ist. Dies wird im nachfolgenden Kapitel dargestellt.

Optimierung der Ablösung von A549 Zellen von verschiedenen Oberflächenmaterialien

Um eine geeignete Ablösemethode für die A549 Zellen zu bestimmen, wurden diese auf verschiedenen Oberflächenmaterialien kultiviert. Diese Experimente wurden im Rahmen der Masterarbeit von Frau Kuhlmeier[9] durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf Petrischalen mit speziell für adhärente Zellen geeigneter Oberfläche kultiviert (ZP). Diese besteht aus Polystyrol, das mit hydrophilen Gruppen auf der Oberfläche modifiziert wurde. Dies dient dazu, dass die Zellen mit ihren Oberflächenproteinen besser an der Oberfläche adhärieren können [136]. Als weitere Kulturoberfläche dienten Petrischalen mit unmodifizierter Polystyroloberfläche (AP). Hier, so die Vermutung, sollten die Zellen weniger stark adhärieren als an der ZP Oberfläche. Die Ablösung der Zellen wäre auf der AP Oberfläche einfacher und die Viabilität vermutlich höher als bei der ZP Oberfläche. Nach Kultivierung der Zellen wurden diese mit verschiedenen Methoden von den Oberflächen abgelöst.

Als verschiedene Ablösemethoden dienten Trypsin, EDTA (0,2 % in PBS), eine Natriumcitrat-Kaliumchlorid-Lösung, eine kommerzielle, nichtenzymatische Ablöselösung (*Cell Dissociation Solution Non-enzymatic*, Sigma-Aldrich) und der Zellschaber. Anschließend wurden die A549 Zellen mit FITC-markiertem S15-Aptamer inkubiert, mit Aptamerbindepuffer gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert. Die so bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten (gemittelte Fluoreszenzintensitäten der lebenden Zellen) sind in Abbildung 50 dargestellt. Die Eigenfluoreszenz der Zellen, die nicht mit Aptamer inkubiert wurden, wurde dabei von den gemessenen Fluoreszenzintensitäten abgezogen.

[9] Untersuchung aptamerbasierter *Targeted Drug Delivery* Systeme, 2016

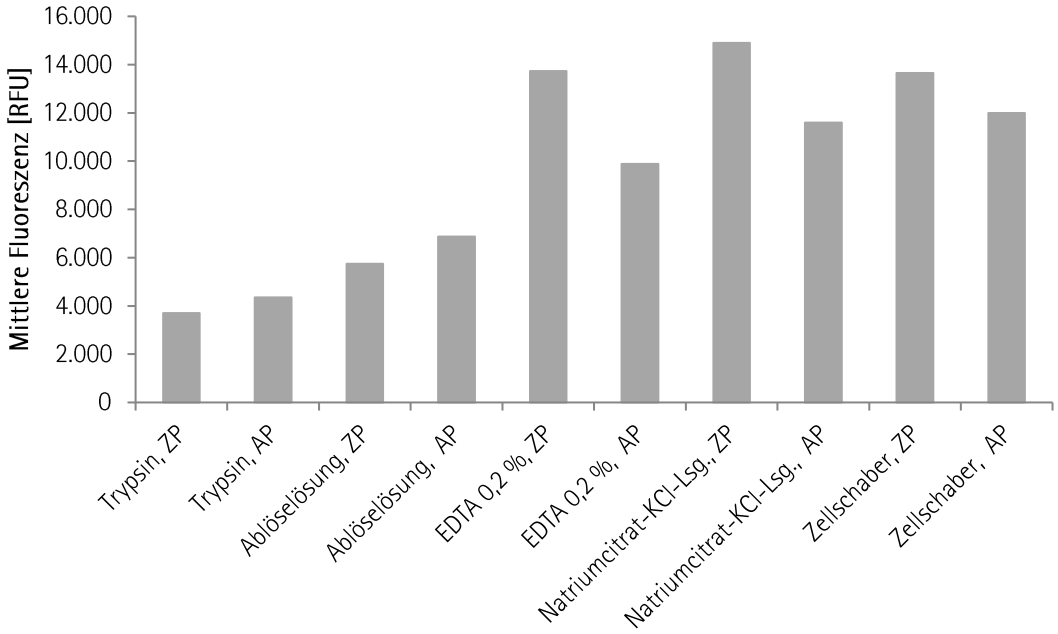

Abbildung 50: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten der A549 Zellen, die auf verschiedenen Oberflächen kultiviert und mit unterschiedlichen Ablösemethoden abgelöst wurden. Die Charakterisierung erfolgte mittels Durchflusszytometer. ZP: für die Zellkultur von adhärenten Zellen optimierte Polystyrol-Oberfläche; AP: nicht optimierte Polystyrol-Oberfläche[10].

Aus Abbildung 50 geht hervor, dass die Zellen, die auf den optimierten Zellkulturoberflächen (ZP) kultiviert wurden, eine höhere Fluoreszenz aufweisen, als Zellen, die auf nicht-optimierten Platten (AP) kultiviert wurden. Die beiden Ausnahmen bilden dabei die Zellen, die mit Trypsin bzw. der kommerziellen Ablöselösung abgelöst wurden. Sie weisen auf den optimierten Zellkulturplatten eine geringere Fluoreszenz von 4000 RFU (Trypsin) und 6000 RFU (kommerzielle Ablöselösung) auf.
Die Fluoreszenz der mit der Natriumcitrat-Kaliumchlorid-Lösung, dem 0,2 % igem EDTA und dem Zellschaber abgelösten Zellen, die auf optimierten Petrischalen kultiviert wurden, ist mit etwa 15.000 RFU am stärksten. Sie ist damit etwa 4 x höher als bei den mit Trypsin abgelösten Zellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Target des S15 Aptamers am geringsten durch die Ablösemethoden Zellschaber, Natriumcitrat-Kaliumchlorid-Lösung und 0,2 % EDTA beeinflusst wird. Die Fluoreszenz der Zellen, die mit Trypsin abgelöst wurden, ist am geringsten. Trypsin ist eine Protease, die die Bindungen zwischen den Zellen und der Kulturplatte löst. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Target des S15 Aptamers um ein Oberflächenprotein handeln, welches von den A549 und auch HeLa Zellen überexprimiert wird, und durch die Ablösung mit Trypsin zerstört wird.
Nachfolgende Abbildung zeigt beispielhaft die Fluoreszenzverteilungen der A549 Zellen (mit Trypsin und Zellschaber abgelöst) und der Negativkontrolle (Zellen, die nicht mit dem FITC markierten S15

[10] Sandra Kuhlmeier, Untersuchung aptamerbasierter *Targeted Drug Deliery* Systeme, 2016.

inkubiert wurden). Beide Zelllinien wurden auf optimierten Zellkulturoberflächen kultiviert. Die Charakterisierung fand mittels Durchflusszytometrie statt.

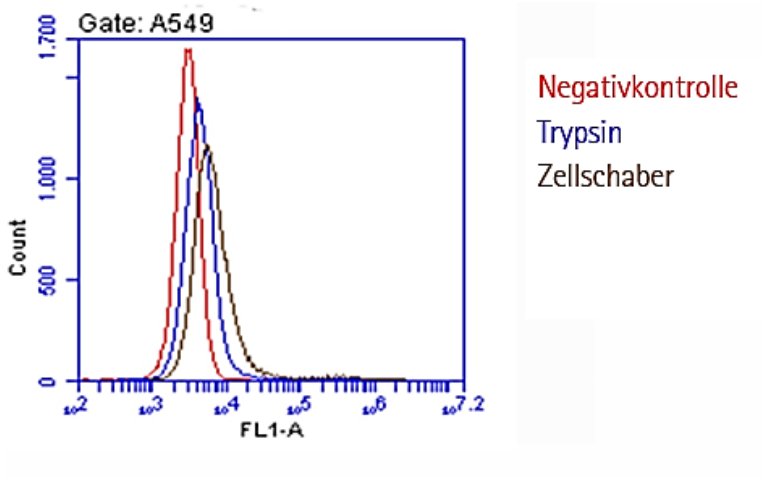

Abbildung 51: Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzverteilungen der A549 Zellen, die mit Trypsin bzw. dem Zellschaber abgelöst wurden. Sie wurden anschließend mit FITC markiertem S15 inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit nicht mit FITC markiertem S15 inkubiert wurden[11].

Abbildung 51 zeigt eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten (x-Achse). Die mittels Zellschaber abgelösten Zellen zeigen dabei im Vergleich zur Negativkontrolle eine höhere Intensität. Das bedeutet, dass an diese Zellen deutlich mehr Aptamere binden, als an die Zellen, die mit Trypsin abgelöst wurden.

Die geringeren Fluoreszenzintensitäten der Zellen, die auf den nicht optimierten Oberflächen kultiviert wurden (Abbildung 50), lassen sich darauf zurückführen, dass ebendiese Oberflächen nicht zusätzlich mit hydrophilen Gruppen modifiziert wurden. Dadurch binden die Zellen deutlich schwächer an die entsprechende Oberfläche. Eine Vermutung ist, dass diese Zellen andere Strukturen ihrer Oberflächenproteine ausbilden, damit überhaupt eine Bindung an die Kulturoberfläche möglich ist. Dies kann dann jedoch dazu führen, dass das S15 Aptamer kein bzw. nur eine verminderte Anzahl an Targets auf diesen Zellen binden kann, wodurch die geringeren Fluoreszenzen erklärt werden könnten. Aus der Literatur ist dahingehend jedoch nichts bekannt.

Spezifität der Methode

Anschließend sollte geklärt werden, ob die Bindung des S15 Aptamers spezifisch an den A549 Zellen erfolgt. Dafür wurde auf Zellebene die Gebärmutterhalskrebszelllinie HeLa als Negativkontrolle geführt. Beide Zelllinien wurden auf den optimierten Oberflächen kultiviert und mittels Zellschaber abgelöst. Des Weiteren wurden beide Zelllinien mit FITC markiertem S15 inkubiert und die Bindung mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der

[11] Sandra Kuhlmeier, Untersuchung aptamerbasierter *Targeted Drug Delivery* Systeme, 2016.

Bindung an die Zellen. Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde bestimmt, indem diese ohne Aptamer inkubiert wurden. Anschließend wurde dieser Wert von den gemessenen Fluoreszenzen subtrahiert.

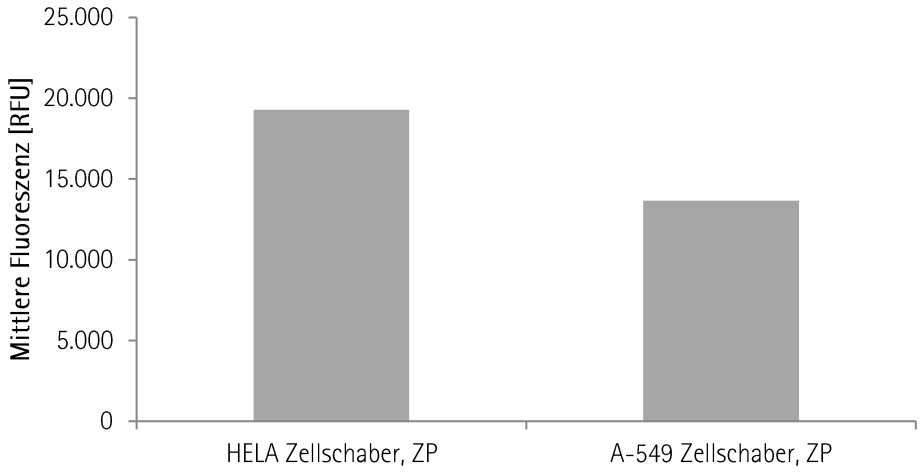

Abbildung 52: Charakterisierung der Bindung des S15 Aptamers an die A549 Zellen und die Negativkontrollzelllinie HeLa. Die Charakterisierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse stammen aus der Masterarbeit von Sandra Kuhlmeier[12].

Aus Abbildung 52 geht hervor, dass die Fluoreszenz der HeLa Zellen bei etwa 20.000 RFU, die Fluoreszenz der A549 Zellen bei nur etwa 15.000 RFU liegt. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, dass das S15 Aptamer spezifisch an die A549 Zielzelllinie bindet. Es bindet mit einer höheren Spezifität an die Negativkontrolle. Dies lässt den Schluss zu, dass das S15 Aptamer unspezifisch an bestimmte Strukturen auf der Oberfläche von Krebszellen bindet. Weiterhin besitzt das S15 eine besondere Struktur, es bildet einen sogenannten G-Quadruplex (Abbildung 53) aus.

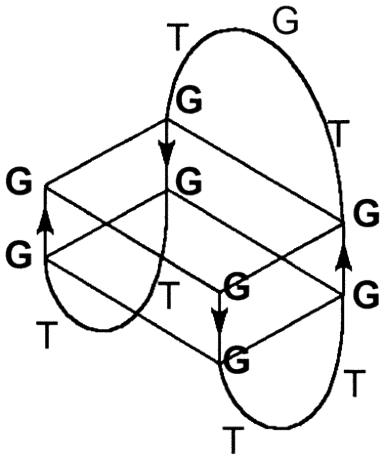

Abbildung 53: Guanin-Quadruplex [137].

Das G-Quadruplex kommt in Oligonukleotiden vor, die Regionen mit guaninreichen, repetitiven Sequenzen aufweisen. Diese Sequenzen ordnen sich als Stapel an (Abbildung 53) und bilden somit

[12] Untersuchungen aptamerbasierter *Targeted Drug Delivery* Systeme; 2016

die genannte Sekundärstruktur aus. Diese Sequenzabschnitte sind außerdem über Loopstrukturen miteinander verbunden. Da es bereits Hinweise in der Literatur auf andere Aptamere und Sequenzen mit G-Quadruplexstrukturen gibt, die an verschiedene Arten von Krebszellen binden, wie zum Beispiel das AS1411, das an Nucleolin auf der Oberfläche von verschiedenen Arten von Tumorzellen bindet, lässt dies die Vermutung zu, dass diese Struktur für die unspezifische Bindung an die HeLa Zellen verantwortlich ist [138]. Ob diese Bindung auch an gesunden Zellen auftritt, wurde bislang jedoch nicht untersucht. Diese Experimente finden sich im Abschnitt 4.3.2.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte getestet werden, welche Ergebnisse die Bindung des Aptamers an adhärenten (nicht abgelösten) A549 und HeLa Zellen hervorbringt. Dies sollte auch dazu dienen, die aufwändige Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie zu umgehen. Im nachfolgenden Kapitel soll die Aptamerspezifität an adhärenten Zellen untersucht werden.

4.2.3 Analyse der Aptamerspezifität für adhärente A549 Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die geeignete Ablösemethode für Suspensionszellen bestimmt. Damit zum einen der Schritt der Ablösung, der ein hohes Stresspotential für die Zellen liefert und möglicherweise das Aptamertarget zerstört, umgangen werden konnte, und zum anderen die aufwändige Methode des Durchflusszytometrie vermieden werden konnte, wurde die Spezifität des eingesetzten Aptamers an adhärenten Zellen untersucht. Dies geschah im Rahmen der Masterarbeit von Sandra Kuhlmeier[13] und in Kooperation mit Shira Engelberg vom Technion in Haifa Israel. Für die Charakterisierung der Bindung war es notwendig, das Aptamer an Einheiten zu koppeln, die im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Dies war mit den hergestellten Nanopartikeln nicht möglich, da die Polymere keine Eigenfluoreszenz besitzen. Auch der Einsatz von Fluoreszenzmarkierungen am Aptamer hätte sich schwierig gestaltet, da diese Markierungen in der Regel zu schnell verblassen. Daher wurde das S15 Aptamer an Quantum Dots (QDs) als Modellpartikel gekoppelt (Abschnitt 4.1.4).

Die A549 Zellen wurden anschließend mit den modifizierten QDs inkubiert und deren Bindung an die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Dazu wurden zunächst A549 Zellen sowie die Kontrollzelllinie HeLa in Zellkammern mit einer Polylysin-beschichteten Glasoberfläche kultiviert. Die Zellen binden durch die Modifizierung der Glasträger mit Polylysin an deren Oberfläche, während die QDs keine Bindung an die Oberfläche zeigen. Somit wird ausgeschlossen, dass es falschpositive Ergebnisse der Bindungsspezifität gibt [135]. Nach der Kultivierung der Zellen für 48 h wurde das

[13] Untersuchung aptamerbasierter *Targeted Drug Delivery* Systeme; 2016

alte Medium entfernt und beide Zelllinien mit S15 modifizierten und Rnd (randomisiertes Oligonukleotid) modifizierten QDs für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen QDs durch Waschen mit PBS von den Zellen entfernt. Die Zellkerne wurden mit Hilfe der DAPI Färbung (6.2.9.4) sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop konnte anschließend bei 655 nm Anregungswellenlänge charakterisiert werden, ob die modifizierten QDs an die Zellen gebunden haben. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung dargestellt.

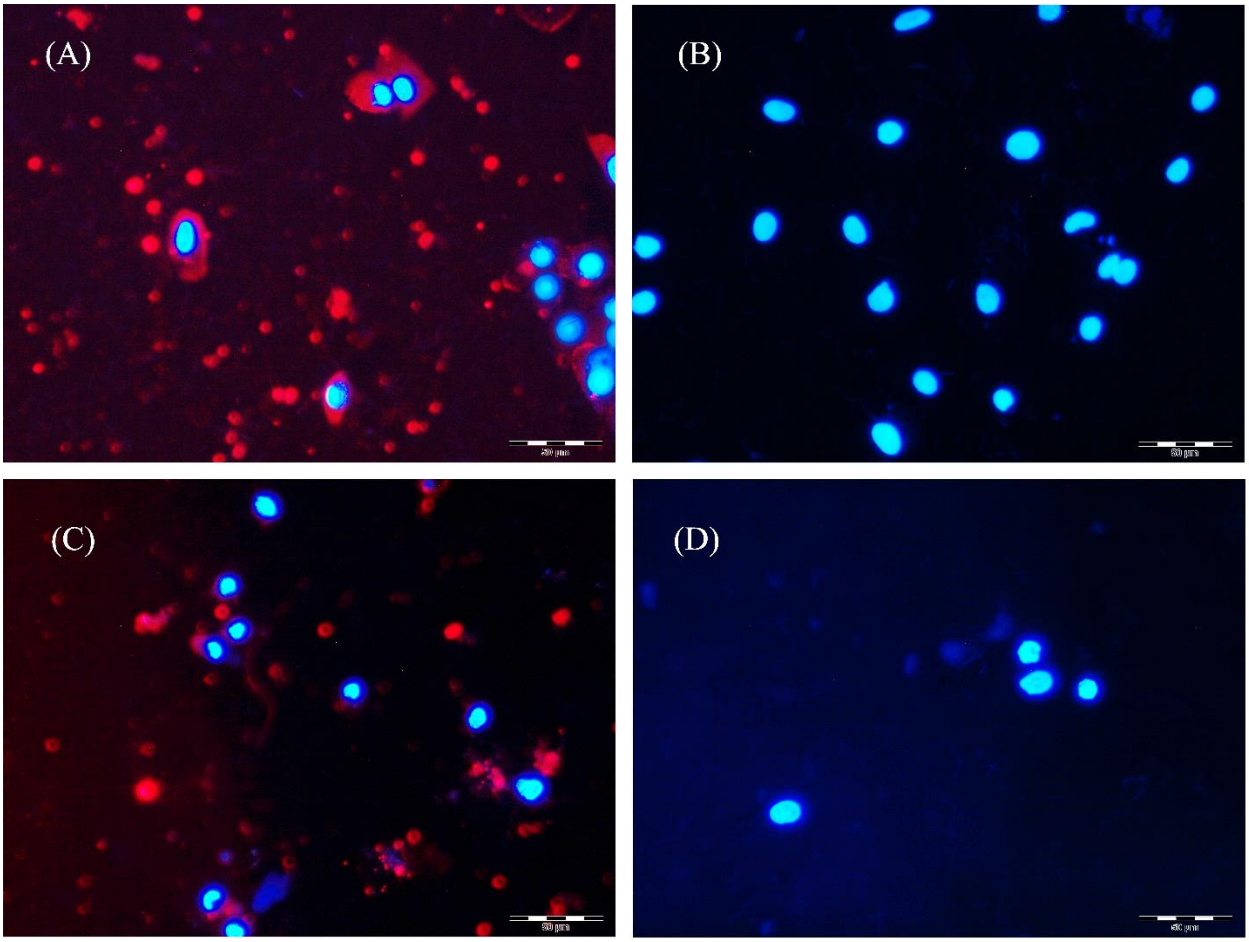

Abbildung 54: Bindung der mit S15 und Rnd modifizierten QDs an A549 und HeLa Zellen. A) A549 mit QDS15 inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung (blaue Zellkerne); B) A549 mit QDRnd inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung; C) HeLa Zellen mit QDS15 inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung; D) HeLa Zellen mit QDRnd inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung.

Die Abbildung zeigt, dass die QDs, die mit dem randomisierten Oligonukleotid gekoppelt wurden, weder an die A549 noch an die HeLa Zellen binden (B und D). Hier sind nur die gefärbten Zellkerne zu sehen. In Abbildung 54 A) und D) ist jedoch zu sehen, dass die mit S15 modifizierten QDs sowohl an die Zielzelllinie als auch an die Kontrollzelllinie binden. Diese Beobachtung deckt sich mit denen der Durchflusszytometrie-Messungen mit dem FITC-markierten Aptamer (Abbildung 52). Auch hier wurden unspezifische Bindungen des S15 Aptamers an die HeLa Zellen festgestellt. Da die mit randomisiertem Oligonukleotid gekoppelten QDs an keine der beiden Zelllinien gebunden hat, kann

davon ausgegangen werden, dass eine unspezifische Bindung zwischen Zelle und Aptamer nicht aufgrund von ionischen Wechselwirkungen zustande kommt. In bisherigen Experimenten verschiedener anderer Arbeitsgruppen [88, 135, 139] konnte diese unspezifische Bindung allerdings nicht bestätigt werden, so dass diese in nachfolgenden Experimenten weiter untersucht werden sollte.

Parallel zu den Untersuchungen von Frau Kuhlmeier (Abbildung 54) wurde die Bindungsaffinität des verwendeten Aptamers von Frau Engelberg auch durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung ***55***). Dazu wurden beide Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen (zwischen 0,78 und 50 nM) des QDS15 Konjugats inkubiert. Mit Hilfe des Durchflusszytometers werden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (durch die Software Software BD Accuri 6) ermittelt (6.2.10). Anschließend kann für jede Konzentration grafisch eine Bindungskurve aufgenommen und mit Hilfe des Programms Origin (Version 8.5) die sogenannte Gleichgewichts-Dissoziationskonstante ermittelt werden (K_D-Wert). Laut [23] binden Aptamere normalerweise mit einer Gleichgewichts-Dissoziationskonstante zwischen 10 pM und 10 µM. Der K_D-Wert gibt an, auf welcher Seite der Reaktion zwischen Aptamer und Target sich das Gleichgewicht einstellt. Je kleiner der Wert dieser Konstante, desto höher ist die Affinität des Aptamers zu seinem Target. Für die A549 Zelllinie ergab sich ein K_D-Wert von 16 nM. Damit ist das eingesetzte Aptamer hoch affin für die Zielzelllinie. Der K_D-Wert berechnet sich wie folgt:

$$K_D = \frac{[Target] * [Aptamer]}{[Aptamer - Target - Komplex]} [\frac{mol}{L}]$$

Nachfolgend sind die Bindungskurven für die Ziel- und Kontrollzelllinie abgebildet.

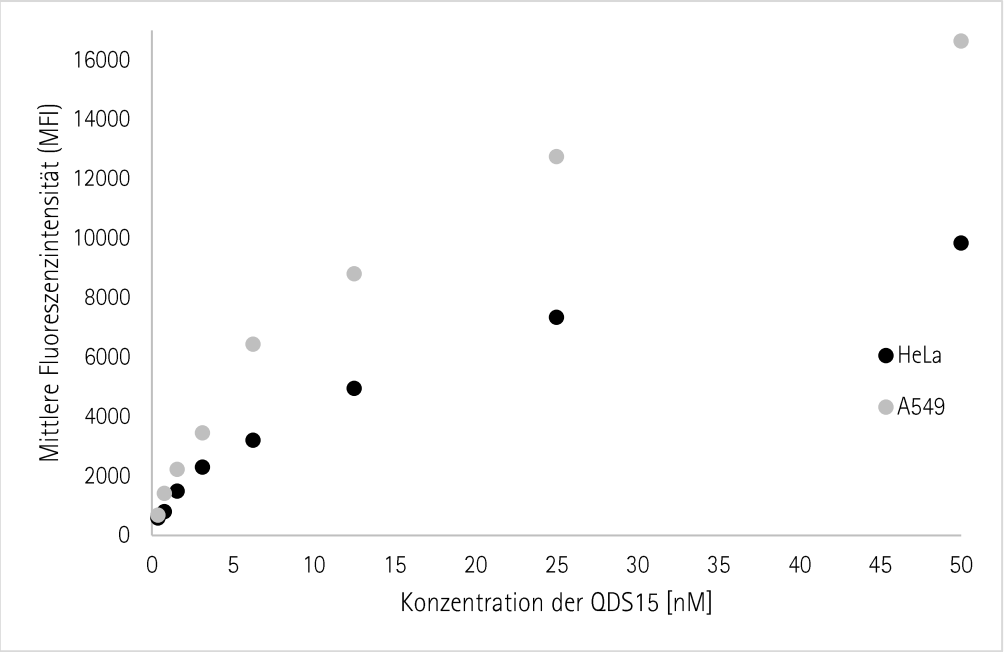

Abbildung 55: Bindungskurven für das S15 Aptamer an die Zielzelllinie A549 und die Kontrollzelllinie HeLa.

Wie aus Abbildung 55 hervorgeht, zeigen die QDS15 Konjugate eine erhöhte Affinität gegenüber der Zielzellinie. Auch gegenüber der HeLa Zelllinie zeigt das S15 Aptamer eine erhöhte Affinität. Die Affinität des S15 Aptamers an die A549 Zellen ist jedoch, gerade im höheren Konzentrationsbereich bei 50 nM), um etwa 58 % höher Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Frau Kuhlmeier. Möglicherweise wird die Zielstruktur des S15 Aptamers von beiden Zellen exprimiert, von den A549 Zellen aber vermehrt. Die Bindung der QDS15 Konjugate an die Zellen wurde abschließend noch einmal über Konfokalmikroskopie verifiziert. Hierfür mussten die Zellen nicht von ihrer Kulturoberfläche abgelöst werden. Die Aufnahmen sind in nachfolgender Abbildung zu sehen. Dabei wurden die Zellen wieder zunächst mit den QD S15 Konjugat-Lösungen für 2 h inkubiert und anschließend deren Zellkerne mittels Hoechst-Färbung angefärbt.

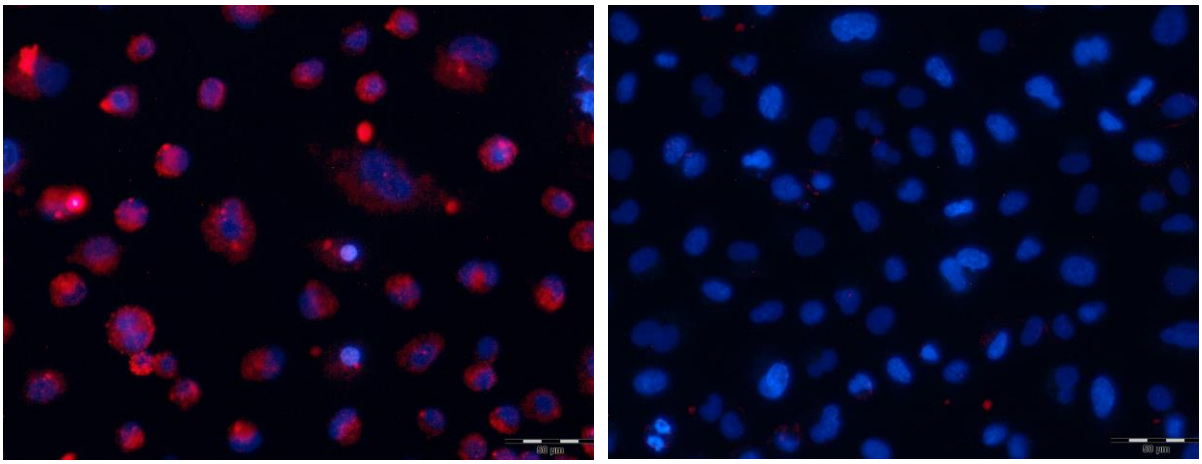

Abbildung 56: A549 Zellen inkubiert mit QDS15 (links) und anschließender Hoechst-Färbung (blau gefärbte Zellkerne); Rechts: A549 Zellen mit QDRnd inkubiert und anschließender Hoechst Färbung.

Abbildung 56 zeigt, dass die mit S15 gekoppelten QDs spezifisch an die A549 Zellen binden (links), wohingegen die mit dem Random-Oligonukleotid gekoppelten QDs keine solche spezifische Bindung an die Zielzellen aufweisen (rechts). Die Kontrollzelllinie wurde ebenfalls bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit S15 gekoppelten QDs sowie mit Rnd gekoppelten QDs inkubiert. Wie in Abbildung 57 zu sehen, weisen die QDRnd keine spezifische Bindung an die Negativkontrollzellen auf. Die mit dem S15 Aptamer gekoppelten QDs jedoch binden ebenfalls, entgegen den Erwartungen an die HeLa Zellen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Frau Kuhlmeier sowie mit den ermittelten Bindungskurven. Dies verstärkt die Vermutung, dass beide Krebszelllinien die Zielstruktur des S15 Aptamers auf ihrer Oberfläche exprimieren, die A549 Zellen jedoch vermehrt.

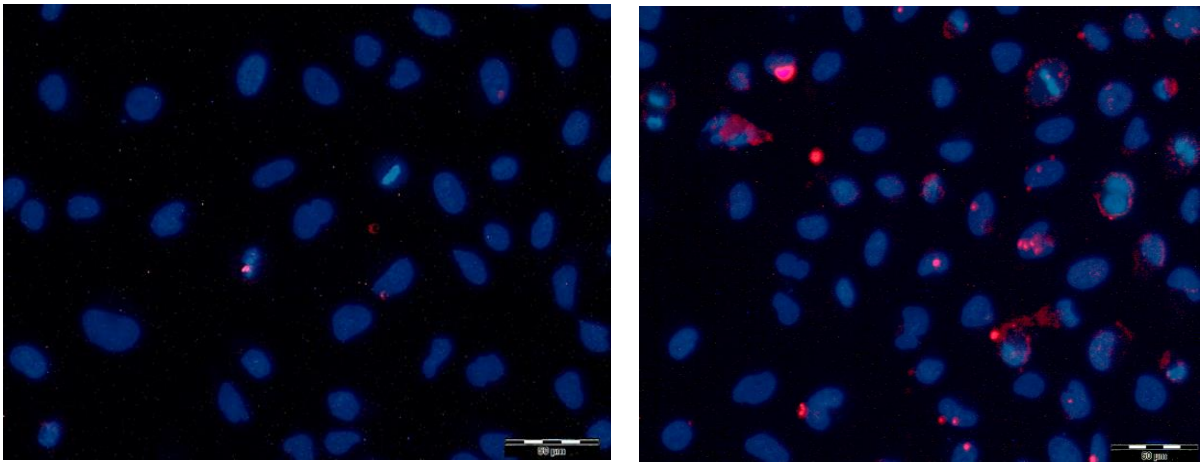

Abbildung 57: links: HeLa Zellen inkubiert mit QDRnd und anschließender Hoechst-Färbung (blau gefärbet Zellen); rechts: HeLa Zellen inkubiert mit QDS15 und anschließender Hoechst-Färbung.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass auf zwei verschiedenen Wegen die Bindung des S15 Aptamers an die A549 Zellen gezeigt werden konnte. Allerdings konnten auch unspezifische Bindungen an die Kontrollzelllinie HeLa nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund könnte sein, dass das Target des S15 Aptamers ein Rezeptor oder Protein auf der Oberfläche der Zellen ist, das

oder der bei Krebszellen überexprimiert wird. Diese Bindung an sich ist für den klinischen Einsatz unproblematisch – allerdings muss geklärt werden, ob die unspezifische Bindung auch an gesunden Zellen auftritt. Es wurden Bronchialepithelzellen der Zelllinie BEAS2B mit QDS15 Konjugaten inkubiert. Bei den BEAS2B Zellen handelt es sich um gesunde Zellen des Bronchialepithelgewebes. Sie eignen sich daher als Negativkontrolle für die A549 Tumorzellen, die ebenfalls Epithelzellen sind.

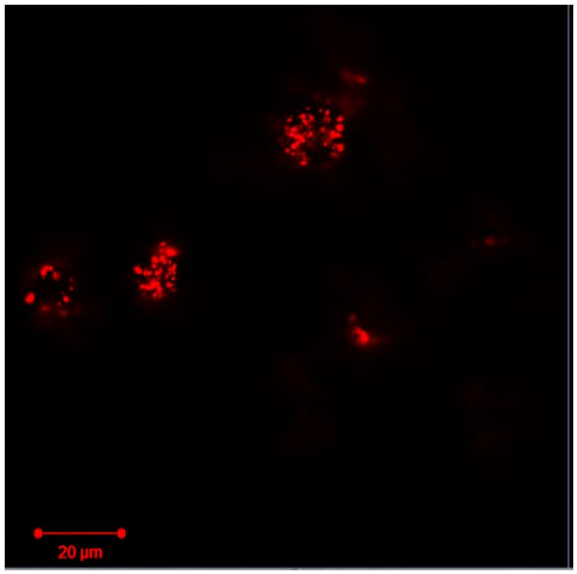

Abbildung 58: BEAS2B Zellen, inkubiert mit S15 gekoppelten QDs. Diese Experimente wurden von Frau Engelberg am Technion durchgeführt. Hier fand keine Zellkernfärbung statt.

In Abbildung 58 ist deutlich zu sehen, dass die S15 gekoppelten QDs ebenfalls an gesunde Zellen binden. Dies bedeutet, dass auch hier unspezifische Bindungen stattfinden.

Ein weiterer möglicher Grund könnte eine zu hohe Dichte der Aptamere auf der Oberfläche der QDs sein. Diese betrug 25 Aptamere pro Partikel. Wenn die Dichte der Aptamere auf den Partikeln zu hoch ist, kann es sein, dass sich die Aptamere aufgrund sterischer Hinderungen nicht korrekt falten und somit ihr Target nicht binden können [118–120, 140]. Das Verhältnis von Partikel zu Aptamer musste also in weiteren Versuchen reduziert werden. Daher wurden im Folgenden nur noch 5 Aptamere pro Partikel immobilisiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter 6.2.4 nachzulesen.

Nachfolgende Abbildung zeigt die drei verschiedenen Zelllinien (A549, HeLa und BEAS2B), die mit QDS15 (1:5 statt 1:25) inkubiert wurden.

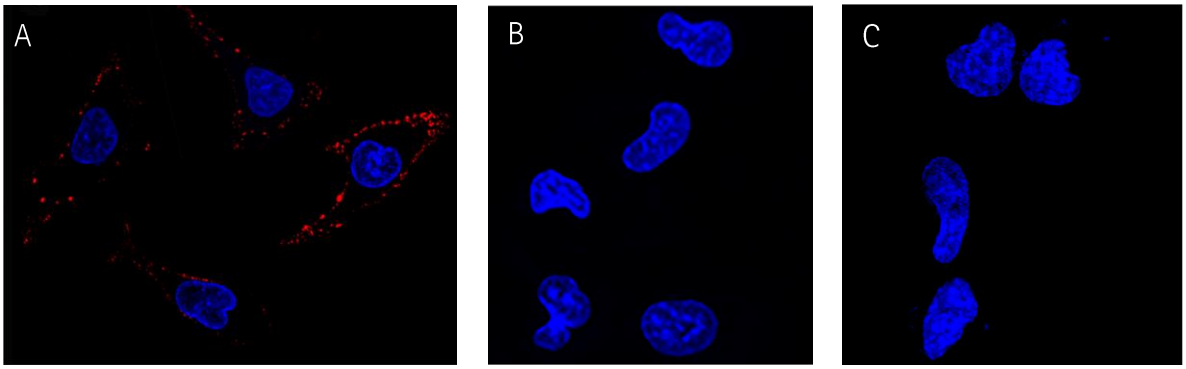

Abbildung 59: A) A549 Zellen inkubiert mit QDS15, wobei die Dichte des Aptamers reduziert wurde. Dasselbe gilt für B) BEAS2B Zellen und C) HeLa Zellen. Auch diese Experimente wurden am Technion durchgeführt.

Abbildung 59 zeigt, dass nur die Zielzellen A549 die Quantum Dots binden, die mit reduzierter Aptamermenge modifiziert wurden. Sowohl die BEAS2B Zellen als auch die HeLa Zellen weisen keine Bindungen der QDs mehr auf. Somit war der Grund für die unspezifischen Bindungen vermutlich die hohe Aptamerdichte auf den Quantum Dots. Die große Menge an Aptamer auf der Oberfläche der Quantum Dots hat, wie oben erwähnt, dafür gesorgt, dass die Aptamere nicht korrekt gefaltet werden konnten. Somit wurden vermutlich alle ähnlichen Oberflächenstrukturen auf den Zellen der A549 und HeLa Zelllinie von den nicht vollständig gefalteten Aptameren gebunden. Nach der erfolgreichen Aufnahme der QDs mit reduzierter, immobilisierter Aptamermenge wurden daher alle nachfolgenden Experimente mit Partikeln mit einer Aptamerdichte von 1:5 durchgeführt. Im Folgenden wird die zelluläre Aufnahme von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln charakterisiert.

4.2.4 Zelluläre Aufnahme von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln

Die Untersuchung der Internalisierung der modifizierten Partikel in die Zellen fand sowohl im Rahmen der Masterarbeit von Torsten Schüling[14] als auch in Kooperation mit Shira Engelberg statt. Dabei wurde die Internalisierung von S15 modifizierten Quantum Dots durch die Lungenkrebszelllinie A549 untersucht. In weiteren Experimenten wurden außerdem verschiedene Inkubationszeiten gewählt und beobachtet, wie weit die QDS15 Konjugate in die Zelle aufgenommen wurden. Als Kontrollzelllinie dienten wieder HeLa Zellen.

Für die Untersuchung der Internalisierung der QDS15 Konjugate wurden A549 und HeLa Zellen in Zellkammern mit Polylysin-beschichteten Glasplatten für 48 h inkubiert. Das alte Medium wurde entfernt und die Zellen mit pHrodo™ Green Dextran, einem Indikator für Endozytose, sowie mit modifizierten QDs inkubiert. Die Fluoreszenzintensität des Dextrans ist abhängig vom vorliegenden pH-Wert. Diese ist bei neutralem pH-Wert, wie er außerhalb der Zelle vorliegt sehr gering. Wird der

[14] Untersuchungen zum Zell-Targeting und zur zellulären Aufnahme von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln; 2017

Farbstoff jedoch über Endozytose in die Zelle aufgenommen, sinkt der pH-Wert dort in den sauren Bereich ab (pH 4.5) und das Dextran leuchtet grün. Folgende Abbildung zeigt den Anstieg der Fluoreszenz des pHrodo™ Dextrans mit sinkendem pH-Wert.

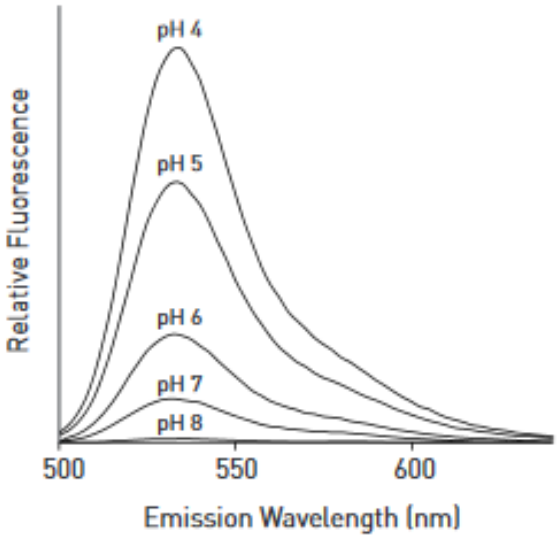

Abbildung 60: Fluoreszenzemissionsspektrum des pHrodo™ Green Farbstoffs [141].

Um zu überprüfen, ob der Farbstoff von beiden Zelllinien über Endozytose aufgenommen wird (und somit als Positivkontrolle dienen kann), wurden sowohl A549 Zellen als auch HeLa Zellen mit Dextran inkubiert. Abbildung 61 zeigt eine deutliche grüne Färbung der A549 und der HeLa Zellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Zelllinien das Dextran über Endozytose aufgenommen haben.

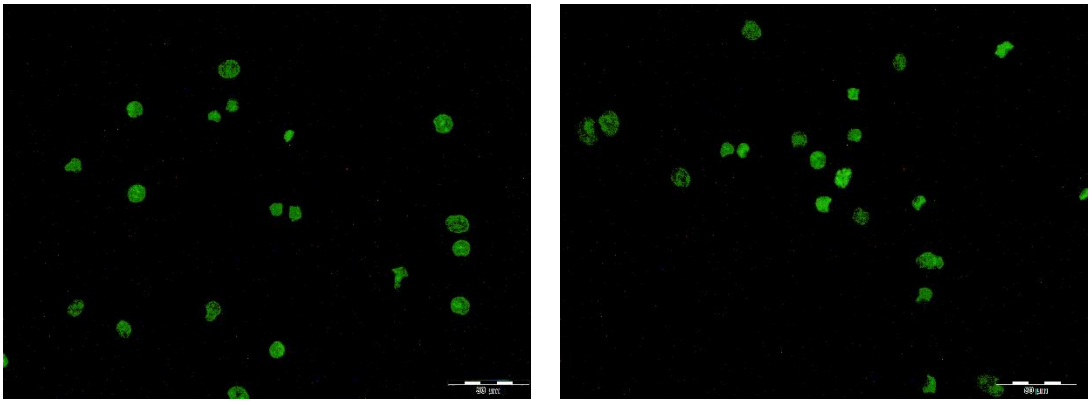

Abbildung 61: A549 (links) und HeLa Zellen (rechts) nach Inkubation mit pHrodo™ Green Dextran.

Um zu zeigen, dass die modifizierten QDs über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden, wurden die Zellen sowohl mit Dextran als auch den QDs inkubiert. Zunächst wurden die A549 Zellen für 2 h mit QD Lösungen inkubiert und anschließend 15 min mit Dextran versetzt. Die Zellkerne wurden nach Entfernen der Dextran Lösung mit Hoechst®33342 angefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Dabei konnten die drei verschiedenen

Fluoreszenzen (QDs, Dextran und Hoechst) getrennt durch unterschiedliche Filter analysiert werden. Das Emissionsmaximum des Dextrans liegt bei 533 nm, das Maximum des Hoechstfarbstoffes bei 465 nm und das Maximum der QDs bei 655 nm.

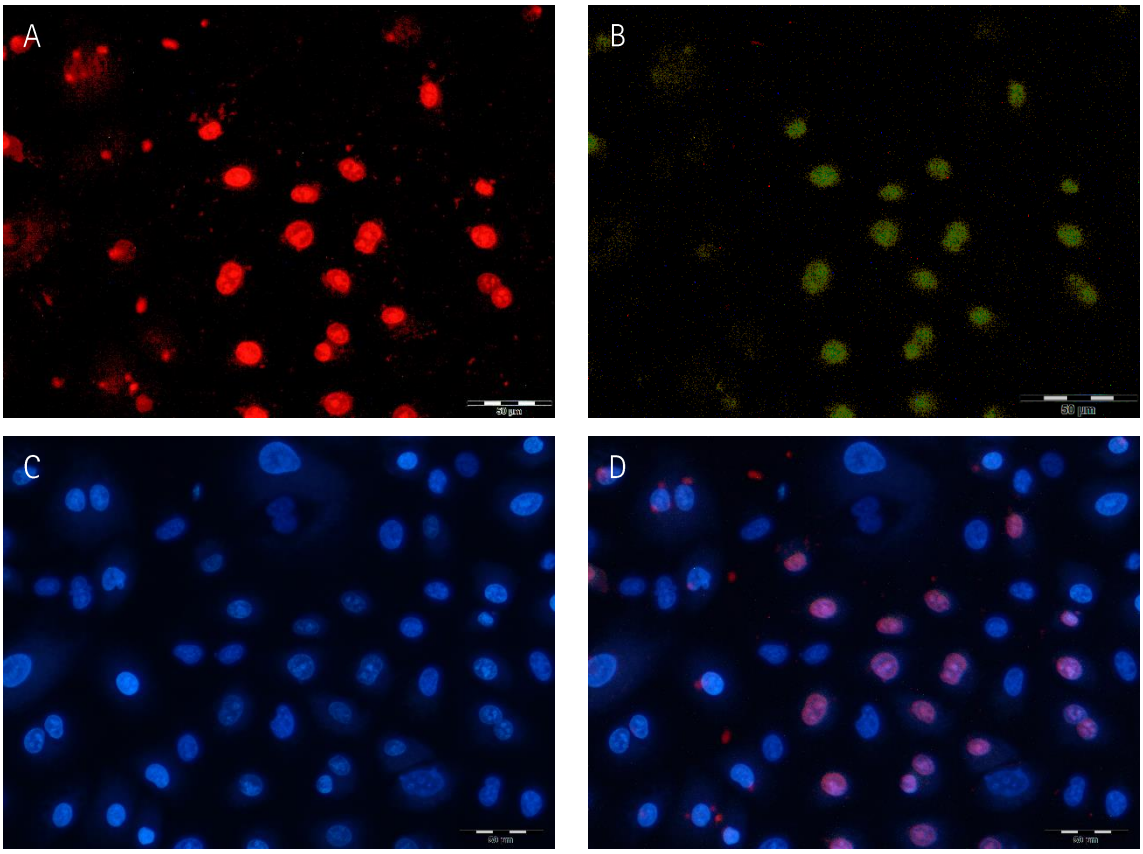

Abbildung 62: A549 Zellen zuerst inkubiert mit A) QDS15; anschließend mit B) pHrodo™ Green Dextran; und abschließend mit C) Hoechst®33342. In D) sind alle Bilder (Farbfilter) vereinigt.

In Abbildung 62 sind die A549 Zellen nach der Inkubation mit den QDS15 Konjugaten zu sehen (A). B) zeigt die A549 Zellen, die das Dextran aufgenommen haben. Da die Zellkerne sowohl eine rote als auch eine grüne Färbung aufweisen, lässt sich vermuten, dass auch die QDs über Endozytose in die Zellen aufgenommen wurden. Dieses Ergebnis sollte zur Verifizierung mittels Konfokalmikroskopie überprüft werden. Die Überlagerung aller drei Fluoreszenzfilter (D) zeigt, dass sich das Dextran und die QDS15 Konjugate an der gleichen Stelle innerhalb der Zellen befinden, was ebenfalls für die Vermutung spricht, dass die Konjugate über Endozytose in die Zellen aufgenommen wurden. Nach Bindung der Liganden an die Rezeptoren der Zellmembran, bilden sich Vertiefungen in der Zellmembran und die Abschnürung einzelner Vesikel beginnt. Die abgeschnürten Vesikel bewegen sich entlang des Zytoskeletts zur Zielmembran. Es ist jedoch unklar, wie lange die Zellen zur Abschnürung und zum Transport der Vesikel (mit den darin enthaltenen Quantum Dots) benötigen. Außerdem ist in Abbildung 62 auch zu beobachten, dass nicht alle Zellen die Konjugate aufgenommen haben. Die Zeit, die eine Zelle zur Endozytose benötigt, ist von verschiedenen Faktoren, wie der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche oder der Größe der einzukapselnden Partikel,

abhängig. Der Grund dafür, dass nicht alle Zellen die Konjugate aufgenommen haben, kann möglicherweise mit einer unterschiedlichen Beschaffenheit der Zellen bzw. deren Oberflächen zusammenhängen. Bildet eine Zelle weniger Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, erfolgt die Endozytose langsamer [142, 143]. Somit wurden in einem weiteren Experiment verschiedene Inkubationszeiten zur Beobachtung einer möglichen Bewegung der Konjugate hin zum Zellkern gewählt. Das Experiment wurde mit Inkubationszeiten zwischen 10 min und 6 h (durch Shira Engelberg) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 63 dargestellt.

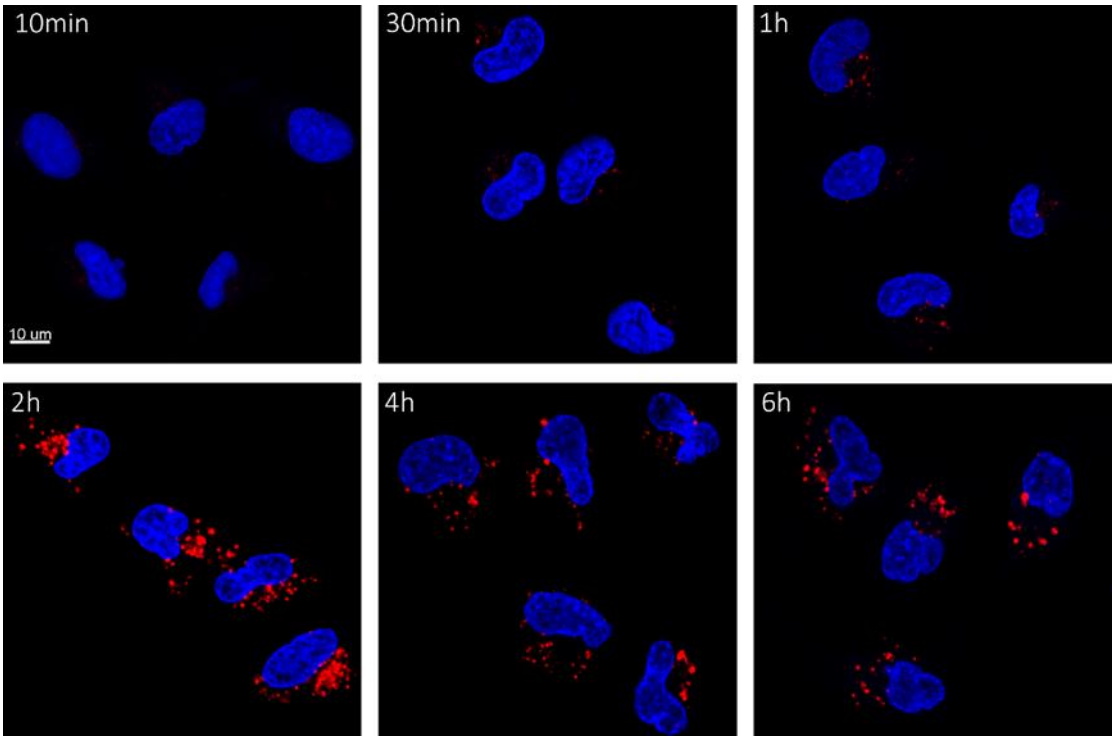

Abbildung 63: A549 Zellen wurden mit QDS15 für 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Die Charakterisierung fand mittels Konfokalmikroskopie statt.

Abbildung 63 zeigt die A549 Zellen, die für unterschiedliche Zeiten mit QDS5 Konjugaten inkubiert wurden. Dabei lässt sich feststellen, dass die Aufnahme der Konjugate nach etwa 30 min beginnt. Bei 10 min Inkubationszeit sind keine QDS15 Konjugate zu sehen. Nach 1 h, 4 h und 6 h Inkubationszeit sind ebenfalls Konjugate in den Zellen zu erkennen. Das Maximum an aufgenommenen Konjugaten lässt sich jedoch schon nach 2 h beobachten. Dies ist auch anhand einer grafischen Darstellung in Abbildung 64 zu sehen. Dort ist das Maximum nach 2 h Inkubation erreicht, danach tritt eine Sättigung der Fluoreszenz ein. Somit ist davon auszugehen, dass die Zellen für mindestens 2 h mit den QDS15 Konjugaten inkubiert werden müssen, damit die Partikel in ausreichender Menge in den Zellen vorhanden sind.

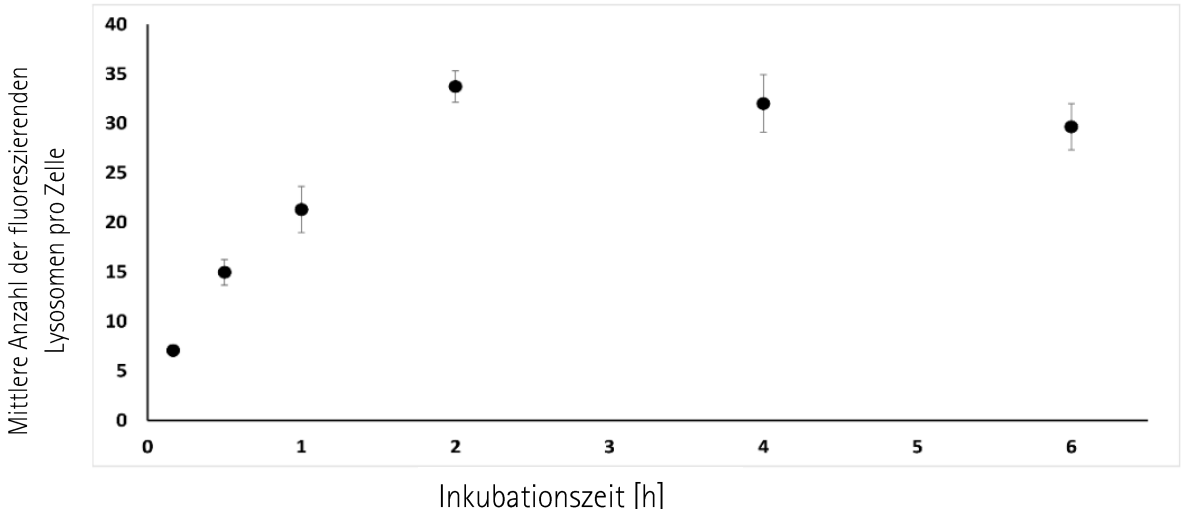

Abbildung 64: Quantifizierung der Zellen, die die QDS15 Konjugate aufgenommen haben [144].

Abschließend wurde der genaue Mechanismus der zellulären Internalisierung in Kooperation mit Shira Engelberg untersucht [144]. Um zu bestimmen, ob die S15 modifizierten Partikel über einen bestimmten Endozytoseweg (z.B. die Rezeptorvermittelte Endozytose) in die Zellen aufgenommen werden, wurden verschiedene Inhibitor-Lösungen eingesetzt.

Es gibt verschiedene Inhibitoren für die unterschiedlichen Endozytosewege. Die Pinozytose kann beispielsweise durch eine Amilorid Lösung inhibiert werden. Filipin hemmt den Caveolae abhängigen Endozytoseweg. Die Zellen wurden also zunächst mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert und anschließend mit den QDS15 Konjugaten. Bei der Inkubation mit Cytochalasin D, einem Endozytose-Inhibitor, konnte festgestellte werden, dass die QDS15 Konjugate kaum in die Zellen gelangen konnten. Somit kann dies als weiterer Beweis für die Internalisierung über Endozytose angesehen werden. Bei der Inkubation mit Amilorid konnte beobachtet werden, dass die Konjugate weiterhin in die Zellen aufgenommen wurden; ebenso bei der Inkubation mit den Inhibitorlösungen für den Caveloae-abhängigen (Filipin). Das bedeutet, dass die Konjugate nicht über die Pinozytose und den Caveloae-vermittelten Endozytoseweg in die Zellen aufgenommen werden. Wurden die Zellen dagegen zunächst mit Dynasore und dann mit den Konjugaten inkubiert, zeigte sich eine deutliche Verminderung in der Fluoreszenz innerhalb der Zellen. Um die Vermutung zu untermauern, dass die Konjugate über den Rezeptorvermittelten Endozytoseweg in die Zellen gelangen, wurden sie außerdem mit Pistop 2, einem weiteren Inhibitor für denselben Endozytoseweg, inkubiert. Im Folgenden wurde keine Fluoreszenz innerhalb der Zellen festgestellt, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die Konjugate über den Rezeptorvermittelten Endozytoseweg aufgenommen werden. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse dieser Experimente.

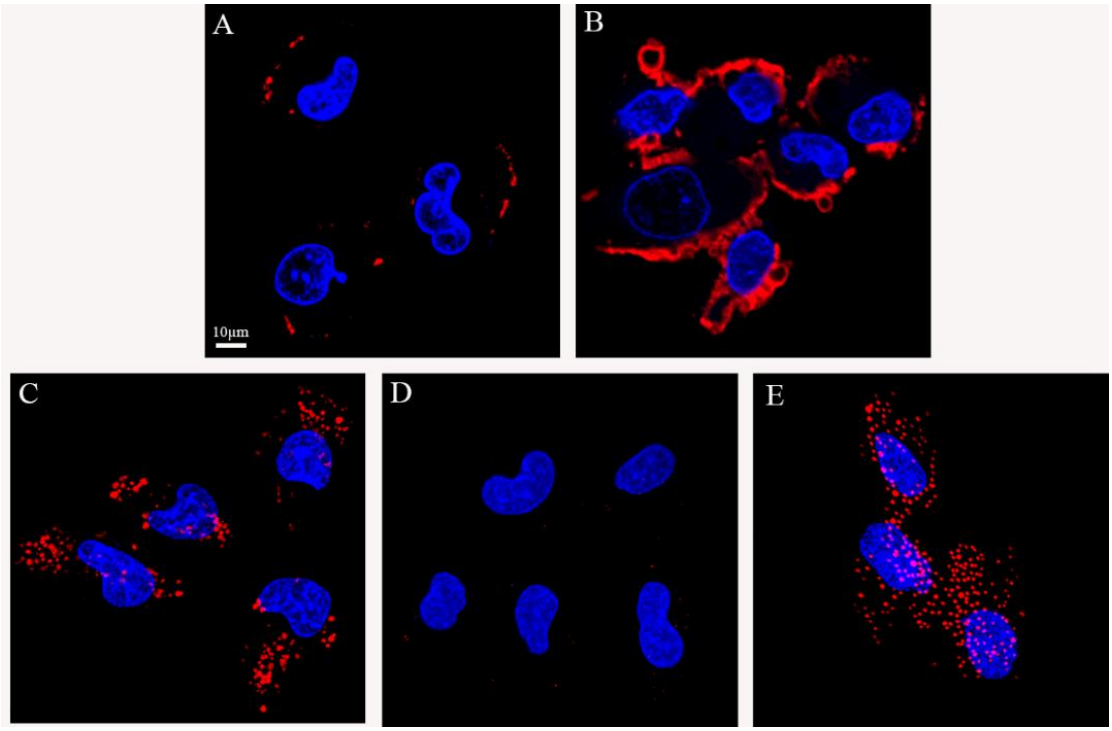

Abbildung 65: A549 Zellen behandelt mit A) Cytochalasin D, B) Amilorid, C) Filipin, D) Dynasor und E) nur mit Medium. Anschließend wurden die QDS15 Konjugate hinzugegeben.

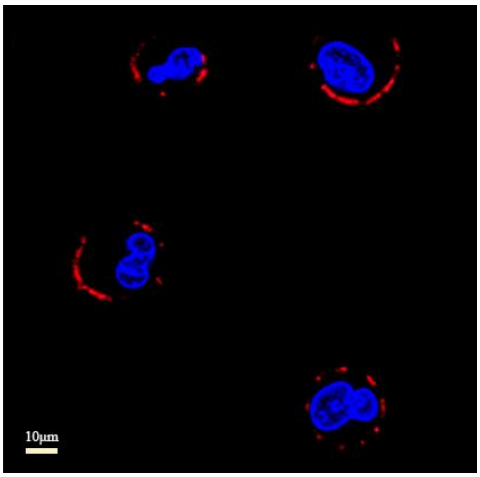

Abbildung 66: A549 Zellen mit Pitstop 2 behandelt und anschließend mit QDS15 inkubiert.

Die Experimente zur zellulären Aufnahme wurden mit den QDs aufgrund ihrer besseren Detektierbarkeit durchgeführt. Diese sollen nun auch auf das entwickelte TDDS übertragen werden. Ein entscheidender Nachteil der PEG-PCL Nanopartikel ist jedoch ihre schlechte Visualisierbarkeit. Sie besitzen keine Eigenfluoreszenz und können daher nicht im Fluoreszenzmikroskop nachverfolgt werden. Weiterhin werden so kleine Mengen an Wirkstoff eingekapselt, dass auch dieser, obwohl fluoreszent, nicht am Mikroskop nachgewiesen werden kann. Daher wurde für die Experimente zur zellulären Aufnahme der Nanopartikel auf eine indirekte Methode zurückgegriffen. Durch den Membranfarbstoff CellMask™ Green Membrane Stain wird die Zellmembran angefärbt. Während der

Endozytose bildet die Zellmembran Einstülpungen durch die Vesikelbildung (Kapitel 3.1.2.5). Dies sollte, bei einer Färbung der Membran, zu fluoreszierenden Vesikeln führen, die dann am Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden können. Daher wurden die Zellen zunächst mit dem mit PEG-PCL Nanopartikel-Aptamer-Konjugaten und anschließend mit dem Membranfarbstoff inkubiert. Falls die Polymer-Nanopartikel-Aptamer-Konjugate über Endozytose aufgenommen werden, sollten also kleine Einstülpungen an der Zellmembran zu sehen sein.
Als Positivkontrolle dienten A549 Zellen, die mit QDS15 Konjugaten inkubiert wurden als auch A549 Zellen, die mit Dextran inkubiert wurden.

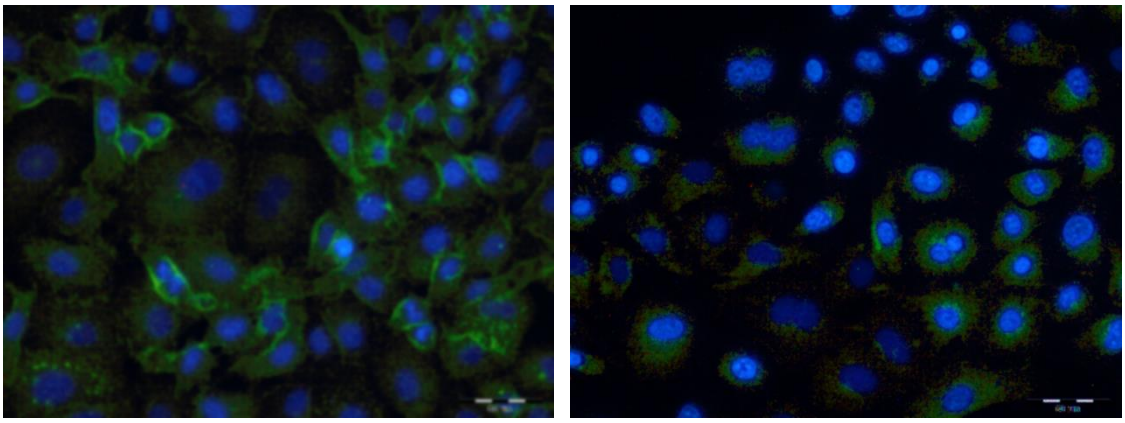

Abbildung 67: A549 Zellen nach Inkubation mit CellMask™ Green Membrane Stain (links) und pHrodo™ Green Dextran (rechts).

Wie in Abbildung 67 zu sehen, wurden die Zellmembranen der A549 Zellen erfolgreich gefärbt (links). Allerdings ist der Unterschied zur Positivkontrolle (rechts) gering. Sowohl die mit CellMask™ als auch die mit Dextran inkubierten Zellen zeigen eine grüne Färbung. In Abbildung 67 links sind einige Zellmembranen stärker gefärbt als in Abbildung 67 rechts. Dies sind möglicherweise abgeschnürte Vesikel in der Membran, in denen sich die aufgenommenen Polymer-Nanopartikel befinden. Um die Vermutung zu bestätigen, wurde in einem weiteren Versuch die Konzentration des Membranfarbstoffes verringert, da dieser möglicherweise ein Grund dafür war, dass kaum ein Unterschied zwischen den Färbungen mit CellMask™ und Dextran sichtbar war. Allerdings zeigte sich das gleiche Ergebnis und daher eignet sich CellMask™ weniger zur Detektion der abgeschnürten Vesikel.
Aus der Literatur geht hervor, dass Polymerpartikel abhängig von ihrer Ladung und Größe über den Rezeptorvermittelten oder Caveolae-abhängigen Endozytoseweg in die Zellen aufgenommen werden [145]. Partikel mit einer Größe von etwa 100 nm werden üblicherweise über den Rezeptorvermittelten Endozytoseweg aufgenommen [86]. Außerdem ist es, aufgrund des verwendeten S15 Aptamers wahrscheinlich, dass die Polymer-Nanopartikel über Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche, über diesen Endozytoseweg aufgenommen werden. Es muss aber in zukünftigen Experimenten geklärt werden, ob die Partikel über den

Rezeptorvermittelten Endozytoseweg in die Zellen aufgenommen werden. Diese Experimente waren jedoch nicht mehr Teil der vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung des TDDS erfolgreich war. Es konnte die Spezifität des *Targeting* Liganden bewiesen werden. Dieser muss in einer bestimmten Menge auf den Partikeln immobilisiert werden, da sonst unspezifische Bindungen an Nicht-Zielzellen entstehen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die modifizierten Qunatum Dots über den Rezeptor-vermittelten Endozytoseweg in die Zellen gelangen. Abschließend wurde das optimierte TDDS noch einmal hinsichtlich seiner Toxizität an den Zielzellen untersucht. Dies ist in nachfolgendem Kapitel dargestellt.

4.2.5 Untersuchung der Toxizität des optimierten TDDS

Abschließend wurde die Toxizität des optimierten TDDS auf die Zellen untersucht. Dazu wurden A549 und HeLa Zellen mit den PEG-PCL Nanopartikeln ohne eingekapselten Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer inkubiert. Außerdem wurden beide Zelllinien mit PEG-PCL Nanopartikeln mit eingekapseltem Wirkstoff und immobilisiertem Aptamer inkubiert. Als Wirkstoff wurde in diesem Fall PTX eingekapselt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung zu sehen.

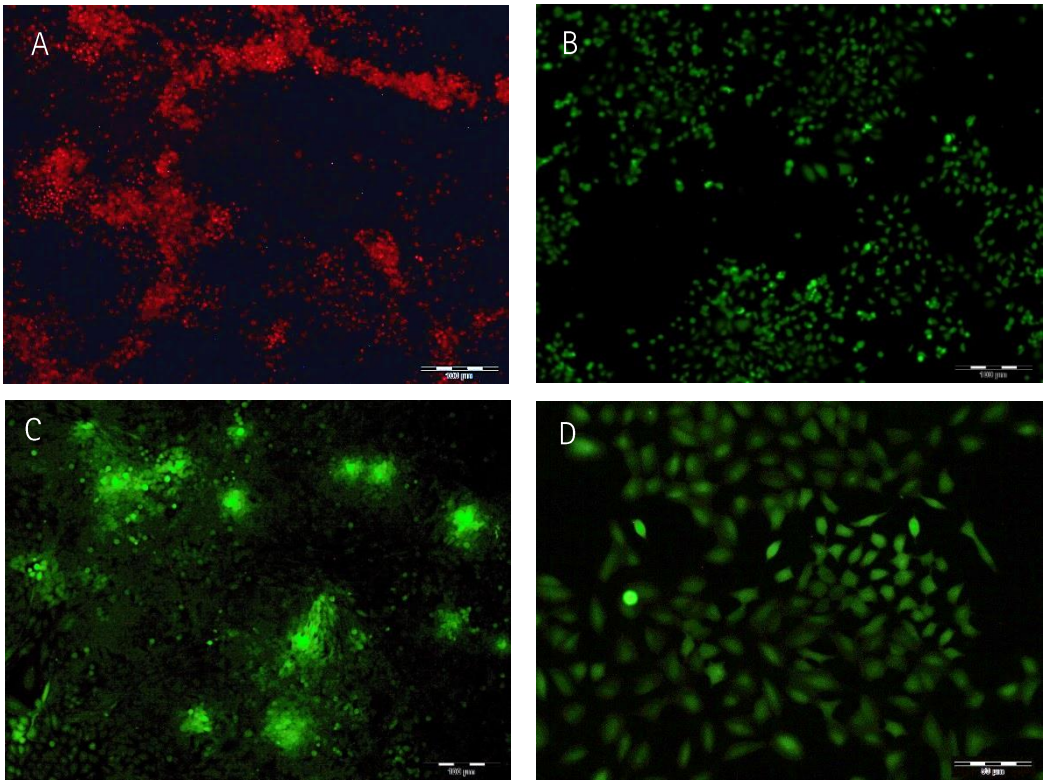

Abbildung 68: A: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL-S15(PTX); B: HeLa Zellen inkubiert mit PEG-PCL-S15(PTX); C: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL Partikeln; D: HeLa Zellen inkubiert mit PEG-PCL Partikeln. Anschließend wurden die Zellen mit Calcein-AM und Propidiumiodid gefärbt.

Die Viabilität der Zellen wurde mittels Calcein-AM/ Propidiumiodidfärbung bestimmt. Calcein-AM (grüne Färbung) färbt nur lebende Zellen an, da diese in der Lage sind, durch Enzymaktivität die „AM-Gruppen" (Acetoxymethylgruppe) abzuspalten. Das verbleibende Calcein komplexiert Calciumionen, was in der grünen Fluoreszenz resultiert. In Abbildung 68 A ist zu sehen, dass die A549 Zellen, die mit Aptamer-funktionalisierten und PTX beladenen Partikeln inkubiert wurden, eine rote Färbung aufweisen. Dies charakterisiert tote Zellen (vgl. 6.2.9.1). Die Kontrollzelllinie HeLa (B) zeigt eine grüne Färbung, so dass davon auszugehen ist, dass die Partikel nicht an die Zellen gebunden haben. Dies ist auch damit zu begründen, dass das S15 Aptamer nur spezifisch für die A549 Zelllinie ist und somit zu erwarten war, dass die Zellen der Kontrollzelllinie diese Inkubationsbedingung überlebt.

Im Folgenden und abschließenden Versuch dieser Arbeit wurde das optimierte TDDS mit eingekapseltem CPT an A549 Zellen getestet. Dazu wurden diese in 96 Wellplatten bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit den mit Aptamer und randomisierter Oligonukleotidsequenz modifizierten und CPT beladenen Nanopartikeln für 24 h inkubiert und ihre Viabilität mittels CellTiterBlue® Färbung (6.2.9.2) charakterisiert. Die Ergebnisse sind folgender Abbildung zu entnehmen.

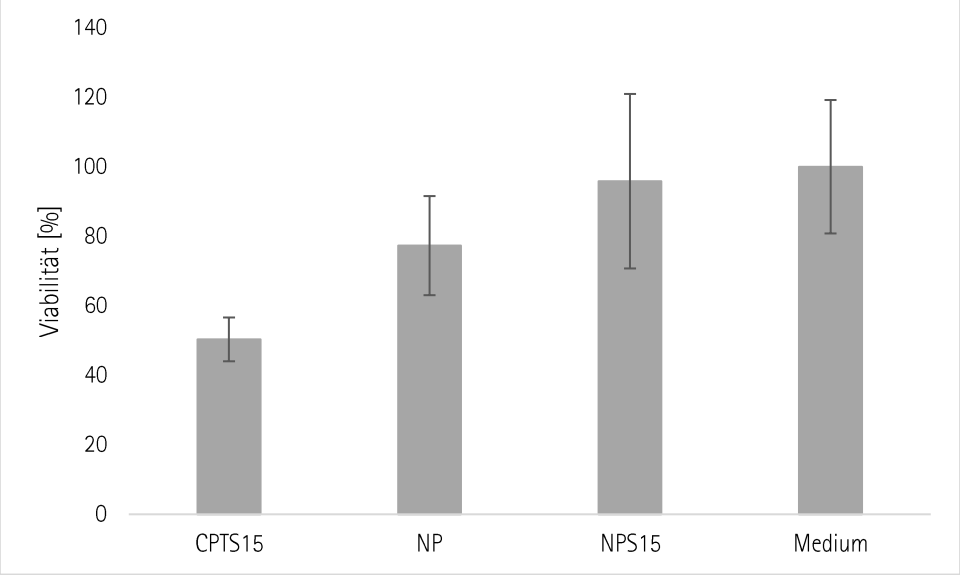

Abbildung 69: Viabilität der A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit modifizierten und wirkstoffbeladenen Nanopartikeln (CPTS15). Als Kontrolle dienen Polymer-Nanopartikel ohne Wirkstoff und immobilisierten Aptameren (NP), Polymer-Nanopartikel mit immbolisierten Aptameren (NPS15) und serumfreies Zellkulturmedium.

Abbildung 69 zeigt, dass die Zellen, die mit modifizierten und wirkstoffbeladenen Nanopartikeln (CPTS15) inkubiert wurden, eine Viabilität von etwa 50 % aufweisen. Die unbeladenen, aber modifizierten Partikel (NPS15) haben keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Die Viabilität dieser Zellen liegt bei etwa 87 %. Dies könnte daran liegen, dass die Partikel ursprünglich

in deionisiertem Wasser gelöst sind und auch nach dem Überführen der Partikel in Zellkulturmedium immer noch eine geringe Restmenge Wasser auf die Zellen gelangt ist. Weiterhin ist bekannt, dass Nanopartikel in Zellkulturmedium weniger stabil sind und dazu tendieren, Aggregate bzw. Agglomerate auszubilden. Dies kann unter anderem ein Grund für die eingeschränkte Viabilität der Zellen sein [146, 147]. Nanopartikel mit immobilisiertem Aptamer keine signifikant verminderte Zellviabilität. Dies spricht dafür, dass die Aptamere die Nanopartikel stabilisieren und sich somit keine Aggregate ausbilden, die toxisch auf die Zellen wirken [147]. Werden die Standardabweichungen betrachtet, lässt sich jedoch feststellen, dass es bei den Zellkulturtechniken noch Optimierungsbedarf gibt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *Targeted Drug Delivery* Systems. Dies kann als erfolgreich bewertet werden. Das TDDS konnte außerdem erfolgreich optimiert werden. Die Freisetzung des eingekapselten Wirkstoffes fand bevorzugt bei sauren pH-Werten statt. Weiterhin konnte der verwendete spezifische Ligand, das S15 Aptamer, erfolgreich auf der Oberfläche der Partikel immobilisiert werden. Die Aufnahme von QDS15 Konjugaten als Modellpartikel in die Zellen konnte charakterisiert werden und es gibt Hinweise darauf, dass auch das entwickelte TDDS über die Rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen gelangen. Erste Untersuchungen des TDDS hinsichtlich der Viabilität der Zellen, zeigen, dass das TDDS toxisch auf die Zellen wirkt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines von der *Hannover School for Biomolecular Drug Research* (HSBDR) geförderten Promotionsstipendiums am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Teile der Arbeit wurden innerhalb eines von der Volkswagen Stiftung geförderten Kooperationsprojekts mit dem Technion in Haifa, Israel durchgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Modellsystems für das *Targeted Drug Delivery*. Das System besteht aus einem Träger, einem eingekapselten Wirkstoff sowie spezifischen Liganden. Bei dem Träger handelt es sich um Polymer-Nanopartikel. Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst die Polymere hergestellt. Der Erfolg der Polymersynthese wurde mittels ^{1}H NMR bestätigt. Anschließend konnten aus diesen Polymeren über das *Solvent Evaporation* Verfahren Nanopartikel hergestellt werden (Kapitel 4.1.2). Bei den Polymeren handelt es sich um Methoxy-Polyethylenglykol-Polycaprolacton (mPEG-PCL) und HOOC-PEG-PCL, zwei biokompatible und biodegradable Polymere, die in anderen Zusammensetzungen bereits für *Drug Delivery* Systeme in der Forschung und Klinik eingesetzt werden. Um eine Suspension von Partikeln mit einheitlicher Größe zu erhalten, wurde die Herstellung in mehreren Schritten optimiert. Dazu wurden sowohl die Homogenisationsdauer als auch die Rührparameter angepasst. Die Größenverteilung wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Dabei wurde angestrebt, dass die Partikel einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 50 und 150 nm aufwiesen. Dies ist die ideale Größe für Nanoträger, um nicht von den Nieren oder der Leber aus dem Blutkreislauf herausgefiltert zu werden, sondern sich in den Zielzellen anreichern zu können. Nach Optimierung der Herstellung lagen die Partikel als monodisperse Suspension mit einer Größe von etwa 80 nm vor. Die Konzentration der Partikel wurde über die *Nanoparticle Tracking* Analyse bestimmt und betrug etwa 4,2 nM. Die Morphologie der Partikel wurde mittels TEM charakterisiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Partikel eine gleichmäßige, runde Form aufweisen.

Der nächste Schritt war die Einkapselung von verschiedenen Wirkstoffen. Dabei lag der Fokus zunächst darauf, hydrophobe Wirkstoffe in ausreichender Menge in die Partikel einzukapseln. Die Einkapselungseffizienz wurde zunächst über die HPLC, später über Fluoreszenzspektrophotometrie bestimmt. Zu Beginn der Experimente wurde Paclitaxel eingekapselt, dabei ergaben sich jedoch Schwierigkeiten bei der Detektion, da dieser Wirkstoff keine Fluoreszenzeigenschaften besitzt. Die Einkapselung des Wirkstoffes war dennoch erfolgreich und es konnten 9 nmol/nmol Partikel in die Polymer-Nanopartikel eingekapselt werden. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde Camptothecin verwendet. Dies ist ein fluoreszenter, hydrophober Wirkstoff. Dieser konnte ebenfalls erfolgreich

(3,3 nmol) in die Nanopartikel eingekapselt werden. In einen Partikel wurden dabei etwa 2000 Moleküle Wirkstoff integriert.

Nachdem der Wirkstoff erfolgreich in die Partikel gebracht werden konnte, wurde die Lagerstabilität der Nanopartikel bei unterschiedlichen Temperaturen über einen Zeitraum von 30 Tagen untersucht. Es zeigte sich, dass die Partikel über einen Zeitraum von 30 Tagen bei 37 °C und bei 4 °C in deionisiertem Wasser lagerstabil sind.

Es wurde weiterhin die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Nanopartikeln untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Partikel den Wirkstoff bevorzugt bei saurem pH-Wert freisetzen. Da Tumorzellen von einem sauren Milieu umgeben werden, ist dies als ein erfolgreiches Ergebnis zu bewerten. Bei neutralem pH-Wert bzw. alkalischen Werten wird weniger bzw. keine signifikante Menge des Wirkstoffes an die Umgebung abgegeben.

Als spezifischer Ligand wurde das S15 Aptamer, das gegen die Lungenkrebszelllinie A549 gerichtet ist, auf den Nanopartikeln immobilisiert. Dies wurde über eine EDC Kopplung realisiert. Der Erfolg der Immobilisierung wurde über die Agarosegelelektrophorese bestätigt. Anschließend wurde die Menge des auf den Partikeln immobilisierten Aptamers bestimmt. Diese wurde über optische Dichte Messungen sowie mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Roti®-GelStain), der mit der DNA interkaliert und so ein fluoreszentes Signal hervorruft, charakterisiert. Es eignete sich die Bestimmung mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes am besten. Da die Polymerpartikel aufgrund fehlender Eigenfluoreszenz schwer zu detektieren sind, kamen hier als Modellpartikel Quantum Dots zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass auf den Quantum Dots 25 Aptamere pro Quantum Dot immobilisiert werden konnten. Da sich in späteren Experimenten zeigte, dass es für die spezifische zelluläre Aufnahme der Partikel wichtig war, weniger Aptamere auf der Oberfläche der Partikel zu immobilisieren, konnte die Dichte erfolgreich verringert werden, so dass 5 Aptamere pro Partikel immobilisiert werden. In Zukunft muss versucht werden, die Menge an Aptamer auch auf den PEG-PCL Nanopartikeln zu optimieren. Eine Kopplung von PEG-PCL Nanopartikeln und Aptameren konnte erfolgreich durchgeführt werden.

Nachdem das Modellsystem erfolgreich hergestellt werden konnte, wurde dieses an den Zielzellen und verschiedenen Kontrollzelllinien getestet. Es konnte gezeigt werden, dass an den Zellen keine Toxizität des Systems nachweisbar ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem bisher unbekannten Target des S15 Apatmers um ein Protein auf der Oberfläche der A549 Zellen handelt. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig der K_D Wert von QD-S15 Konjugaten bestimmt. Dieser lag bei 16 nM, was auf eine hohe Affinität für die Zielzellen hindeutet.

Es wurde weiterhin untersucht, ob und über welchen Weg die modifizierten Partikel in die Zelle aufgenommen werden. Dazu dienten wieder Quantum Dots aufgrund ihrer besseren Detektierbarkeit als Modellpartikel. Diese wurden mit den Aptameren funktionalisiert und dann überprüft ob diese von den A549 Zellen aufgenommen werden. Hier zeigte sich, dass sie sowohl in die A549 Zellen als auch die Zellen der Kontrollzelllinie (HeLa) aufgenommen wurden. In Experimenten, die am Technion in Haifa durchgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass der Grund für die unspezifischen Bindungen zur Kontrollzellinie, die zu hohe Aptamerdichte auf der Partikeloberfläche war. Diese Bindungen können durch die unkorrekte Faltung der Aptamere aufgrund sterischer Hinderungen zustande gekommen sein. Wie erwähnt, wurde die Aptamerdichte anschließend reduziert und in nachfolgenden Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Partikel nur noch von den Zielzelllinien aufgenommen werden.
Im weiteren Verlauf sollte charakterisiert werden, ob die funktionalisierten Nanopartikel über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Auch hier kamen aufgrund der besseren Detektierbarkeit funktionalisierte QDs zum Einsatz. Es wurde festgestellt, dass sich sowohl der Endozytose Indikator pHrodo™ Dextran als auch die funktionalisierten QDS15 Konjugate in den Zielzellen befanden. Dies ließ die Vermutung zu, dass die Partikel über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Um diese Beobachtung zu verifizieren und herauszufinden, über welchen Endozytoseweg die Partikel in die Zellen aufgenommen werden, wurden verschiedene Endozytose-Inhibitoren eingesetzt, um über das Ausschlussprinzip den Endozytoseweg charakterisieren zu können. Nach der Inkubation mit Dynasor, das den Rezeptorvermittelten Endozytoseweg hemmt, zeigte sich keine Aufnahme der Partikel in die Zellen, weshalb dies als Nachweis gilt, dass die Partikel über diesen Weg aufgenommen werden.
Nachdem das System hinsichtlich der Freisetzung des Wirkstoffes und Aufnahme in die Zellen charakterisiert wurde, sollte es abschließend mit eingekapseltem Wirkstoff an Zellen getestet werden. Es zeigte sich, dass das entwickelte *Targeted Drug Delivery* System die Zellviabilität der untersuchten A549 Zellen verminderte, und somit kann die Entwicklung dieses Systems als erfolgreich eingestuft werden.

In weiterführenden Arbeiten wäre es interessant, zu untersuchen, welchen Effekt das TDDS in einer 3D Zellkultur hat. Bislang wurde es nur an Zellen, die als Monolayer wachsen, getestet. Um Bedingungen zu simulieren, die denen im Körper ähnlicher sind, müsste das System jedoch auch in einer drei-dimensional wachsenden Mischkultur aus gesunden und nicht gesunden Zellen untersucht werden. Für drei-dimensionale Systeme gibt es in der Forschung bereits einige Ansätze,

wie zum Beispiel sogenannte organ-on-a-chip Lösungen [148]. Bevor das System für die klinische Anwendung zugelassen werden kann, muss es außerdem *in vivo* untersucht werden.

Innerhalb des Kooperationsprojektes wird zukünftig am Technion das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte System mit einer Chitosanhülle beschichtet werden. Diese soll dafür sorgen, dass die Nanopartikel vor den Umgebungsbedingungen im Gastrointestinaltrakt geschützt werden. Längerfristiges Ziel ist es dabei, eine oral applizierbare Darreichungsform für die Partikel zu entwickeln.

Dafür und für die Untersuchung von *Drug Delivery* Systemen für die Krebstherapie bietet das entwickelte TDDS eine vielversprechende Grundlage.

Anhang

6 Material und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Zellen

A-549 (humane Lungenkarzinomzelllinie, DSMZ-Nr. ACC-107):

Bei den Zellen der A-549 Zelllinie (Abbildung 70) handelt es sich um immortalisierte Zellen eines Lungenkarzinoms, die von einem 58-jährigen hellhäutigen Mann 1972 entnommen wurden. Sie wachsen adhärent und werden alle 3 – 4 Tage geteilt. Sie wachsen als Monolayer, gehören zu den Epithelzellen und haben eine Verdopplungszeit von 40 – 48 h. Sie wachsen im Flüssigmedium DMEM, welches zu 10 % mit FKS (v/v) und zu 1 % mit P/S versetzt ist.

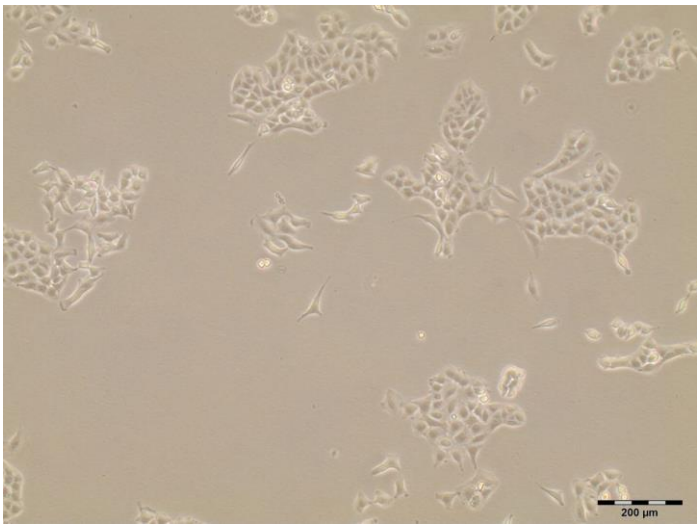

Abbildung 70: Morphologie der A549 Zellen.

HELA (humane Gebärmutterhalskrebszelllinie, DSMZ-Nr. ACC-57):

Bei den Zellen der HeLa Zelllinie (Abbildung 71) handelt es sich ebenfalls um eine immortalisierte Zelllinie. Sie wurde 1951 aus dem Epithel eines Karzinoms des Gebärmutterhalses einer 31 Jahre alten dunkelhäutigen Frau (Henrietta Lachs → HeLa) entnommen. Diese Zelllinie ist mit dem Papilloma Virus Typ 18 (HPV-18) infiziert, wobei eine Übertragung und Aktivierung während der Arbeit mit diesen Zellen ausgeschlossen ist. HeLa Zellen wachsen adhärent als Monolayer und werden alle 3 – 4 Tage geteilt. Ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 40 – 48 h.

Sie wachsen ebenfalls im Flüssigmedium DMEM, das mit 10 % FKS (v/v) und 1 % P/S versetzt ist.

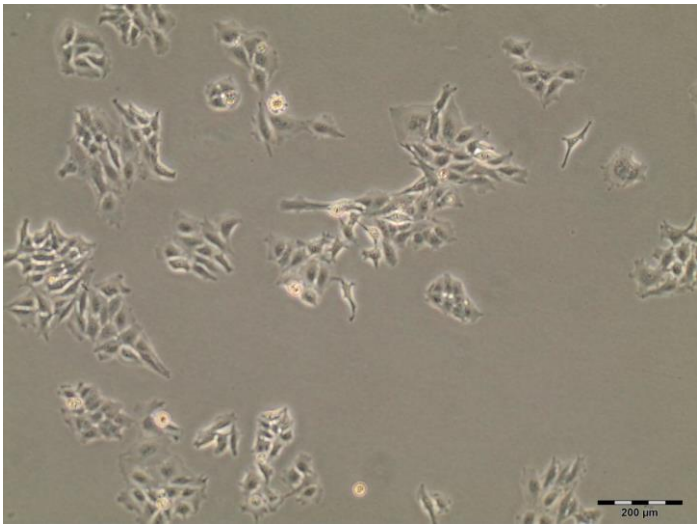

Abbildung 71: Morphologie der HeLa Zellen.

Da das S15 Aptamer nur gegen die A549 Zelllinie selektiert wurde, dient die HeLa Zelllinie als Negativkontrolle.

BEAS2B (*humane Bronchialepithelzellen)*

Bei den BEAS2B Zellen (Abbildung 72) handelt es sich um bronchiale Epithelzellen, die aus dem Gewebe der humanen Lunge entnommen wurden.

Sie wachsen adhärent als Monolayer im Flüssigmedium DMEM, versetzt mit 10 % FKS (v/v) und 1 % P/S, ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 40-48 h und müssen alle 3 – 4 Tage geteilt werden.

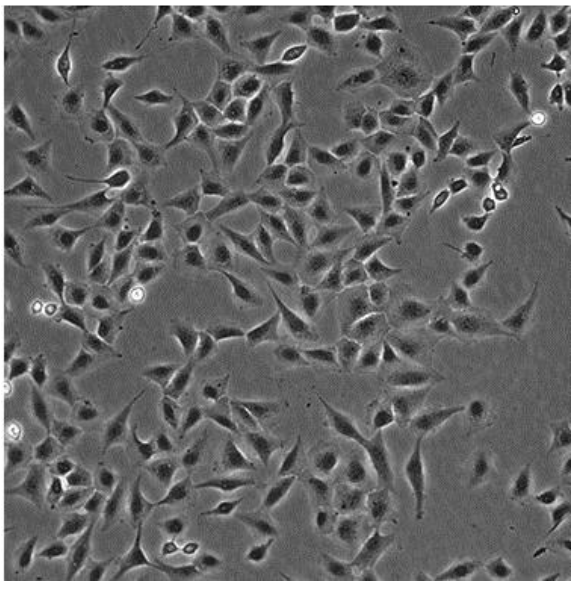

Abbildung 72: Morphologie der BEAS2B Zellen.

Die BEAS2B Zelllinie dient als Kontrollzelllinie für Nichtkrebszellen.

6.1.2 Medien

Medienzusammensetzungen

Dulbecco's Modiefied Eagle's Medium (DMEM), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

0,2 g/L Calciumchlorid
0,0001 g/L Eisennitrat * 9 H_2O
0,09767 g/L Magnesiumsulfat
0,4 g/L Kaliumchlorid
6,4 g/L Natriumchlorid
0,109 g/L Natriumhydrogenphosphat
4,5 g/L Glukose
0,084 g/L L-Arginin * HCl
0,626 g/L L-Cystin * 2 HCl
0,584 g/L L-Glutamin
0,03 g/L Glycin
0,042 g/L L-Histidin * HCl * H_2O
0,105 g/L L-Isoleucin
0,105 g/L L-Leucin
0,0004 g/L Riboflavin
0,004 g/L Thiamin * HCl
0,146 g/L L-Lysin * HCl
0,03 g/L L-Methionin
0,066 g/L Phenylalanin
0,042 g/L Serin
0,095 g/L Threonin
0,016 g/L L-Tryptophan
0,10379 g/L L-Tyrosin 2 Na*2 H_2O
0,094 g/L L-Valin
0,004 g/L Cholinchlorid
0,004 g/L Folsäure
0,0072 g/L Myoinositol
0,004 g/L Nicontinamid
0,004 g/L D-Pantothensäure
0,004 g/L Pyridoxal * HCl
0,0159 g/L Phenolrot * Na
0,11 g/L Brenztraubensäure * Na

6.1.3 Puffer und Lösungen

1 x PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,2 mM Na_2HPO_4; 14,7 mM KH_2PO_4; pH 7,4
DMEM	DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S
Kryomedium	DMEM + 20 % FKS + 10 % DMSO
SBB	10 mM Borsäure; pH 7.4 (mit NaOH einstellen) 50 mM Borsäure; pH 8.3 (mit NaOH einstellen)
TAE Laufpuffer	40 mM TRIS Puffer, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; in deionisiertem H_2O; pH 8
Bindungspuffer (BP, Aptamere)	2,67 mM KCl; 1,47 mM KH_2PO_4; 137,93 mM NaCl; 8,06 mM Na_2HPO_4; 5 mM $MgCl_2$; 4,5 g/L Glukose; 1 mg/mL BSA; pH 7.4
Inkubationspuffer (Aptamere)	Bindungspuffer + 20 % FKS

6.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase® Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Acetonitril	VWR Chemicals, Darmstadt
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Camptothecin (CPT)	Cayman Chemical Company, Hamburg

CellTiterBlue	Promega
Dichlormethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
4´,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ε-Caprolacton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eisessig	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
N-(3-dimethylaminopropyl)-N'_Ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glukose	Fluka, Steinheim
Hoechst® 33342	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
PCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
pHrodo™ Dextran Green	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
HOOC-PEG-OH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
mPEG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumcholathydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Paclitaxel	Cayman Chemical Company, Hamburg
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Salzsäure (1 M)	AppliChem, Darmstadt
Roti-Safe GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Toluol (wasserfrei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Zinkoktoat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
QDot 655 ITK™ Carboxyl QDs	Life Technologies, Carlsbad
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	VWR Chemicals, Darmstadt

6.1.5 Verwendete Aptamere

Alle verwendeten Aptamere haben eine 5' Aminomodifikation.

Aptamer	Sequenz	Hersteller
S15	5'-/5AmMC6/AC GCT CGG ATG CCA CTA CAG GCT ATC TTA TGG AAA TTT CGT GTA GGG TTT GGT GTG GCG GGG CTA CTC ATG GAC GTG CTG GTG AC-3'	IDT
Rnd Oligonukleotid	5'-/5AmMC6/GCA TTT AGT GAC TCG CGG ATG TCA AGA TTA GAC AAC GCC AGC AGC ATC ATC CGA GCC TCT CTA ACT CGT ACG CAG GTC CGA GGC T-3'	IDT

Beide Aptamere haben eine Sequenzlänge von 85 Nukleotiden. Das S15 Aptamer hat einen GC-Gehalt von 54,1 %; die Kontrolle besitzt einen GC-Gehalt von 56,5 %. Die Schmelztemperatur beträgt beim S15 Aptamer 72,9 °C und bei der Kontrolle 73,4 °C. Der Extrinktionskoeffizient [L/(Mol x cm)] ist beim S15 Aptamer 805700 und bei der Kontrolle 809500.

6.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL, 5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µL, 20-200 µL, 1000 µL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Vivaspin 0,5 mL Zentrifugaleinheiten 50 kDa MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Vivaspin 0,5 mL Zentrifugaleinheiten 100 kDa MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Dialysetubes, 4 kDa MWCO	Tube-O-Dialyzer GBiosciences®, Missouri, USA
Dialysemembran, 3,5 kDa MWCO	Zellutrans; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gewebekulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Gewebekulturplatten (6-Well, 24-Well und 96-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Spritzen (1 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen	Sterican®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Corning Inc., NY, USA
Einmalhandschuhe	Rotiprotect-Nitril light, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalpipetten	2; 5; 10; 25 und 50 mL Costar® Stripette von Corning

HPLC-Gefäß, Kunststoff	- 0,3 mL PP-Mikroflasche, VWR GmbH, Darmstadt - Snapring cap 11 mm, VWR GmbH, Darmstadt
Insert HPLC-Gefäße	0,2 mL Mikroeinsatz, VWR GmbH, Darmstadt
Pasteurpipetten (150 mm)	Brand GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen	10; 200 und 1000 µL, Brand GmbH & Co. KG
Fluoroscan-Platten (96 Wells)	Nunc mit Nunclon Delta Surface; Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Braunglasflasche	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kryoröhrchen	CryoPure Gefäß von Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Polylysin® Slides	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Sterilfilter (für Spritzen) Sterilfilter (für Medium)	Minisart 0,4 µm, Sartorius AG, Göttingen Filtropur L 0,2 S von Sarstedt, Nümbrecht

6.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Reinstwasseranlage: Arium 611 uf uv	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
pH Meter: HI 221 Calibration Check Microprocessor	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Scanner: GenePix 4000B	Axon Instruments, Foster City, CA, USA
Zentrifuge für Reaktionsgefäße 1-2 mL: minispin plus	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop: Olympus IX 50	Olympus Corporation, Tokio
Agaraosegel-Elektrophorese Einheit	Thermo Electron Corporation
Dynamic Light Scattering: Nanoseries-Nano-ZS	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg
Transmissionselektronenmikroskop	
Pipetten 1-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL	Brand GmbH &Co. KG, Wertheim
Vortexer: IKA MS3 basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer	MR Hei-Standard; Heidolph Instruments GmbH &Co. KG, Schwabach
Rotationsverdampfer	IKA RV10 control; VWR International GmbH, Darmstadt
Ultraschallsonde	Labsonic M; Sartorius AG, Göttingen
HPLC	
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301; Eppendorf AG, Hamburg
Rotator	
NTA	Fire Flight Camera von NanoSight; Modul LM10 Malvern Instruments GmbH, Herrenberg
Feinwaage	Pioneer; OHAUS Europe GmbH, Greifensee
Fluoreszenzspektrophotometer	F-7000 FL Spectrophotometer; Hitachi Europe GmbH, Düsseldorf
Inkubationsschränke	Hybaid Shake 'n' Stack; Thermo Scientific GmbH, Langenselbold IPP 30; Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Zentrifugen	Micro Star17R; VWR International GmbH, Darmstadt Heraeus Fresco 17 Centrifuge; Thermo Electron Corporation, Thermo Scientific GmbH, Langenselbold Centrifuge 5430; Eppendorf AG, Hamburg
Fluorospektrometer	ND-3300 von Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Gefrierbehälter	Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container
Konfokalmikroskop	

6.2 Methoden

6.2.1 Herstellung der Polymere

6.2.1.1 mPEG-PCL-Polymer

Für die Herstellung des mPEG-PCL-Polymers müssen zunächst 15 g ε-Caprolacton in einer Stickstoffatmosphäre über einem Vakuum für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet werden. 15 g des Methoxy-Poly(ethylenglykol) (mPEG, 5 kDa) werden in 30 mL wasserfreiem Toluol gelöst und anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Katalysator Zinnoktoat (0,1%) wird ebenfalls in wasserfreiem Toluol gelöst.

5 g des getrockneten ε-Caprolacton und 5 g des mPEG sowie der Katalysator werden in einen trockenen Rundkolben überführt. Die Reaktion findet unter Stickstoffatmosphäre für 24 h bei 130 °C statt. Die Reaktion wird beendet, indem das Gemisch auf Raumtemperatur herunter gekühlt wird.

6.2.1.2 HOOC-PEG-PCL-Polymer

Für die Herstellung des HOOC-PEG-PCL-Polymers werden 100 mg des ε-Caprolactons in einer Stickstoffatmosphäre über einem Vakuum für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. 100 mg des HOOC-PEG-OH (3 kDa) werden in 10 mL wasserfreiem Toluol gelöst und anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Katalysator (0,1%) Zinnoktoat wird ebenfalls in wasserfreiem Toluol gelöst.

Das trockene ε-Caprolacton und das HOOC-PEG-OH werden in jeweils gleicher Menge zusammen mit dem Katalysator in einen Rundkolben überführt. Die Reaktion findet unter Stickstoffatmosphäre für 24 h bei 130 °C statt. Die Reaktion wird beendet, indem das Gemisch auf Raumtemperatur herunter gekühlt wird.

6.2.1.3 ^{1}H NMR zur Bestimmung des Molekulargewichts der Polymere

Mit Hilfe des aufgenommenen ^{1}H NMR Spektrums lässt sich das Molekulargewicht der Polymere bestimmen. Dazu werden die Protonen der Kohlenstoffatome im repetitiven Teil des HOOC-PEG-PCLs (Protonen des PCLs (b-e)) mit den Protonen im nicht repetitiven Teil (Protonen des HOOC-PEG (a)) verglichen (Abbildung 73). Dies kann direkt in der Software durchgeführt werden. Durch den Vergleich lässt sich m bestimmen und anschließend kann das Molekulargewicht berechnet werden.

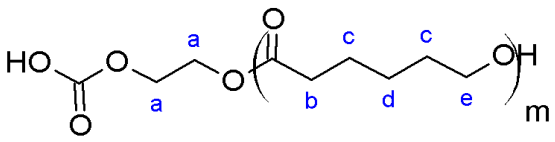

Abbildung 73: Strukturformel des HOOC-PEG-PCL Polymers.

Zu Beginn werden die Protonen von a und b miteinander verglichen. Dieser Vergleich wird durch das Programm „TopSpin" durchgeführt. Die Anzahl der Protonen der nicht repetitiven Einheit „a" beträgt jeweils 2, also gibt es dort insgesamt 4 Protonen. Die Anzahl der Protonen der repetitiven Einheit des PCLs (b) beträgt 26. Pro repetitiver Einheit sind bei „b" 2 Protonen vorhanden. Somit ist davon auszugehen, dass 13 Einheiten des PCLs vorhanden sind. Nun werden die atomaren Massen der Elemente der PCL Einheit summiert und mit 13 multipliziert und anschließend mit der Summe der atomaren Masse der HOOC-PEG Einheit addiert. Bei der Berechnung der molaren Masse für das synthetisierte mPEG-PCL (***Abbildung 1***Abbildung 74) wird genauso vorgegangen: Es werden die Protonen der Kohlenstoffe im repetitiven Teil des mPEG-PCLs (also der Protonen des PCLs c, d, e und f) mit den Protonen der Kohlenstoffe im nicht repetitiven Teil (a und b) miteinander verglichen. Zunächst wird die Anzahl der Protonen im ersten Teil der nicht repetitiven Einheit ermittelt (3xH, 1xC und 1xO) und dann vom ursprünglich eingesetzten Molekulargewicht des mPEGs (5 kDa) abgezogen. Anschließend wird diese Differenz durch die atomare Masse des zweiten Teils der nicht repetitiven Einheit (2xC, 1xO und 4xH) geteilt. Somit kann die Anzahl der Einheiten des mPEGs ermittelt werden. Mit Hilfe des Programms „TopSpin" wird nun die Anzahl der Einheiten des PCLs ermittelt.

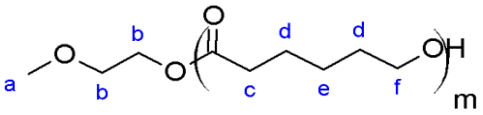

Abbildung 74: Strukturformel des mPEG-PCL Polymers.

6.2.2 Nanopartikelherstellung

Um aus den synthetisierten Polymeren die Nanopartikel herzustellen, müssen zunächst 28 mg mPEG-PCL und 3 mg HOOC-PEG-PCL in 1 mL Dichlormethan (DCM) gelöst werden. Gleichzeitig wird 5 mL einer 0,6%ige Natriumcholathydrat-Lösung hergestellt, in die die Polymerlösung langsam unter Rühren hineingetropft wird. Anschließend wird die Lösung für 1 h stark bei 750 rpm und dann für 2 h schwach bei 350 rpm gerührt. Anschließend wird die Lösung mit Hilfe von pulsierendem Ultraschall für 75 s bei 100 W und einer Amplitude von 0,6 homogenisiert und danach am Rotationsverdampfer bei 54 °C und 150 mbar eingeengt. Dann wird die Lösung über Nacht gegen

deionisiertes Wasser bei einem Cut-Off von 3,5 kDa dialysiert, wobei das Wasser regelmäßig gewechselt werden muss. Um anschließend die großen Teilchen und Partikel aus der Lösung zu entfernen, wird diese in ein 5 mL Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 13 000 *x* g zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die Nanopartikel.

6.2.3 Einkapselung von (Modell-)Wirkstoffen

Zur Einkapselung von Farb- bzw. Wirkstoffen dienen vor allem besonders hydrophobe Wirkstoffe. Aus diesem Grund sind die Wirkstoffe Paclitaxel (PTX) und Camptothecin (CPT) gewählt worden. Es werden zu der Dichlormethan-Polymer-Lösung jeweils 1 mg PTX oder CPT dazugegeben. Die Nanopartikelherstellung wird dann wie unter 6.2.2 durchgeführt.

Die tatsächlich eingekapselte Menge der Wirkstoffe wird über eine Kalibrationsgerade ermittelt. Dazu werden im Falle von eingekapseltem CPT von der Nanopartikellösung 200 µL entnommen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 200 µL DCM gelöst und im Fluoreszenzspektrophotometer bei 369/437 nm EX/EM vermessen. Die Messung erfolgt in Dreifachbestimmung.

Im Falle des eingekapselten PTX wurden 200 µL der Nanopartikellösung getrocknet und anschließend mit DCM gelöst. Die Bestimmung des PTX Gehaltes in dieser Probe wird mittels HPLC durchgeführt. Die Einstellungen sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 6: Einstellung der HPLC Methode zur Detektion von PTX.

Säule	Kintex C18; 2,6 µm; 100 A; 100x4,6 mm
Mobile Phase	Wasser:Acetonitril (50:50)
Flussrate	1 mL/min
Temperatur des Säulenofens	30 °C
Injektionsvolumen Probe	10 µL
Detektion	Diodenarraydetektor (DAD): 225 nm

6.2.4 Funktionalisierung der Nanopartikel mit Aptameren

Zur Immobilisierung der Nanopartikel mit Aptameren wird das institutsintern etablierte Protokoll verwendet. Es werden 24,4 µL der Nanopartikellösung (4,2 nM) und 6,25 µL einer 178 µM Aptamerlösung benötigt. Mit einem 10 mM Natriumboratpuffer wird die Lösung zu 100 µL ergänzt und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Es werden 10 mg/mL EDC in

Natriumboratpuffer hergestellt und 6,5 µL zu der Aptamerlösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgt über Nacht. Anschließend wird die Reaktion mit Natriumboratpuffer (50 mM, pH 8.3) gestoppt und nicht gekoppelte Aptamere werden mit Hilfe von 100 kDa MWCO Zentrifugaleinheiten durch achtmaliges Waschen mit Natriumboratpuffer (50 mM, pH 8,3) entfernt. Die Durchflüsse werden zur weiteren Verwendung gelagert. Die Konjugate werden anschließend mit 100 µL Bindepuffer von der Membran gelöst.

Die Immobilisierung der QDs mit Aptameren wird analog durchgeführt. Es werden allerdings 12,5 µL QDs (8 µM) und 6,25 µL einer 120 µM Aptamerlösung benötigt.

Um den Erfolg der Konjugation zu bestimmen, wurden die Proben anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und deren Oberflächenladung durch eine Zetapotential Messung bestimmt.

Da sich im Verlauf der praktischen Arbeiten herausstellte, dass die Dichte der immobilisierten Aptamere auf der Partikeloberfläche reduziert werden musste, wurden für die nachfolgenden Kopplungsansätze jeweils 1/5 der ursprünglich eingesetzten Mengen verwendet. Es wurde eine entsprechend größere Menge Puffer aufgefüllt, um das finale Volumen von 100 µL zu erreichen.

6.2.3.1 Charakterisierung der Aptamerimmobilisierung

Ein 1%iges bzw. 1,2 %iges Agarosegel wird hergestellt, indem 1 g bzw. 1,2 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer in der Mikrowelle bei 800 Watt für 2 min erhitzt werden. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hat, kühlt die Lösung unter Rühren einige Minuten ab. Dann werden 5 µL Roti-Safe GelStain dazu gegeben. Dieser Farbstoff lagert sich in die Proben-DNA ein und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Agarose-Lösung wird in die Gelkammer gegossen und ein Kamm mit 12 oder 24 Taschen eingesetzt. Nach dem das Gel fest geworden ist, kann der Kamm gezogen und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet werden. Dann werden die Proben im Verhältnis 1:3 mit Green GoTaq Reaktionspuffer versehen und anschließend wird das Gel mit 15 µL pro Tasche beladen. Die Elektrophorese erfolgt für 1 h bei 98 V.

Werden die Quantum Dots mit den Aptameren immobilisiert, erfolgt die Charakterisierung nahezu analog. Zum Sichtbarmachen der gekoppelten QDs benötigt es keinen Farbstoff, da die QDs eine eigene Fluoreszenz besitzen. Gekoppelte QDs wandern aufgrund der sterischen Hinderung langsamer im Gel als nicht gekoppelte QDs. Somit kann durch die unterschiedliche Lauflänge deutlich bestimmt werden, ob erfolgreich Aptamer auf der Oberfläche der QDs immobilisiert wurde.

6.2.3.2 Bestimmung der Menge an immobilisiertem Aptamer

Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes

Die Immobilisierung des Aptamers an die QDs erfolgt wie unter 6.2.4 angegeben. Zur Bestimmung der Menge an immobilisiertem Aptamer werden die Aptamer-QD-Konjugate durch achtmaliges Waschen über eine 100 kDa Membran aufgereinigt. Die Durchflüsse, die dabei entstehen, werden vereinigt und am Vakuumtrockner getrocknet. Anschließend wird das entstandene Pellet mit 70-100 µL deionisiertem Wasser gelöst.

Es wird eine Aptamer Standardreihe im Bereich zwischen 10 µM und 0.625 µM mit deionisiertem Wasser hergestellt. Jeweils 10 µL der Proben der Standardreihe und der vereinten Durchläufe werden mit je 5 µL 5xGreen GoTaq® Ladepuffer versehen. Dann werden die Proben auf ein 1,2 %iges, mit Roti®-GelStain versetztes, Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für 1 h bei 98 V. Anschließend wird das Gel mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet und nach Erstellen der Kalibrationsgerade die Konzentration des Aptamers in der Probe der vereinigten Durchflüsse berechnet. Die Differenz aus ursprünglich eingesetzter Konzentration an Aptamer und der Konzentration in den Durchläufen, ergibt die Menge an Aptamer, die auf den QDs immobilisiert werden konnte. Da auch die Menge an QDs bekannt ist, kann bestimmt werden, wie viele Aptamere pro QD immobilisiert wurden.

Optische Dichte Messung

Für die Bestimmung der Menge des immobilisierten Aptamer mittels Optischer Dichte Messung, wird zum einen ein Kopplungsansatz, wie unter 6.2.4 beschrieben, hergestellt. In einem weiteren Ansatz werden 15 µL des Aptamers in einem Reaktionsgefäß mit SBB (pH = 7,4; 10 mM) auf 100 µL aufgefüllt. Für die Bestimmung der Anfangskonzentration beider Ansätze wird aus beiden Lösungen je 1 µL als Probe entnommen und 1:10 in SBB (pH = 7,4; 10 mM) verdünnt. Anschließend werden 6,5 µL EDC (10 mg/mL) zu beiden Ansätzen hinzugegeben. Die Lösungen werden schüttelnd über Nacht inkubiert und anschließend mit 400 µL SBB (pH = 8,3; 50 mM) versetzt, um die Reaktion des EDCs abzustoppen. Die Lösungen werden, wie gewohnt über eine Membran gewaschen, anschließend vereinigt und mittels Vakuumkonzentrator getrocknet. Das Pellet wird anschließend in 100 µL SBB (pH = 8,3; 50 mM) resuspendiert und zusammen mit der Aptamerprobe bei 260 nm vermessen. Der Erfolg der Kopplung wird, wie unter 6.2.3.1 beschrieben, über die Agarosegelelektrophorese überprüft.

Ethanolfällung

Die Durchläufe der Waschschritte des Kopplungsansatzes zwischen Aptamer und Nanopartikeln werden wiedervereinigt und am Vakuumkonzentrator getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 100 µL SBB (pH = 8,3; 50 mM) resuspendiert. Dann wird die Lösung 1/10 mit NaCl (5 M) versetzt und dem doppelten Volumen an 100 %igem (eiskaltem) Ethanol aufgefüllt. Der Ansatz wird über Nacht bei -80 °C gelagert, um die Löslichkeit des Aptamers weiter zu senken. Die Lösung wird anschließend 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µL Ethanol (70 %) überdeckt. Anschließend wird die Lösung bei 13 000 rpm für 7 min zentrifugiert. Erneut wird der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Dabei sollte sich das ausgefällte Aptamer im zurück gebliebenen Pellet befinden. Dies wird nach der Trocknung in 50 µL deionisiertem Wasser gelöst und die Aptamerkonzentration spektrometrisch bei 260 nm bestimmt.

6.2.5 Charakterisierung der Partikel

6.2.5.1 Bestimmung der Partikelgröße mittels dynamischer Lichtstreuung

Das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung basiert auf der Brownschen Molekularbewegung. Größere Partikel bewegen sich langsamer als kleinere. Diese Molekularbewegung verursacht eine Streuung des Laserlichts, mit dem die Probe angestrahlt wird. Dabei ist die Intensität ebenfalls von der Partikelgröße abhängig. Mit Hilfe der Intensitätsschwankungen kann die Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung und damit über die Stokes-Einstein-Gleichung die Partikelgröße bestimmt werden. Diese Werte werden direkt vom Programm ausgegeben. Nachfolgend sind die Stokes-Einstein-Gleichung sowie das Prinzip des DLS Messverfahrens abgebildet (Abbildung 75).

$$d_H = \frac{k\,T}{3\,\pi\,\eta\,D}$$

Mit: d_H= hydrodynamischer Radius, D = Diffusionskoeffizient, T = Temperatur, η = Viskosität des Lösemittels, k= Blotzmann-Konstante

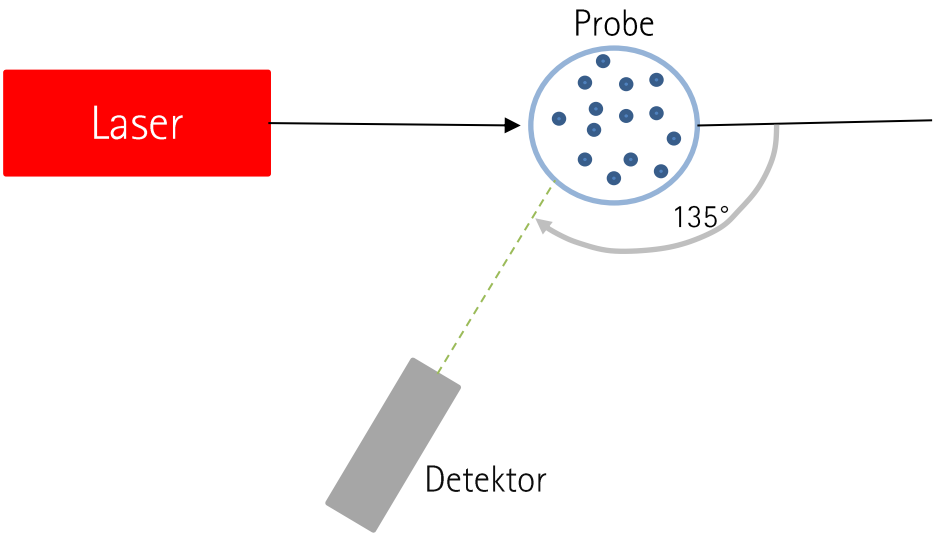

Abbildung 75: Schematische Darstellung des DLS Messprinzips nach [149].

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel, wird die Partikellösung zunächst 1:10 mit deioinisertem Wasser verdünnt und anschließend 5 min einem Ultraschallbad ausgesetzt. Dann werden ca. 800 µL der Probenlösung in eine spezielle Messkammer (Abbildung 76) überführt und die Kammer im „Zetasizer", gestellt.

Abbildung 76: Küvette für die dynamische Lichtstreuungsmessung und zur Bestimmung des Zetapotentials.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Partikelgröße ist die sogenannte Nanotracking Analyse (NTA), die im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

6.2.5.2 Bestimmung der Partikelkonzentration mittels Nanoparticle Tracking Analyse

Mittels der Nanoparticle Tracking Analyse können sowohl die Konzentration als auch der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel bestimmt werden. Auch bei diesem Verfahren werden sich die Brown'sche Molekularbewegung sowie die Lichtstreuung zunutze gemacht. Dabei wird ein Laserstrahl durch die Probenkammer geführt (Abbildung 77).

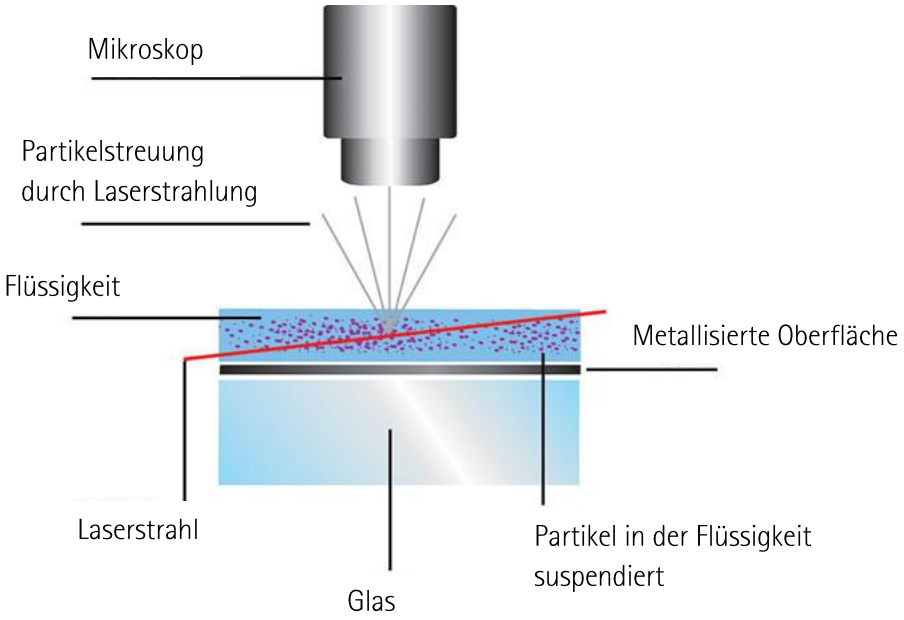

Abbildung 77: Schematische Darstellung der NTA Messung nach [150].

Für die Messung wird die Partikellösung 1:200 mit deionisiertem Wasser verdünnt und anschließend mit Hilfe einer Spritze in die Messkammer gefüllt. Diese wird anschließend von einem Laser durchstrahlt und die Bewegung der Partikel über 90 s über eine Kamera aufgezeichnet. Die Partikel streuen das eingestrahlte Licht des Lasers. Mit Hilfe des Programms NanoSight2.3 können die Konzentration (Partikel/mL) und der hydrodynamische Durchmesser der Partikel ermittelt werden.

6.2.5.3 Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential beschreibt die Stärke der elektrostatischen Abstoßung/ Anziehung zwischen Partikeln in einer Lösung. Weiterhin dient es zur Charakterisierung der Stabilität von Nanopartikeln. Wenn sich Nanopartikel in Lösung befinden, lagern sich an deren Oberfläche Ionen des umgebenden Mediums an.

Während der Messung des Zetapotentials werden die Nanopartikel einem elektrischen Feld ausgesetzt. Da die Nanopartikel in wässriger Lösung eine Ladung auf ihrer Oberfläche ausbilden, werden sie durch das Feld bewegt. Anhand ihrer Geschwindigkeit kann dann das Zetapoential bestimmt werden [151].

Für die Messung werden etwa 800 µL einer 1:10 mit Wasser (oder entsprechendem Puffer) verdünnten Nanopartikellösung in eine Küvette (Abbildung 76) gefüllt. Das Zetapotential wird mit dem Zetasizer Nano ZS gemessen und erfolgt als Dreifachbestimmung.

6.2.5.4 Charakterisierung der Stabilität der Nanopartikel

Um die Partikel auch über längere Zeit lagern zu können, musste ihre Stabilität im Lagerungsmedium überprüft werden. Dazu wurde je 1 mL der Partikellösung, deren Partikel Wirkstoff enthielt, jeweils in ein Dialysegefäß (Cut-Off 3,5 kDa) überführt und dann bei 4 °C bzw. 37 °C über einen Zeitraum von 72 h gegen 10 mL deionisiertes Wasser dialysiert (Abbildung 78). Es wurden stündlich, außer nachts, Proben genommen und anschließend die Konzentration des Wirkstoffs im deionisierten Wasser mit Hilfe des Fluorospektrophotometers bestimmt. Bei jeder Probennahme erfolgte ein Austausch des Dialysewassers und die bestimmten Wirkstoffkonzentrationen wurden im Anschluss aufaddiert.

Abbildung 78: Aufbau des Versuchs zur Stabilität der Nanopartikel. 1 mL der Nanopartikellösung wird gegen 10 mL deioniertes Wasser dialysiert (Cutoff: 3.5 kDa).

6.2.5.5 Bestimmung der Wirkstofffreisetzung aus den Nanopartikeln

Zur Bestimmung der Wirkstofffreisetzung aus den Nanopartikeln wurde der gleiche Versuchsaufbau wie unter 6.2.4.6 gewählt. Es wurde wieder 1 mL der Partikellösung, deren Partikel Wirkstoff enthielt, über einen Zeitraum von bis zu 80 h dialysiert. Dabei wurde gegen PBS mit 1 % DMSO und PBS mit 0,1 % TWEEN 80 bei den pH-Werten 5.2, 6.8, 7.4 und 8 dialysiert und in regelmäßigen Zeitabständen Proben aus dem jeweiligen Dialysepuffer entnommen. Die Puffer wurden nach jeder Probennahme gewechselt und die Proben am Fluoreszenzspektrophotometer vermessen. Zur Bestimmung des gesamt freigesetzten Wirkstoffes wurden die Konzentrationen jeder Probe aufaddiert und die Konzentrationen mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsgeraden bestimmt.

Nachfolgend abgebildet sind die jeweiligen Kalibrationsgeraden von CPT in den unterschiedlichen Puffern mit verschiedenen pH-Werten (PBS mit TWEEN 80) (Abbildung 79 - Abbildung 82).

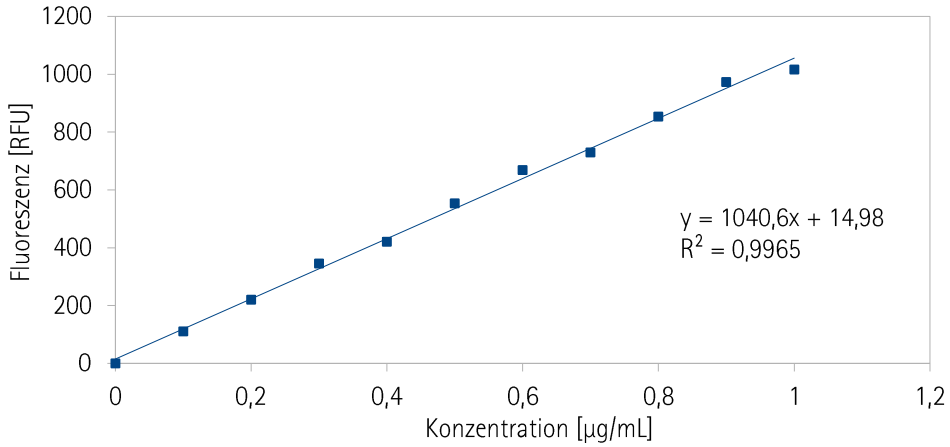

Abbildung 79: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 5,2.

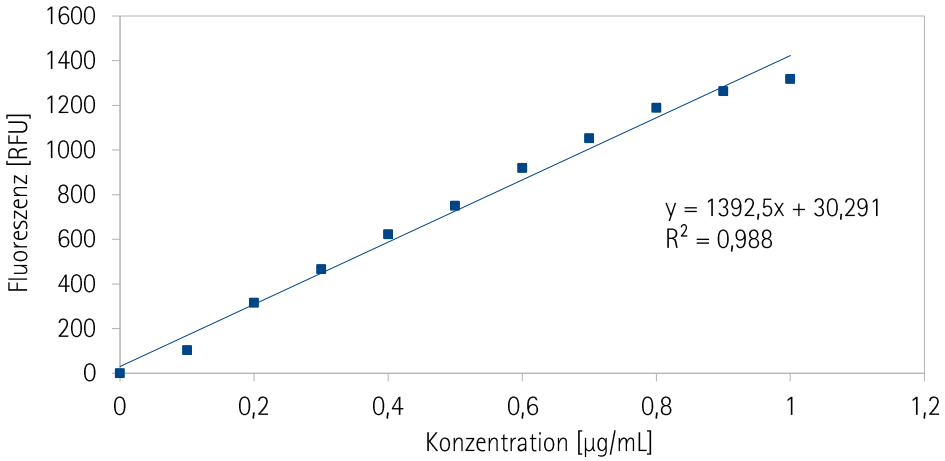

Abbildung 80: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 6,8.

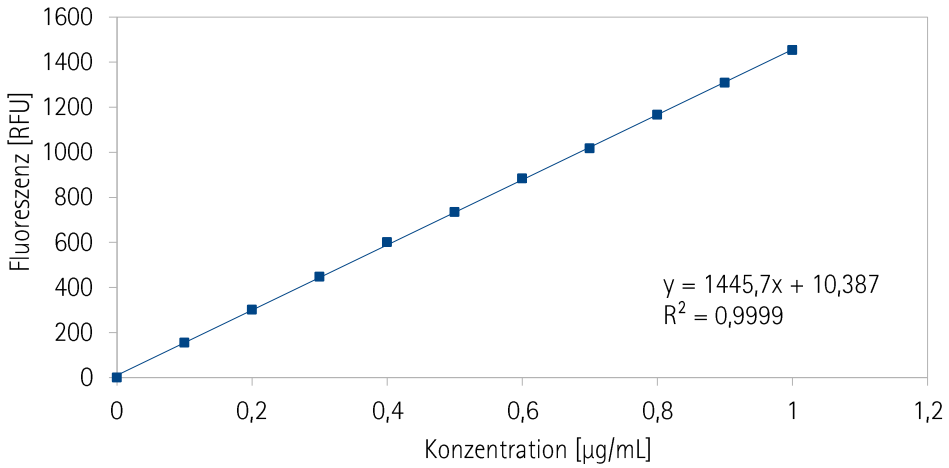

Abbildung 81: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 7,4.

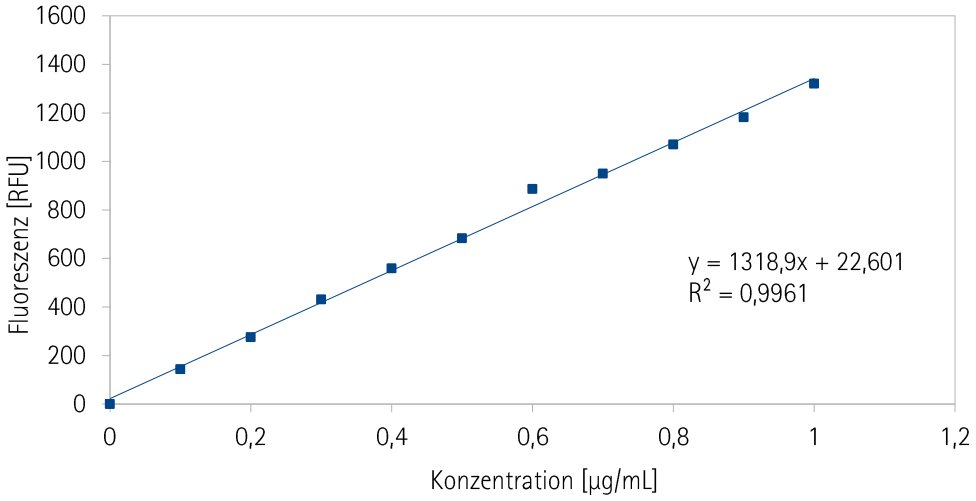

Abbildung 82: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 8.

6.2.6 Zellkulturtechniken

6.2.6.1 Revitalisieren von Säugertierzellen

Die Zellen werden nach der Gewinnung aus dem jeweiligen (Tumor-)Gewebe in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Um die Zellen zu revitalisieren, wurden sie aus dem Stickstoff in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend auf frischem Medium in einer 175 cm^2 Kulturflasche ausplattiert. Dem Medium DMEM (vgl. Tabelle xx) waren 1 % P/S und 10 % FKS zugesetzt. Die Zellen wurden in einer Kulturflasche bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

6.2.6.2 Kultivieren und Passagieren von Säugertierzellen

Alle Zellen werden mit DMEM (mit 10 % FKS und 1 % P/S) in Zellkulturflaschen kultiviert. Sobald die Zellen in der Kulturflasche eine 80 – 90 %ige Konfluenz erreichen, werden sie zur Vervielfältigung passagiert. Dazu wird zunächst das alte Medium vollständig entfernt und die Zellen anschließend mit 10 mL PBS gewaschen. Nachfolgend werden sie mit 5 mL Accutase 5 min lang bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Accutase sorgt dafür, dass die Bindungen der Zellen an die Kulturoberfläche gelöst werden. Die Ablösung der Zellen kann nach der Inkubationszeit durch Klopfen an das Kulturgefäß unterstützt werden. Nach der Ablösung erfolgen die Zugabe von 5 mL Medium und die Überführung der Suspension in ein Falcontube. Anschließend wird die Suspension 5 min lang bei 0.3 rcf zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 5 mL frischem Medium resuspendiert. Etwa ein Zehntel der resuspendierten Zellen wird anschließend in ein neues Kulturgefäß überführt.

Um die Zelldichte (Zellen/mL) zu bestimmen, muss die Zellzahl bestimmt werden. Dies geschieht mittels Neubauer Improved Zählkammer (Brand GmbH Wertheim). Dafür wird zunächst ein Deckgläschen auf die Seitenstege der Kammer gelegt. Anschließend werden einige µL der mit Trypanblau gefärbten Zellsuspension an die Kante des Deckgläschens pipettiert. Durch die vorhandenen Kapillarkräfte zieht sich die Flüssigkeit über das Zählfeld in die Kammer. Das Zählfeld besteht aus vier Großquadraten, die jeweils in weitere 16 Quadrate unterteilt sind. Alle Zellen, die innerhalb des genannten Zählfeldes liegen, werden ausgezählt, deren Mittelwert gebildet und mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Verdünnung müssen mit eingerechnet werden. So kann die Zellzahl/ mL bestimmt werden.

6.2.6.3 Kryokonservierung von Säugertierzellen

Zur Lagerung von Zellen werden sie kryokonserviert. Dazu werden zunächst Kryoröhrchen mit dem Namen der entsprechenden Zelllinie, deren Passagenzahl, dem Datum, der Zellzahl und dem Kürzel des Einfrierenden versehen. Anschließend müssen diese vorrübergehend bei 4 °C in einem Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container, der mit 70°%igem Isopropanol gefüllt ist, gelagert werden. Die Zellen werden, wie unter 6.2.5.2 beschrieben abgelöst und abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand entfernt und das Zellpellet mit Kryomedium resuspendiert. Das Kryomedium besteht aus DMEM Flüssigmedium, welches mit 10 % DMSO und 20 % FKS versetzt ist. Dann wird die Suspension auf die Kryoröhrchen aufgeteilt (je 1 mL) und zunächst für 24 h im Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container bei -80 °C eingefroren. Anschließend können die Zellen in den Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert werden.

6.2.7 Charakterisierung der Bindung und zellulären Aufnahme von Aptamer-Nanopartikel-Konjugaten an Zellen

Untersuchung der Zellbindung von Aptameren

Eine Möglichkeit zur Charakterisierung der Zellbindung der ausgewählten Aptamere kann über Fluoreszenzmarkierungen erfolgen. Dazu wurden verschiedene Ablösemthoden der adhärenten Zellen untersucht, da es die Vermutung gibt, dass das Target des Aptamers durch das Ablösen der Zellen zerstört würde. Als Fluoreszenzmarker wurde in der vorliegenden Arbeit FITC markiertes S15 verwendet. Zunächst werden die entsprechenden Zellen 48 h kultiviert. Dann wird das alte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit verschiedenen Ablöselösungen 5 min bei 37 °C inkubiert. Dies waren eine Trypsin/EDTA (0,2%) Lösung, eine kommerzielle Ablöselösung und eine Natriumcitrat-Kaliumchlorid-Lösung. Die Reaktion wurde mit

frischem Medium abgestoppt. Bei der Ablösemethode mit dem Zellschaber wurden die Zellen mit dem Schaber abgelöst und anschließend in PBS aufgenommen. Bei allen Methoden wurden die Zellen 5 min bei 0.3 rcf zentrifugiert und dann der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in kaltem PBS resuspendiert und 300.000 Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut 5 min bei 0.3 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µL Aptamerlösung (200 nM in Inkubationspuffer) resuspendiert. Die Inkubation der Zellen mit der Aptamerlösung erfolgt rotierend für 4 h unter Lichtausschluss. Anschließend werden die Zellen zweimal mit Aptamerbindepuffer gewaschen, damit ungebundenes Aptamer entfernt wird. Dann werden die Zellen in 300 µL Inkubationspuffer resuspendiert und anschließend hinsichtlich ihrer Fluoreszenz mittels Durchflusszytometer (6.2.10) charakterisiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der Bindung von Aptameren an Zellen ist die Kopplung der Aptamere an Quantum Dots. Die Aptamer-Quantum Dot-Konjugate werden anschließend auf die Zellen gegeben; deren Lokalisation erfolgt mittels Fluoreszenz-mikroskopie. Dazu werden 8000 Zellen in Kammern auf polylysinbeschichteten Glasobjektträgern für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Das Medium wird entfernt und die Zellen mit 50 µL Inkubationspuffer für 15 min inkubiert. Der Puffer wird abgesaugt und die Konjugate (50 µL; 100 nM in Inkubationspuffer) für 2 h bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Anschließend wird die Quantum Dot – Aptamer Suspension abgesaugt und die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen. Es folgt eine DAPI Färbung (Anhang 6.2.4.7). Mittels Fluoreszenzmikroskopie können dann sowohl die Quantum Dots, als auch die Zellkerne sichtbar gemacht werden.

Bei allen, mit dieser Methode durchgeführten Experimenten wurden Zellen genutzt, deren Passagenzahl unter 15 lag.

Bindungsaffinität des S15 Aptamers an die A549 Zellen

Zur Untersuchung der Bindungsaffinität wurde zunächst eine Konzentrationsreihe der S15 QD – Konjugate in Inkubationspuffer (6.1.3) hergestellt. Die A549 Zellen wurden in 24 Wellplatten bis zur 70 %igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen. Dann wurden sie mit der zuvor hergestellten Konzentrationsreihe (0,78 nM bis 50 nM) für 50 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die S15-QD Lösungen entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Konjugate zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µL Bindepuffer versetzt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Zelluläre Aufnahme der Aptamer-Quantum Dot – Konjugate

Für die Untersuchung der selektiven Internalisierung der S15 gekoppelten QDs wurden zunächst die Zelllinien A549, HeLa und BEAS2B bis zur 50 %igen Konfluenz auf µ-Slides VI 0.1 (Ibidi, Martinsried, Germany) kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und durch serumfreies Medium, das mit 50 nM S15-QDs und Rnd-QDs versehen war, ersetzt. Die Zellen wurden 2 h lang mit den Lösungen inkubiert. Die Charakterisierung der zellulären Aufnahme findet sich in Kapitel 6.2.8.

6.2.8 Charakterisierung der Wirkstoffaufnahme in die Zellen

Für die Charakterisierung der Wirkstoffaufnahme in die Zellen, wurden diese (A549) auf 96 Wellplatten mit einer Dichte von 4000 Zellen/Well ausplattiert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Es wurde eine Konzentrationsreihe des Wirkstoffes in Medium hergestellt. Die Konzentrationen waren: 1 mM, 100 µM, 50 µM, 10 µM, 1 µM, 500 nM, 100 nM und 50 nM. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und anschließend wurden diese mit jeweils 100 µL der jeweiligen Konzentrationen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurden die Inkubationslösungen entfernt und zur Charakterisierung der Viabilität erfolgte ein CTB Test (Kapitel 6.2.9.2)

6.2.9 Zellassays

6.2.9.1 Zellfärbungen mittels Calcein AM und Propidiumiodid

Calcein AM ist ein Farbstoff, um die Zellviabilität zu ermitteln. Lebende Zellen spalten durch Esterasen den **A**cetoxy**m**ethylester ab und das Calcein bindet Kalziumionenin, was in einem grün fluoreszierenden Komplex resultiert. Diese Komplexe sind dann mittels Mikroskop detektierbar. Da tote Zellen keine aktiven Esterasen mehr besitzen, kann dieser Farbstoff nur für die Detektion lebender Zellen eingesetzt werden. Propidiumiodid dagegen ist ein rot-fluoreszierender Farbstoff, der durch die permeable Zellmembran toter Zellen dringt und sich dann dort in der DNA einlagert. Durch die Zellmembran lebender Zellen kann der Farbstoff nicht eindringen und kann somit nur für die Charakterisierung toter Zellen verwendet werden.

Aus der Stocklösung von Calcein AM (1 mg/mL in DMSO) wird eine Arbeitslösung hergestellt. Dies geschieht durch eine 1:30 Verdünnung mit sterilem PBS. Anschließend wird die Calein AM Arbeitslösung 1:10 mit Flüssigmedium ohne Zusätze verdünnt. Dann wird aus der Propidiumiodid-Stocklösung (1 mg/mL) eine Arbeitslösung (50 µg/mL in 0,9 % NaCl) hergestellt. Die Calein AM

Arbeitslösung wird mit der fertigen Propidiumiodid-Arbeitslösung versetzt (1 µL je 100 µL Färbelösung). Es erfolgt anschließend die Inkubation der Zellen für 30 min bei 37 °C und 5 % CO_2.

6.2.9.2 CellTiter-Blue® - Viabilitäts - Assay

Die Viabilität der Zellen wurde mit dem CellTiter-Blue® Viability Assay der Firma Promega bestimmt. CellTiter-Blue® ist eine tiefblaue Lösung, die eine geringe Eigenfluoreszenz besitzt. Lebendige Zellen können den enthaltenen Farbstoff Resazurin zu fluoreszierendem Resorufin verstoffwechseln. Resazurin ist ein tiefblauer Farbstoff, während Resofurin einen lila/ pinken Farbkomplex ausbildet.
Die Zellen werden bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert und dann mit verschiedenen Versuchsbedingungen inkubiert. Um deren Viabilität zu bestimmen, muss zunächst das Medium bzw. die Inkubationslösung von den Zellen entfernt werden. Dann werden die Zellen mit warmem PBS gewaschen. Die Celltiter-Blue® Stocklösung wird 1:10 mit Medium ohne Zusätze verdünnt und dann auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 1 h und 4 h. Nach einem deutlichen Farbumschlag kann die Fluoreszenz (Ex_{544nm}/Em_{590nm}) mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts bestimmt werden.

6.2.9.3 Hoechst® 33342 Färbung

Hoechst® 33342 dient zur Färbung der DNA im Zellkern von Zellen. Um Zellen damit färben zu können, muss zunächst eine Stocklösung hergestellt werden. Dazu wird mit deionisiertem Wasser eine 10 mg/mL (16.23 mM) Lösung hergestellt. Die Färbelösung wird durch eine 1:2000 Verdünnung der Stocklösung mit PBS hergestellt.
Die Zellen werden bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Dann wird das Medium entfernt und, je nachdem, in welchem Kulturgefäß die Zellen kultiviert wurden, eine entsprechende Menge an Hoechst® 33342 Färbelösung (1:2000 in PBS verdünnt) hinzugefügt. Die Zellen mit der Färbelösung werden 5 – 10 min unter Lichtausschluss bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Dann können die Zellen bei einer Exzitation/Emission von 350/461 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

6.2.9.4 DAPI Färbung

Mit Hilfe der 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung können Zellkerne sichtbar gemacht werden. Dabei bindet der Farbstoff an AT-reiche Regionen der DNA [152]. Für die Färbung werden die Zellen zunächst in einer 96 Wellplatte bei 37 °C und 5 % CO_2 für 48 h kultiviert. Anschließend

wird das alte Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen oder die entsprechenden Inkubationsbedingungen dazu gegeben. Nach Entfernen des PBS oder der Inkubationslösungen werden 100 µL der Färbelösung in die Wells gegeben und für 10-15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung entfernt, zweimal mit PBS gewaschen und die Färbung der Zellkerne mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops betrachtet.

6.2.9.5 pHrodo™ Green Dextran

Der fluoreszente Farbstoff pHrodo™ Green Dextran dient der Lebendzellfärbung zur Endozytose. Der Farbstoff besitzt eine pH sensitive Fluoreszenz Emission, was bedeutet, dass, je saurer der pH-Wert, desto stärker die Intensität des Farbstoffes. In der extrazellulären Umgebung ist der Farbstoff nicht fluoreszent.

Zur Charakterisierung der Endozytose werden zunächst die Zelllinien A549 und HeLa mit 8000 Zellen/ Well auf Poly-L-Lysin Slides ausplattiert und bis zur 80 %igen Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Das alte Medium wird abgesaugt und die Zellen werden mit dem pHrodo™ Green Dextran in einer Konzentration von 20 µg/mL in PBS für 15 min inkubiert. Anschließend werden die Zellkerne mittel Hoechst® 33342 Färbung angefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 509/533 nm Ex/Em betrachtet.

Bei der Untersuchung, ob die mit S15 oder Random-Oligonukleotid funktionalisierten QDs über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden, werden ebenfalls 8000 Zellen/ Well ausplattiert und bis zur 80 %igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wird das alte Medium entfernt und die Zellen mit den QD-Lösungen (80 nM) für 2 h inkubiert. Dann erfolgt die Inkubation mit pHrodo™ Green Dextran.

6.2.9.6 CellMask™ Green Membrane Stain

Eine weitere Möglichkeit, zur Charakterisierung der zellulären Aufnahme der Nanopartikel bietet die Lebendzellfärbung mit CellMask™ Green Membrane Stain. Hier wird die Zellmembran angefärbt und bietet somit die Möglichkeit, eventuelle Membraneinstülpungen, wie sie durch Endozytose entstehen, zu charakterisieren.

Daher werden zunächst wieder die Zelllinien A549 und HeLa mit 8000 Zellen/ Well auf Poly-L-Lysin Slides ausplattiert und bis zur 80 %igen Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Anschließend wird das alte Medium entfernt und die Zellen mit einer CellMask™ Green Membrane Stain Arbeitslösung (1:1000 aus der Stammlösung in PBS) für 15 min inkubiert (. Dann wird die Lösung entfernt, die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen und mit den QD-Lösungen (QDS15 und

QDRnd) für 30 min inkubiert. Auch diese Lösungen werden anschließend entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellkerne mittels Hoechst® 33342 Färbung angefärbt. Das Ergebnis kann bei 522/ 535 Ex/Em unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

6.2.9.7 Endozytose-Assays

Da die Endozytose-Assays von Shira Engelberg vom Technion in Haifa durchgeführt wurden, ist hier nur grob aufgeführt, wie die Experimente durchgeführt wurden.

Die Zelllinien A549 und HeLa werden auf µ-Slides VI 0.1 der Firma Ibidi ausplattiert und für 18 h inkubiert, um sicherzustellen, dass diese auf der Oberfläche der Slides adhärieren können. Dann wird das alte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um den Mechanismus der Internalisierung zu untersuchen, werden die Zellen zunächst mit verschiedenen Inhibitorlösungen und anschließend mit der QDS15-Lösung inkubiert. Die Inhibitorlösungen werden in folgenden Konzentrationen hinzugegeben: 5 µM Cytochalasin D, 1 µg/ mL Filipin, 80 µM Dynasor (für jeweils 30 min), 1 mM Amilorid und 25 µM Pitstop-2 (jeweils für 10 min). Die Lösungen werden anschließend entfernt und die Zellen mit der QDS15-Lösung für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Quantum Dot-Lösung entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und deren Zellkerne mit Hoechst® 33342 gefärbt. Das Ergebnis wird über ein Konfokalmikroskop betrachtet [144].

6.2.10 Durchflusszytometrische Messungen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann eine schnelle, quantitative Detektion und Charakterisierung von Zellen erfolgen. Dabei können über das von einem Laser eingestrahlte und den Zellen gestreute Licht Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden. Weiterhin können jedoch auch Bindungen von Konjugaten an Zellen untersucht werden. Dies geschieht über die Detektion der Fluoreszenzintensitäten, der an die Zellen oder Konjugate gebundenen Fluorophore oder durch die Eigenfluoreszenz der Zellen.

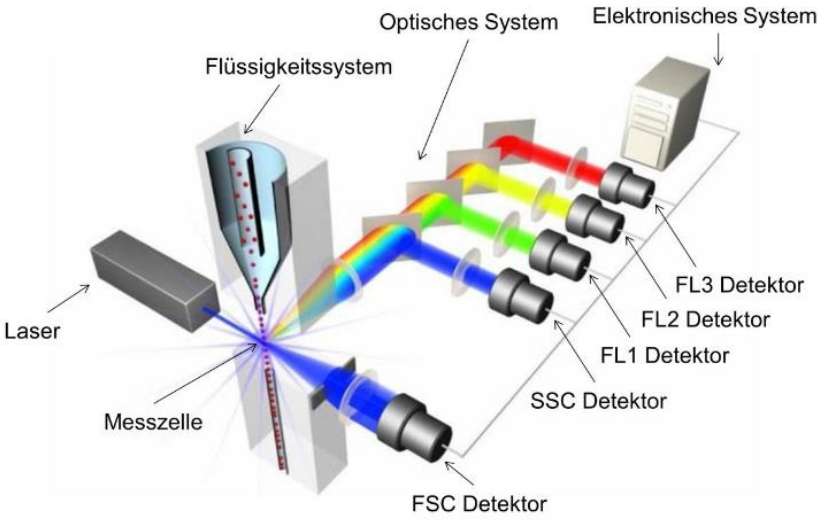

Abbildung 83: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers [153].

Abbildung 83 zeigt den schematischen Aufbau eines Durchflusszytometers. Hier trifft in der Messzelle der Laserstrahl auf die suspendierten Zellen. Im optischen System wird das Streu- oder Fluoreszenzlicht mit Hilfe verschiedener Spiegel und Filter zu den entsprechenden Detektoren geleitet. Dort wird das Licht in ein elektronisches Signal umgewandelt und kann am Computer ausgewertet werden [153]. Die Messungen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers BD Accuri 6 aufgenommen. Über die Messung des Streulichts konnten Aussagen über die Viabilität der Zellen getroffen werden. Diese wurde in einem Diagramm, Vorwärts- und Rückwärtsstreulicht gegeneinander ausgegeben, dargestellt. Anhand dieser Darstellung wird ein Bereich festgelegt (*gated*); innerhalb dieses Bereiches gelten die Zellen als lebend, außerhalb als tot. Mit Hilfe dieses *Gates* können die Messungen untereinander verglichen werden. Das Gate für die Zellen in der vorliegenden Arbeit war bei 15 000 Zellen.

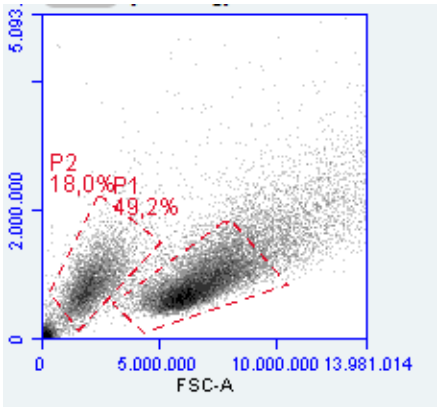

Abbildung 84: Beispielhafte Darstellung der definierten *Gates* für lebende (P1) und tote Zellen (P2).

Um Bindungen von Aptameren oder QDS15 Konjugaten an Zellen untersuchen zu können, mussten die relativen Fluoreszenzinensitäten bestimmt werden. Dazu wurde, je nach Emissionswellenlänge der entsprechende Fluoreszenzdetektor ausgewählt. Für die Untersuchung der FITC-markierten Aptamere wurde der FL 1 Detektor ausgewählt, da FITC grünes Licht emittiert. Für die QDS15 Konjugate wurde der FL 3 Detektor verwendet, da diese rotes Licht emittieren. Mit Hilfe der Software kann anschließend eine mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt werden.

Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D.: Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 2011, 69–90
2. Parveen, S., Sahoo, S.K.: Polymeric nanoparticles for cancer therapy. Journal of drug targeting, 2008, 108–123
3. Aravind, A., Nair, R., Raveendran, S., Veeranarayanan, S., Nagaoka, Y., Fukuda, T., Hasumura, T., Morimoto, H., Yoshida, Y., Maekawa, T., Sakthi Kumar, D.: Aptamer conjugated paclitaxel and magnetic fluid loaded fluorescently tagged PLGA nanoparticles for targeted cancer therapy. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 116–123
4. Danhier, F., Feron, O., Préat, V.: To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 135–146
5. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G., Shin, D.M.: Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research (2008). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441
6. Ha, S.-W., Wintermantel, E.: Kontrollierte therapeutische Systeme (Controlled drug delivery systems). Medizintechnik-Life Science Engineering, 2009, 1297–1312
7. Ruggiero, C., Pastorino, L., Herrera, O.L.: Nanotechnology based targeted drug delivery (2010)
8. Koo, O.M., Rubinstein, I., Onyuksel, H.: Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine (2005). doi: 10.1016/j.nano.2005.06.004
9. Kewal K. Jain (ed.) (ed.): Methods in Molecular Biology. Drug Delivery Systems. Humana Press, Totowa, NJ
10. Coelho, J.F., Ferreira, P.C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A.C., Góis, J.R., Gil, M.H.: Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. The EPMA journal (2010). doi: 10.1007/s13167-010-0001-x
11. Langer, R.: Drug delivery and targeting. Nature Reviews, 1998
12. Allen, T.M., Cullis, P.R.: Drug Delivery Systems_Entering the mainstream. Science, 1818–1822
13. Branco de Barros, A.L., Carolina de Aguiar Ferreira: Aptamer Functionalized Nanoparticles for Cancer Targeting. J Mol Pharm Org Process Res (2013). doi: 10.4172/2329-9053.1000105
14. Farokhzad, O.C., Langer, R.: Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS nano (2009). doi: 10.1021/nn900002m

15. Langer, R.S., Folkman, J.: Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. Nature Reviews, 1976, 797–800
16. Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S., Shakesheff, K.M.: Polymeric Systems for Controlled Drug Release. Chem. Rev., 1999, 3181–3198
17. Matsumura, Y., Maeda, H.: A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Therapy. Cancer Research, 6387–6392
18. Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk. D.A., Torchilin, V.P., Jain, R.K.: Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft_Molecular Size Dependence and Cutoff Soze. Cancer Research, 1995, 3752–3756
19. Siemann, D.W.: The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. Cancer treatment reviews (2011). doi: 10.1016/j.ctrv.2010.05.001
20. Sinha, R., Kim, G.J., Nie, S., Shin, D.M.: Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Molecular cancer therapeutics (2006). doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0141
21. Lee, E.S., Oh, K.T., Kim, D., Youn, Y.S., Bae, Y.H.: Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine). J Control Release, 2007, 19–26
22. Gullotti, E., Yeo, Y.: Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery. Molecular pharmaceutics (2009). doi: 10.1021/mp900090z.
23. Farokhzad, O.C., Karp, J.M., Langer, R.: Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting. Expert opinion on drug delivery (2006). doi: 10.1517/17425247.3.3.311
24. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C.: Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. Molecular pharmaceutics, 2008, 505–515
25. Rizvi, S.A.A., Saleh, A.M.: Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society (2018). doi: 10.1016/j.jsps.2017.10.012
26. Dong, X., Mumper, R.J.: Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. Nanomedicine (London, England) (2010). doi: 10.2217/nnm.10.35
27. Livney, Y.D., Assaraf, Y.G.: Rationally designed nanovehicles to overcome cancer chemoresistance. Advanced Drug Delivery Reviews(65), 1716–1730 (2013)
28. Guasch, A., Deen, W.M., Myers, B.D.: Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans. The Journal of clinical investigation, 1993, 2274–2282

29. Rennke, H.G., Cotran, R.S., Venkatachalam, M.A.: Role of Molecular Charge in Glomerular Permeability. Tracer Studies with Cationized Ferritins. Journal of Cell Biology, 1975, 638–646
30. Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., E. Dellacherie, Harnisch, S., Blunk, T., Müller, R.H.: 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. Journal of Controlled Release, 2001, 121–136
31. Gabizon, A.A., Shmeeda, H., Zalipsky, S.: Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. Journal of liposome research, 2008, 175–183
32. Gabizon, A.A.: Pegylated Liposomal Doxorubicin. Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy. Cancer Investigation, 2001, 424–436
33. Himmelweit, F.: The collected papers of Paul Ehrlich. Pergamon Press, London (1960)
34. Fahmy, T.M., Fong, P.M., Goyal, A., Saltzman, W.M.: Targeted for drug delivery. Materials Today (2005). doi: 10.1016/S1369-7021(05)71033-6
35. M. Schäfer-Korting (ed.) (ed.): Drug Delivery. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg (2010)
36. Haag, R., Kratz, F.: Polymere Therapeutika. Konzepte und Anwendungen. Angew. Chem., 1218–1237
37. Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C., Langer, R.: Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. Nano letters (2010). doi: 10.1021/nl102184c
38. Toporkiewicz, M., Meissner, J., Matusewicz, L., Czogalla, A., Sikorski, A.F.: Toward a magic or imaginary bullet? Ligands for drug targeting to cancer cells: principles, hopes, and challenges. International Journal of Nanomedicine, 1399–1414
39. Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W.E., Storm, G.: Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 175–187
40. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P.M., Radovic-Moreno, A.F., Farokhzad, O.C.: Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. Chemical Society reviews (2012). doi: 10.1039/c2cs15344k
41. Rani, K., Paliwal, S. A Review on Targeted Drug Delivery: its entire Focus on Advanced Therapeutics and Diagnostics. Scholars Journal of Applied Medical Sciences, 2014, 328–331
42. Singh, R., Lillard, J.W.: Nanoparticle-based targeted drug delivery. Experimental and molecular pathology (2009). doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.004
43. Papazoglou, E., Parthasarathy, A. (eds.): BioNanotechnology (2007)

44. Hans, M.L., Lowman, A.M.: Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. Current Opinion in Solid State and Materials Science (2002). doi: 10.1016/S1359-0286(02)00117-1
45. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C.K., Rotello, V.M.: Gold nanoparticles in delivery applications. Advanced Drug Delivery Reviews, 1307–1315
46. Wu, X., Tian, F., Zhao, J.X., Wu, M.: Evaluating pharmacokinetics and toxicity of luminescent quantum dots. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 1265–1277
47. Aravind, A., Veeranarayanan, S., Poulose, A.C., Nair, R., Nagaoka, Y., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, S.: Aptamer-Functionalized Silica Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. BioNanoScience, 2012, 1–8
48. Wu, X., Chen, J., Wu, M., Zhao, J.X.: Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy. Theranostics (2015). doi: 10.7150/thno.10257
49. Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y.: Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 113–131
50. Wang, A.Z., Bagalkot, V., Vasilliou, C.C., Gu, F., Alexis, F., Zhang, L., Shaikh, M., Yuet, K., Cima, M.J., Langer, R., Kantoff, P.W., Bander, N.H., Jon, S., Farokhzad, O.C.: Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy. ChemMedChem (2008). doi: 10.1002/cmdc.200800091
51. Meng, L., Zhang, X., Lu, Q., Fei, Z., Dyson, P.J.: Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: Targeting doxorubicin to tumors. Biomaterials, 2012, 1689–1698
52. Pan, Y., Sashoo, N.G., Li, L.: The application of graphene oxide in drug delivery. Expert opinion on drug delivery, 2012
53. Ozalp, V.C., Eyidogan, F., Oktem, H.A.: Aptamer-Gated Nanoparticles for Smart Drug Delivery. Pharmaceuticals (2011). doi: 10.3390/ph4081137
54. Nagavarma, B.N.V., Hemant, K.S.Y., Ayaz, A., Vasudham L.S., Shivakumar, H.G.: Different Techniques for Preparation of polymeric nanoparticles-A Review. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2012, 16–23
55. Danafar, H.: MPEG–PCL copolymeric nanoparticles in drug delivery systems. Cogent Medicine (2016). doi: 10.1080/2331205X.2016.1142411
56. Lemoine, D., Francois, C., Kedzierewicz, F., Preat, V., Hoffman, M., Maincent, P.: Stability study of nanoparticles of poly(ε-caprolactone), poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide). Biomaterials, 2191–2197
57. Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C.: Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces (2010). doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

58. Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S., Farokhzad, O.C.: Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments, 2008
59. Li, B., Wang, Q., Wang, X., Wang, C., Jiang, X.: Preparation, drug release and cellular uptake of doxorubicin-loaded dextran-b-poly(**ε**-caprolactone) nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 2013, 430–437
60. Davis, N.: Polyoxazolines: An Alternative to Polyethylene Glycol
61. Li, X., Liu, K.L., Li, J., Tan, E.P.S., Chan, L.M., Lim, C.T., Goh, S.H.: Synthesis, Characterization, and Morphology Studies of Biodegradable Amphiphilic Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-alt-Poly(ethylene glycol) Multiblock Copolymers. Biomacromolecules (2006). doi: 10.1021/bm060675f
62. Chan, R.T.H., Marçal, H., Russell, R.A., Holden, P.J., Foster, L.J.R.: Application of Polyethylene Glycol to Promote Cellular Biocompatibility of Polyhydroxybutyrate Films. International Journal of Polymer Science (2011). doi: 10.1155/2011/473045
63. Rao, J.P., Geckeler, K.E.: Polymer nanoparticles. Preparation techniques and size-control parameters. Progress in Polymer Science, 887–913
64. Dhar, S., Gu, F.X., Langer, R., Farokhzad, O.C., Lippard, S.J.: Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 17356–17361
65. Bharadwaj, R., Yu, H.: The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. Oncogene, 2016–2027
66. Miele, E., Spinelli, G.P., Tomao, F., Tomao, S.: Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. International Journal of Nanomedicine, 2009, 99–105. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2720743/
67. National Cancer Institute: Camptothecin (2017)
68. National Center for Biotechnology Information.: Camptothecin. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24360 (2018)
69. sigmaaldrich. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t7402?lang=de&region=DE
70. sigmaaldrich. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9911?lang=de&region=DE
71. Ellington, Andrew D., Szostak, J.W.: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature

72. Sun, H., Zu, Y.: A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. Molecules (Basel, Switzerland), 2015, 11959–11980
73. Prakash, J.S., Rajamanickam, K.: Aptamers and Their Significant Role in Cancer Therapy and Diagnosis. Biomedicines, 2015, 248–269
74. Yang, L., Zhang, X., Ye, M., Jiang, J., Yang, R., Fu, T., Chen, Y., Wang, K., Liu, C., Tan, W.: Aptamer-conjugated nanomaterials and their applications. Advanced Drug Delivery Reviews (2011). doi: 10.1016/j.addr.2011.10.002
75. Yang, J., Hu, J.: Aptamer-functionalized nanoparticles for targeted drug delivery in cancer therapy. Eur. J. Bio. Med. Res. (2015). doi: 10.18088/ejbmr.1.3.2015.pp17-24
76. Drolet, D.W., Nelson, J., Tucker, C.E., Zack, P.M., Nixon, K., Bolin, R., Judkins, M.B., Farmer, J.A., Wolf, J.L., Gill, S.C., Bendele, R.A.: Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. Pharmaceutical research **17**(12), 1503–1510 (2000)
77. Sun, H., Zhu, X., Lu, P.Y., Rosato, R.R., Tan, W., Zu, Y.: Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. Molecular therapy. Nucleic acids, 2014, e182
78. Lee, J.H., Yigit, M.V., Mazumdar, D., Lu, Y.: Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. Advanced Drug Delivery Reviews (2010). doi: 10.1016/j.addr.2010.03.003
79. Song, K.-M., Lee, S., Ban, C.: Aptamers and their biological applications. Sensors (Basel, Switzerland) (2012). doi: 10.3390/s120100612
80. Farokhzad, O.C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T.-N.T., LaVan, D.A., Langer, R.: Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells. Cancer Research(1), 7668–7672 (2004)
81. Reinemann, C., Strehlitz, B.: Aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment. Swiss medical weekly (2014). doi: 10.4414/smw.2014.13908
82. Aravind, A., Varghese, S.H., Veeranarayanan, S., Mathew, A., Nagaoka, Y., Iwai, S., Fukuda, T., Hasumura, T., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D.S.: Aptamer-labeled PLGA nanoparticles for targeting cancer cells. Cancer nanotechnology (2012). doi: 10.1007/s12645-011-0024-6
83. Beddoes, C.M., Case, C.P., Briscoe, W.H.: Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. Advances in colloid and interface science, 2015, 48–68
84. Oh, N., Park, J.-H.: Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. International Journal of Nanomedicine, 2014, 51–63

85. Gao, H., Shi, W., Freund, L.B.: Mechanics of receptor-mediated endocytosis. PNAS, 2005, 9469–9474
86. McMahon, H.T., Boucrot, E.: Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nature reviews. Molecular cell biology, 2011, 517–533
87. Maelicke, A., Kürz, L., Bieg, S.: Die Rezeptor-vermittelte Endozytose
88. Zhao, Z., Xu, L., Shi, X., Tan, W., Fang, X., Shangguan, D.: Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells. The Analyst (2009). doi: 10.1039/b904476k
89. Zheng, X., Kan, B., Gou, M., Fu, S., Zhang, J., Men, K., Chen, L., Luo, F., Zhao, Y., Zhao, X., Wei, Y., Qian, Z.: Preparation of MPEG-PLA nanoparticle for honokiol delivery in vitro. International journal of pharmaceutics (2010). doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.014
90. Huang, P., Yang, C., Liu, J., Wang, W., Guo, S., Li, J., Sun, Y., Dong, H., Deng, L., Zhang, J., Liu, J., Dong, A.: Improving the oral delivery efficiency of anticancer drugs by chitosan coated polycaprolactone-grafted hyaluronic acid nanoparticles. J. Mater. Chem. B (2014). doi: 10.1039/c4tb00273c
91. Danafar, H., Davaran, S., Rostamizadeh, K., Valizadeh, H., Hamidi, M.: Biodegradable m-PEG/PCL Core-Shell Micelles. Preparation and Characterization as a Sustained Release Formulation for Curcumin. Advanced pharmaceutical bulletin (2014). doi: 10.5681/apb.2014.074
92. Alami-Milani, M., Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Salehi, R., Jelvehgari, M.: Preparation and evaluation of PCL-PEG-PCL micelles as potential nanocarriers for ocular delivery of dexamethasone. Iranian journal of basic medical sciences (2018). doi: 10.22038/IJBMS.2017.26590.6513
93. Gao, H., Qian, J., Cao, S., Yang, Z., Pang, Z., Pan, S., Fan, L., Xi, Z., Jiang, X., Zhang, Q.: Precise glioma targeting of and penetration by aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles. Biomaterials (2012). doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.058
94. Gao, X., Wang, B., Wei, X., Rao, W., Ai, F., Zhao, F., Men, K., Yang, B., Liu, X., Huang, M., Gou, M., Qian, Z., Huang, N., Wei, Y.: Preparation, characterization and application of star-shaped PCL/PEG micelles for the delivery of doxorubicin in the treatment of colon cancer. International Journal of Nanomedicine (2013). doi: 10.2147/IJN.S39532
95. Wang, Y., Li, P., Tran, T.-N.T., Zhang, J., Kong, L.: Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. Nanomaterials, 2016. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5302480/
96. Cooper, A.: An Introduction to Dynamic Light Scattering

97. Guo, J., Gao, X., Su, L., Xia, H., Gu, G., Pang, Z., Jiang, X., Yao, L., Chen, J., Chen, H.: Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. Biomaterials (2011). doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.004
98. Hintz, W.: Charakterisierung von Nanopartikeln
99. Mallakpour, S., Behranvand, V.: Polymeric nanoparticles. Recent development in synthesis and application. Express Polym. Lett., 2016, 895–913
100. McClements, D.J.: Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems. Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds. CRC Press (2014)
101. Saint-Cricq-Riviere, P.: Effect on Stirring or stirring rate on Particle shape. https://www.researchgate.net/post/Is_there_any_significant_effect_of_stirring_or_stirring_rate_on_particle_shape (2015)
102. Karaagac, O., Kockar, H.: Effect of Synthesis Parameters on the Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. J Supercond Nov Magn, 2012, 2777–2781
103. Balavandy, S.K., Shameli, K., Biak, D.R.B.A., Abidin, Z.Z.: Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method. Chemistry Central journal (2014). doi: 10.1186/1752-153X-8-11
104. Mrad, K., Schoenstein, F., Nong, H.T.T., Anagnostopoulou, E., Viola, A., Mouton, L., Mercone, S., Ricolleau, C., Jouini, N., Abderraba, M., Lacroix, L.-M., Viau, G., Piquemal, J.-Y.: Control of the crystal habit and magnetic properties of Co nanoparticles through the stirring rate. CrystEngComm (2017). doi: 10.1039/C7CE00714K
105. azonano: Using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) to Assess Nanoparticle Toxicity in Waste Water. http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4067
106. Filipe, V., Hawe, A., Jiskoot, W.: Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. Pharmaceutical research, 2010, 796–810
107. NanoSight: NanoParticle Tracking Analysis (NTA) and Dynamic Light Scattering (DLS) - Comparison between NTA and DLS (2009)
108. Nanthakasri, W.: Biodegradable Blend Nanoparticles of Amphiphilic Diblock Copolymers Prepared by Nano-Precipitation Method. JBNB (2011). doi: 10.4236/jbnb.2011.225067
109. Baimark, Y., Srisuwan, Y.: Biodegradable nanoparticles of methoxy poly (ethlene glycol)-b-poly(D,L-lactide)/methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly(e-cparolactone) blends for drug delivery. Nanoscale Research Letters (2012)

110. Glawdel, T., Ren, C.: Zeta Potential Measurement. Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics, 2008
111. Clogston, J.D., Patri, A.K.: Zeta potential measurement. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2011, 63–70
112. He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C.: Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. Biomaterials (2010). doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.065
113. Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S., Altschuler, Y.: Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. Biochemical and biophysical research communications, 26–32
114. Ulusoy, M., Jonczyk, R., Walter, J.-G., Springer, S., Lavrentieva, A., Stahl, F., Green, M., Scheper, T.: Aqueous Synthesis of PEGylated Quantum Dots with Increased Colloidal Stability and Reduced Cytotoxicity. Bioconjugate chemistry (2015). doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00491
115. Bongartz, R.: Entwicklung von Lebendzell-Microarrays und ihre Anwendung in der Detektion klinisch relevanter Biomarker (2014)
116. Mohanraj, V.J., Chen, Y.: Nanoparticles - A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2006, 561–573
117. Lu, G.W., Gao, P.: Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. doi: 10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4
118. Urmann, K., Modrejewski, J., Scheper, T., Walter, J.-G.: Aptamer-modified nanomaterials. Principles and applications. BioNanoMaterials (2017). doi: 10.1515/bnm-2016-0012
119. Dong, Y.(e.) (ed.): Aptamers for Analytical Applications: Affinity Acquisition and Method Design. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA (2018)
120. Lönne, M., Bolten, S., Lavrentieva, A., Stahl, F., Scheper, T., Walter, J.-G.: Development of an aptamer-based affinity purification method for vascular endothelial growth factor. Biotechnology Reports (2015). doi: 10.1016/j.btre.2015.08.006
121. Desjardins, P., Conklin, D.: NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. Journal of visualized experiments : JoVE
122. Nielsen, K., Mogensen, H.S., Hedman, J., Niederstätter, H., Parson, W., Morling, N.: Comparison of five DNA quantification methods. Forensic Science International: Genetics (2008). doi: 10.1016/j.fsigen.2008.02.008
123. Zeugin, J.A., Hartley, J.L.: Ethanol precipitation of DNA. focus **7**(4)

124. Tweedie, J.W., Stowell, K.M.: Quantification of DNA by agarose gel electrophoresis and analysis of the topoisomers of plasmid and M13 DNA following treatment with a restriction endonuclease or DNA topoisomerase I. Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (2005). doi: 10.1002/bmb.2005.494033010410
125. Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., Préat, V.: Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society (2009). doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.086
126. Fonseca, A.C., Simoes, S., Gaspar, R.: Paclitaxel-loaded PGLA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vito anti-tumoral activity. Journal of Controlled Release **83**, 273–286 (2002)
127. Patel, P.A., Patravale, V.B.: AmbiOnp: Solid Lipid Nanoparticles of Amphotericin B for Oral Administration. j biomed nanotechnol (2011). doi: 10.1166/jbn.2011.1332
128. Kashanian, S., Azandaryani, A.H., Derakhshandeh, K.: New surface-modified solid lipid nanoparticles using N-glutaryl phosphatidylethanolamine as the outer shell. International Journal of Nanomedicine (2011). doi: 10.2147/IJN.S20849
129. Nandhakumar, S., Dhanaraju, M.D., Sundar, V.D., Heera, B.: Influence of surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of paclitaxel loaded poly(ε-caprolactone) nanoparticles. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University (2017). doi: 10.1016/j.bfopcu.2017.06.003
130. Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F.X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., Farokhzad, O.C.: Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. Biomaterials (2007). doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.047
131. Yang, A., Liu, Z., Yan, B., Zhou, M., Xiong, X.: Preparation of camptothecin-loaded targeting nanoparticles and their antitumor effects on hepatocellular carcinoma cell line H22. Drug delivery (2016). doi: 10.3109/10717544.2014.950767
132. Liebmann, J.E., Cook, J.A., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J., Mitchell, J.B.: Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines. Br J Cancer (1993). doi: 10.1038/bjc.1993.488
133. Abouelmagd, S.A., Sun, B., Chang, A.C., Ku, Y.J., Yeo, Y.: Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles. Are we doing it right? Molecular pharmaceutics (2015). doi: 10.1021/mp500817h

134. Jain, R.K.: Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 149–168
135. Ulusoy, M., Walter, J.-G., Lavrentieva, A., Kretschmer, I., Sandiford, L., Le Marois, A., Bongartz, R., Aliuos, P., Suhling, K., Stahl, F., Green, M., Scheper, T.: One-pot aqueous synthesis of highly strained CdTe/CdS/ZnS nanocrystals and their interactions with cells. RSC Adv (2015). doi: 10.1039/c4ra13386b
136. Sarstedt AG Co.: Zell- und Gewebekultur- Zellkultivierung, Krykonservierung, Filtration, Liquid Handling
137. Kankia, B., Marky, L.: Folding of the thrombin aptamer into a G-Quadruplex with Sr(2+): stability, heat and hydration. J Am Chem Soc, 2001, 10799–10804
138. Chang, T., Qi, C., Meng, J., Zhang, N., Bing, T., Yang, X., Cao, Z., Shangguan, D.: General Cell-Binding Activity of Intramolecular G-Quadruplexes with Parallel Structure. Plos One, 2013
139. Modrejewski, J., Walter, J.-G., Kretschmer, I., Kemal, E., Green, M., Belhadj, H., Blume, C., Scheper, T.: Aptamer-modified polymer nanoparticles for targeted drug delivery. BioNanoMaterials (2016). doi: 10.1515/bnm-2015-0027
140. Walter, J.G., Petersen, S., Stahl, F., Scheper, T., Barcikowski, S.: Laser ablation-based one-step generation and bio-functionalization of gold nanoparticles conjugated with aptamers. Journal of nanobiotechnology (2010). doi: 10.1186/1477-3155-8-21
141. mp10361
142. Di Fiore, P.P., Zastrow, M. von: Endocytosis, signaling, and beyond. Cold Spring Harbor perspectives in biology (2014). doi: 10.1101/cshperspect.a016865
143. Ungricht, R., Kutay, U.: Establishment of NE asymmetry—targeting of membrane proteins to the inner nuclear membrane. Current opinion in cell biology (2015). doi: 10.1016/j.ceb.2015.04.005
144. Engelberg, S., Modrejewski, J., Walter, J.G., Livney, Y.D., Assaraf, Y.G.: Cancer cell-selective, clathrin-mediated endcytosis of aptamer-decorated nanoparticles. Oncotarget, 2018
145. Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V.: Endocytosis of nanomedicines. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2010, 182–195
146. Pietroiusti, A.: Health implications of engineered nanomaterials. Nanoscale (2012). doi: 10.1039/c2nr11688j
147. Moore, T.L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., Petri-Fink, A.: Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. Chemical Society reviews (2015). doi: 10.1039/c4cs00487f

148. Bhise, N.S., Ribas, J., Manoharan, V., Zhang, Y.S., Polini, A., Massa, S., Dokmeci, M.R., Khademhosseini, A.: Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2014, 82–93
149. Crolly, G.: Dynamische Lichtstreuung (DLS). https://www.fritsch.de/partikelmessung/fritsch-wissen/dynamische-lichtstreuung-dls/
150. Malvern Panalytical. https://www.malvernpanalytical.com/de/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis
151. Kirby, B.J., Hasselbrink, E.F.: Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. Electrophoresis, 2004, 187–202
152. Schweizer, D.: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma **58**(4), 307–324 (1976)
153. Arnulf: Grundlagen der Durchflusszytometrie

Abkürzungsverzeichnis

A549	Humane Lungenkrebszelllinie
BEAS2B	Humane Lungenepithelzelllinie
BSA	Bovines Serum Albumin
CPT	Camtpothecin
CTB	CellTiter-Blue®
DAD	Diodenarraydetektor
DAPI	4´,6 – Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
ddH_2O	Deionisiertes Wasser
DDS	*Drug Delivery System*
DLS	Dynamische Lichstreuung (*engl.: dynamic light scattering*)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäre (*engl.: desoxyribonucleic acid*)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	*Enhanced permeability and retention*
FDA	*Food and Drug Administration*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HeLa	Humane Eierstockkrebszelllinie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdyhydrogenphosphat
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
Min	Minute
mL	Milliliter

mM	Millimolar
mPEG	Methoxy-Poly(ethylenglykol)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
MWCO	Molekulargewichtsgrenze (*engl.: molecular weight cutoff value*)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
NP	Nanopartikel
NTA	Nanotracking Analyse
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (*engl.: phosphate buffered saline*)
PCL	Polycaprolacton
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PLA	Polymilchsäure (*engl.: Polylactic acid*)
PI	Propidiumiodid
PTX	Paclitaxel
PSMA	Prostata-spezifisches Membran Antigen
P/S	Penicillin/ Streptomycin
QD	Quantenpunkt (*engl.: Quantum Dot)*
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure (*engl.: ribonucleic acid)*
rpm	Umdrehungen pro Minute (*engl.: rounds per minute*)
SBB	Natriumboratpuffer (*engl.: sodium borate buffer*)
SDS	Natriumdodecylsulfat (*engl.: sodium dodecyl sulfate*)
sec	Sekunden
SELEX	*Systemativ Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TDDS	*Targeted Drug Delivery System*
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
üN	Über Nacht
µL	Mikroliter
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkstoffkonzentration im Körper bei verschiedenen Darreichungsformen nach [10]. 12

Abbildung 2: Passives Targeting: Nanopartikel werden über die Lücken im Endothelgewebe der Tumorzellen aufgenommen (EPR Effekt). Aktives Targeting: Spezifische Liganden sorgen für eine Bindung an entsprechende Rezeptoren und je nach adressiertem Rezeptor für die Aufnahme in die Zelle nach [38]. 16

Abbildung 3: Bindung eines Liganden über einen Linker direkt an den Wirkstoff. 17

Abbildung 4: Bindung des Liganden an einen Wirkstoffträger, auf dessen Oberfläche der Wirkstoff über einen Linker immobilisiert ist. 17

Abbildung 5: Wirkstoff wird im Träger eingekapselt; Ligand ist direkt an Wirkstoffträger gebunden. 18

Abbildung 6: Zitierungen (Scopus) über Polymer-Nanopartikel im Zeitraum von 1997-2017. 19

Abbildung 7: links: Paclitaxel (PTX) [69]; Camptothtecin (CPT) [70]. 23

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aptamer-Target-Bindung, modifiziert nach [72]. 24

Abbildung 9: Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses zur Generierung von Aptameren, modifiziert nach [72]. 25

Abbildung 10: Mechanismus der Funktionalisierung der Nanopartikel mit dem Aptamer. Diese Abbildung stammt aus der Masterarbeit von Torsten Schüling. 27

Abbildung 11: Schema der verschiedenen Endozytosewege nach [86]. 28

Abbildung 12: Bildung eines Vesikels bei der Endozytose. 29

Abbildung 13: Schematische Darstellung der Partikelassemblierung und deren Funktionalisierung mit dem Aptamer. 32

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Ringöffnungscopolymerisation des ε-Caprolactons. 33

Abbildung 15: Synthese von mPEG-PCL (oben) aus ε -Caprolacton und mPEG; Synthese von HOOC-PEG-PCL aus ε -Caprolacton und HOOC-PEG-OH. 33

Abbildung 16: FTIR Spektrum der Polymere HOOC-PEG-PCL und mPEG-PCL. 34

Abbildung 17: ^{1}H NMR von HOOC-PEG-PCL. 35

Abbildung 18: ^{1}H NMR von mPEG-PCL. 36

Abbildung 19: Solvent Evaporation Methode nach [95]. 37

Abbildung 20: Ergebnis der dynamischen Lichtstreuungsmessung der Nanopartikel. Aus mPEG-PCL und HOOC-PEG-PCL. 38

Abbildung 21: Ergebnisse der DLS Messung von Partikellösungen, die bei unterschiedlich langer Ultraschalldauer homogenisiert wurden. 40
Abbildung 22: Ergebnisse der DLS Messung verschiedener Partikellösungen bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten und -zeiten. 41
Abbildung 23: Ergebnisse der Partikelsuspensionen, nachdem Rührdauer und -geschwindigkeit variiert wurden. 43
Abbildung 24: Ergebnisse des Optimierungsschritts mittels Zentrifugation. 44
Abbildung 25: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuungsmessung mit Partikeln, bei denen die Menge eines Polymers variiert wurde. 45
Abbildung 26: Schematische Darstellung der NTA Messung nach [105]. 46
Abbildung 27: TEM Analyse der Nanopartikel. 48
Abbildung 28: NTA Aufnahme der Partikel. 49
Abbildung 29: Zetapotential der Nanopartikel (NPs). 49
Abbildung 30: Ergebnisse der DLS Messung der Nanopartikel direkt nach der Herstellung und nach vier Wochen Lagerung bei 4 °C in Wasser. 51
Abbildung 31: Mechanismus der Funktionalisierung der Partikel mit dem Aptamer sowie der randomisierten Sequenz. Die Abbildung stammt aus der Masterarbeit von Torsten Schüling. 52
Abbildung 32: Mit S15 immobilisierte mPEG-PCL Nanopartikel. Links: S15; Rechts: S15-NP-Konjugat (mPEG-PCL Nanopartikel). 53
Abbildung 33: Hydrodynamischer Durchmesser von gekoppelten und ungekoppelten mPEG-PCL Partikeln. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung in Dreifachbestimmung. 53
Abbildung 34: Zeta-Potential der Nanopartikel und der funktionalisierten Nanopartikel. 54
Abbildung 35: Gekoppelte QDs. Links: QDS15; Rechts: QDs. 55
Abbildung 36: Optische Dichte (260 nm) der Aptamerlösungen vor und nach dem Aufkonzentrieren mittels Zentrifugation. 57
Abbildung 37: Absorptionsspektren einer Kopplung der NP mit dem Aptamer (gepunktete Linie); dem reinen Aptamer (gestrichelte Linie) und einem Kopplungsansatz ohne Nanopartikel (durchgezogene Linie). 58
Abbildung 38: Absorptionsspektren der Durchläufe der beiden Kopplungen zwischen Nanopartikeln und Aptamer (durchgezogene und gestrichelte Linie) und der Kontrolle ohne NPs (gepunktete Linie). 59

Abbildung 39: Kalibration des S15 Aptamers im Konzentrationsbereich von 10 µM bis 0,625 µM sowie den gekoppelten Nanopartikeln. 1: 10 µM, 2: 5 µM, 3: 2,5 µM, 4: 1,25 µM, 5: 0,625 µM, 6: S15 im Durchlauf. 60

Abbildung 40: Kalibrationsgerade des S15 Aptamers im Bereich 0.625 µM bis 10 µM 61

Abbildung 41: Ergebnisse der DLS Messung von PEG-PCL Partikeln mit eingekapseltem Wirkstoff (rechts) und ohne eingekapselten Wirkstoff (links). 64

Abbildung 42: Viabilität der A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an freiem CPT 65

Abbildung 43: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Stabilität (und später der Wirkstofffreisetzung) der Nanopartikel 66

Abbildung 44: Stabilitätstest des in den Nanopartikeln verkapselten Wirkstoffes CPT bei unterschiedlichen Temperaturen. 67

Abbildung 45: Zetapotenzial der PEG-PCL Nanopartikel mit eingekapseltem PTX (NPPTX) und eingekapseltem CPT (NPCPT) 68

Abbildung 46: Kalibrationsgeraden von CPT in PBS (DMSO) bei den pH-Werten 5,2; 6,8; 7,4 und 8. 71

Abbildung 47: Freisetzung des Wirkstoffes bei verschiedenen pH-Werten (mit Zusatz von DMSO). 73

Abbildung 48: Links: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL Nanopartikeln ohne Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer Rechts: HeLa Zellen inkubiert mit PEG-PCL Nanopartikeln, ebenfalls ohne eingekapselten Wirkstoff und ohne immobilisiertes Aptamer 75

Abbildung 49: Links: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL Nanopartikeln mit eingekapseltem PTX und immobilisiertem S15 Aptamer (NPPTXS15); rechts: HeLa inkubiert mit NPPTXS15. 75

Abbildung 50: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten der A549 Zellen, die auf verschiedenen Oberflächen kultiviert und mit unterschiedlichen Ablösemethoden abgelöst wurden. Die Charakterisierung erfolgte mittels Durchflusszytometer. ZP: für die Zellkultur von adhärenten Zellen optimierte Polystyrol-Oberfläche; AP: nicht optimierte Polystyrol-Oberfläche. 77

Abbildung 51: Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzverteilungen der A549 Zellen, die mit Trypsin bzw. dem Zellschaber abgelöst wurden. Sie wurden anschließend mit FITC markiertem S15 inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit nicht mit FITC markiertem S15 inkubiert wurden. 78

Abbildung 52: Charakterisierung der Bindung des S15 Aptamers an die A549 Zellen und die Negativkontrollzelllinie HeLa. Die Charakterisierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse stammen aus der Masterarbeit von Sandra Kuhlmeier. 79

Abbildung 53: Guanin-Quadruplex [137] 79

Abbildung 54: Bindung der mit S15 und Rnd modifizierten QDs an A549 und HeLa Zellen. A) A549 mit QDS15 inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung (blaue Zellkerne); B) A549 mit QDRnd inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung; C) HeLa Zellen mit QDS15 inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung; D) HeLa Zellen mit QDRnd inkubiert, mit anschließender DAPI Färbung 81

Abbildung 55: Bindungskurven für das S15 Aptamer an die Zielzelllinie A549 und die Kontrollzelllinie HeLa. 83

Abbildung 56: A549 Zellen inkubiert mit QDS15 (links) und anschließender Hoechst-Färbung (blau gefärbte Zellkerne); Rechts: A549 Zellen mit QDRnd inkubiert und anschließender Hoechst Färbung 84

Abbildung 57: links: HeLa Zellen inkubiert mit QDRnd und anschließender Hoechst-Färbung (blau gefärbet Zellen); rechts: HeLa Zellen inkubiert mit QDS15 und anschließender Hoechst-Färbung 84

Abbildung 58: BEAS2B Zellen, inkubiert mit S15 gekoppelten QDs. Diese Experimtente wurden von Frau Engelberg am Technion durchgeführt. Hier fand keine Zellkernfärbung statt. 85

Abbildung 59: A) A549 Zellen inkubiert mit QDS15, wobei die Dichte des Aptamers reduziert wurde. Dasselbe gilt für B) BEAS2B Zellen und C) HeLa Zellen. Auch diese Experimente wurden am Technion durchgeführt 86

Abbildung 60: Fluoreszenzemissionsspektrum des pHrodo™ Green Farbstoffs [141]. 87

Abbildung 61: A549 (links) und HeLa Zellen (rechts) nach Inkubation mit pHrodo™ Green Dextran. 87

Abbildung 62: A549 Zellen zuerst inkubiert mit A) QDS15; anschließend mit B) pHrodo™ Green Dextran; und abschließend mit C) Hoechst®33342. In D) sind alle Bilder (Farbfilter) vereinigt 88

Abbildung 63: A549 Zellen wurden mit QDS15 für 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Die Charakterisierung fand mittels Konfokalmikroskopie statt. 89

Abbildung 64: Quantifizierung der Zellen, die die QDS15 Konjugate aufgenommen haben [144]..... 90
Abbildung 65: A549 Zellen behandelt mit A) Cytochalasin D, B) Amilorid, C) Filipin, D) Dynasor und E) nur mit Medium. Anschließend wurden die QDS15 Konjugate hinzugegeben. 91
Abbildung 66: A549 Zellen mit Pitstop 2 behandelt und anschließend mit QDS15 inkubiert. 91
Abbildung 67: A549 Zellen nach Inkubation mit CellMask™ Green Membrane Stain (links) und pHrodo™ Green Dextran (rechts). 92
Abbildung 68: A: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL-S15(PTX); B: HeLa Zellen inkubiert mit PEG-PCL-S15(PTX); C: A549 Zellen inkubiert mit PEG-PCL Partikeln; D: HeLa Zellen inkubiert mit PEG-PCL Partikeln. Anschließend wurden die Zellen mit Calcein-AM und Propidiumiodid gefärbt. 93
Abbildung 69: Viabilität der A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit modifizierten und wirkstoffbeladenen Nanopartikeln (CPTS15). Als Kontrolle dienen Polymer-Nanopartikel ohne Wirkstoff und immobilisierten Aptameren (NP), Poly-mer-Nanopartikel mit immbolisierten Aptameren (NPS15) und serumfreies Zellkulturmedium. 94
Abbildung 70: Morphologie der A549 Zellen 100
Abbildung 71: Morphologie der HeLa Zellen. 101
Abbildung 72: Morphologie der BEAS2B Zellen. 101
Abbildung 73: Strukturformel des HOOC-PEG-PCL Polymers. 108
Abbildung 74: Strukturformel des mPEG-PCL Polymers. 108
Abbildung 75: Schematische Darstellung des DLS Messprinzips nach [149] 113
Abbildung 76: Küvette für die dynamische Lichtstreuungsmessung und zur Bestimmung des Zetapotentials 113
Abbildung 77: Schematische Darstellung der NTA Messung nach [150]. 114
Abbildung 78: Aufbau des Versuchs zur Stabilität der Nanopartikel. 1 mL der Nanopartikellösung wird gegen 10 mL deioniertes Wasser dialysiert (Cutoff: 3.5 kDa). 115
Abbildung 79: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 5,2 116
Abbildung 80: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 6,8 116
Abbildung 81: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 7,4 116
Abbildung 82: Kalibrationsgerade von CPT in PBS (TWEEN) bei pH 8. 117
Abbildung 83: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers [153]. 124

Abbildung 84: Beispielhafte Darstellung der definierten Gates für lebende (P1) und tote Zellen (P2). 124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Drug Delivery Systeme in der klinischen Entwicklung..... 31

Tabelle 2: Zuordnung der Peaks des ^{1}H NMR Spektrums von HOOC-PEG-PCL (vgl. Abbildung 17). 35

Tabelle 3: Zuordnung der Peaks des ^{1}H NMR Spektrums von mPEG-PCL (vgl. Abbildung 18)... 36

Tabelle 4: PDI bei verschiedenen Rührzeiten und -geschwindigkeiten. 42

Tabelle 5: Menge des immobilisierten Aptamers in den Kopplungsansätzen. 62

Tabelle 6: Einstellung der HPLC Methode zur Detektion von PTX..... 109

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Modrejewski geb. Löffler
Geburtsdatum/ -ort	13. Dezember 1989 in Tübingen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Berufliche Praxis

Seit 02/2018	Produktmanagerin bei der PlantTec Medical GmbH
11/2013-12/2014	Studentische Hilfskraft an der „Zentralen Einrichtung für Weiterbildung (ZEW)" der Leibniz Universität Hannover
2011-2013	Inventurhilfe beim Inventurservice Lauer

Akademische und schulische Ausbildung

01/2015 – heute	Promotionsstudium (Stipendium) Chemie und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover „Entwicklung eines aptamermodifizierten Polymer-Nanopartikelsystems zur zielgerichteten Freisetzung von Wirkstoffen"
10/2012 – 09/2014	Masterstudiengang Life Science an der Leibniz Universität Hannover
10/2010 – 07/2015	Parallelstudium der Psychologie an der FernUniversität in Hagen
10/2009 – 10/2012	Bachelorstudiengang Life Science an der Leibniz Universität Hannover
2000 – 2009	Elsa-Brändström-Gymnasium Elmshorn und Ludwig-Meyn-Gymnasium Uetersen

Auslandserfahrungen

10/2016 – 11/2016	Stipendium der DTG (Deutschen Technion Gesellschaft) für einen Forschungsaufenthalt am Technion in Haifa, Israel
02/2013 – 03/2013	Stipendium der DTG (Deutschen Technion Gesellschaft) für einen Forschungsaufenthalt an der Hebräischen Universität in Jerusalem

Publikationsliste

1. **Julia Modrejewski**, Johanna-Gabriela Walter*, Imme Kretschmer, Evren Kemal, Mark Green, Hamza Belhadj, Cornelia Blume und Thomas Scheper, *'Aptamer-modified polymer nanoparticles for targeted drug delivery'*, BioNanoMaterials (2016).

(Julia Modrejewski: 95 %)

2. **Julia Modrejewski**, **Katharina Urmann**, Thomas Scheper und Johanna-Gabriela Walter, *'Aptamer-modified nanomaterials: principles and applications'*; BioNanoMaterials (2017).

(Julia Modrejewski: 40 %)

3. Shira Engelberg**, Julia Modrejewski,** Johanna G. Walter, Yoav D. Livney, and Yehuda G. Assaraf, '*Cancer cell-selective clathrin-mediated endocytosis of aptamer-decorated nanoparticles*', Oncotarget (2018).

(Julia Modrejewski: 30 %)

4. Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel; Poster: **Julia Modrejewski**, Elsa Friehs, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl und Thomas Scheper: *"Aptamer-functionalized nanoparticles for targeted drug delivery"*

(Julia Modrejewski: 80 %)

5. Springmeeting (Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel); Poster: Shira Engelberg, **Julia Modrejewski**, Yehuda G. Assaraf, Yoav D. Livney und Johanna – Gabriela Walter: *"Novel Targeted Anticancer Drug Delivery System Based on Aptamer-Decorated Polymeric Nanovehicles"*

(Julia Modrejewski: 30 %)

6. Infotag Aptamere (Dechema Tagung, 2017); Poster: **Julia Modrejewski**, Shira Engelberg, Yehuda G. Assaraf, Yoav D. Livney und Johanna – Gabriela Walter: *"Aptamer-modified polycaprolactone nanoparticles for targeted drug delivery"*

(Julia Modrejewski: 100 %)

7. European Society for Animal Cell Technology (ESACT Meeting, Lausanne 2017); Poster: **Julia Modrejewski**, Shira Engelberg, Yehuda G. Assaraf, Yoav D. Livney, Johanna – Gabriela Walter, Thomas Scheper: *"Aptamer-modifizierte Polycaprolacton Nanopartikel für das Targeted Drug Delivery"*

(Julia Modrejewski: 95 %)

8. Baltic Conference Series (Stockholm, 2017); Poster: **Julia Modrejewski**, Shira Engelberg, Yehuda G. Assaraf, Yoav D. Livney und Johanna – Gabriela Walter: *"Aptamer-Nanoparticle based Targeted Drug Delivery System"*

((Julia Modrejewski: 85 %)