

Entwicklung Albumin-basierter, nanopartikulärer Arzneistoffträgersysteme für die Photodynamische Therapie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main
von
Matthias Wacker
aus Hanau am Main

Frankfurt am Main, 2010

**vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität als Dissertation
angenommen.**

Dekan : Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter : Prof. Dr. Klaus Langer

2. Gutachter : Prof. Dr. Jörg Kreuter

Datum der Disputation :

*„Im schönsten Licht wird unsre Größe glänzen,
Wenn Großes wir aus Kleinem, Nützlich
Aus Schädlichem und Heil aus Unheil schaffen.“*

John Milton, Das verlorene Paradies

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe-Universität Frankfurt unter der Anleitung von Herrn Prof. Klaus Langer angefertigt.

Meinem Doktorvater danke ich für die Einführung in dieses spannende Thema, für seine Hilfe und für die zahlreichen Gespräche, Ideen und Anregungen, die meiner Arbeit, ebenso wie meiner menschlichen Entwicklung oftmals die Richtung wiesen. Gleichfalls danke ich Frau Prof. Dressman und Herrn Prof. Kreuter für die Unterstützung, die sie mir angedeihen ließen und für die vielen neuen Erfahrungen, die sie mir in meiner Arbeit am Institut ermöglicht haben.

Mein Dank gilt auch den anderen Mitarbeitern des Institutes. Ich habe viel von Euch gelernt und manche Idee ist in Eurer Gesellschaft gereift!

Ich danke meinen Projektpartnern des BMBF-Projektes Nanocancer: Frau Prof. Beate Röder, Herr Kuan Chen und Frau Annegret Preuss von der Humboldt-Universität Berlin für die aufwendigen photophysikalischen Messungen. Frau Karin Löw und Prof. Dr. Hagen von Briesen vom Fraunhofer-Institut in St. Ingbert für die Arbeiten in der Zellkultur. Herrn Dr. Arno Wiehe und Frau Dr. Susanna Gräfe von der Biolitec AG in Jena danke ich für die Synthese und Bereitstellung von Photosensibilisatoren sowie die Untersuchung meiner Entwicklungszubereitungen, Herrn Philip Gribbon und Frau Françoise Halley von der European Screeningport GmbH für die Aufnahmen am Opera Fluoreszenzmikroskop. Danke für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit innerhalb des Projektes.

Auch Herrn Dr. Vitali Vogel vom Institut für Biophysik und Herrn Dr. Bernd Sorg vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt möchte ich danken, für Ideen und fachlichen Rat, wann immer ich ihn brauchte.

Mein Dank gilt auch meinen guten Freunden – jeder weiß, ob er sich dazu zählen darf. Danke, dass ihr mir beigestanden habt und mich seit vielen Jahren begleitet.

Weiterhin danke ich meinen Eltern Gertraud und Klaus Wacker sowie meinem Bruder Richard Wacker für das Ertragen meiner Launen, die jahrelange,

bedingungslose Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir stets gaben.
Eine bessere Familie kann sich niemand wünschen!

Zuletzt danke ich noch meiner Kollegin, Lektorin und Freundin Anja Zensi, für
ihre Kraft und die Stärke, die ich ohne sie niemals besessen hätte.

Frankfurt am Main, der 11.07.2010

1. Einführung	10
1.1. Ziele der Arbeit	10
1.2. Nanopartikuläre Trägersysteme	12
1.2.1. Allgemeine Prinzipien.....	12
1.2.2. Humanes Serumalbumin.....	13
1.2.3. Adsorptive und kovalente Arzneistoffbindung	15
1.2.4. Inkorporierung lipophiler Arzneistoffe in HSA-Nanopartikel	17
1.2.5. Abraxane®	18
1.2.6. Methoden zur Fällung von Proteinen	19
1.2.7. Aktives und passives „Drug Targeting“	21
1.3. Photodynamische Therapie (PDT)	24
1.3.1. Therapieprinzipien.....	24
1.3.2. Photosensibilisatoren in der Tumorthherapie.....	25
1.3.3. Foscan®	26
1.4. Cetuximab	28
1.4.1. Der EGF-Rezeptor	28
1.4.2. Mechanismus von Cetuximab	29
1.4.3. Therapie mit Cetuximab	29
1.4.4. Aktives Targeting mit Cetuximab.....	30
1.5. Testmodelle für die in-vitro-Charakterisierung	31
1.5.1. Photophysikalische Charakterisierung	31
1.5.2. Zellkulturmodelle.....	31
2. Materialien und Methoden	32
2.1. Chemikalien	32
2.2. Pufferrezepturen	34
2.3. Fließmittel	34
2.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien	34
2.5. Zelllinien	37
2.6. Physikochemische Charakterisierung von Photosensibilisatoren	38
2.6.1. Löslichkeitsuntersuchungen in ethanolischer Lösung	38
2.6.2. Löslichkeitsuntersuchungen in HSA-stabilisierter Lösung.....	38
2.6.3. Stabilität gegenüber Glutaraldehyd	39
2.6.4. HPLC-Bestimmung von Photosensibilisatoren.....	39
2.7. Adsorptive Bindung von Photosensibilisatoren	40
2.7.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln.....	40
2.7.2. Aufreinigung und Charakterisierung hergestellter Nanopartikel	41
2.7.3. Voruntersuchungen zur adsorptiven Bindung	41
2.7.4. Albumin-vermittelte, adsorptive Bindung an HSA-Nanopartikel	42

2.7.5. Direktbestimmung von Photosensibilisatoren	43
2.7.6. Zetapotentialmessung an beladenen HSA-Nanopartikeln.....	43
2.7.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	43
2.7.8. Untersuchung der Proteinadsorption.....	45
2.7.9. pH-Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion.....	45
2.7.10. Zeitabhängigkeit der Adsorptionsreaktion	45
2.7.11. Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion vom Quervernetzungsgrad	46
2.7.12. Desorption nach adsorptiver Bindung	46
2.7.13. Gefriertrocknung adsorptiv beladener Nanopartikel.....	47
2.8. Inkorporierung durch ethanolische Desolvatation	49
2.8.1. Desolvatation bei verschiedenen Ethanol-Volumina	49
2.8.2. pH-Abhängigkeit der Inkorporierung	49
2.8.3. Desolvatation in Gegenwart von Cyclodextrinen.....	50
2.8.4. Inkorporierung in Gegenwart von Cyclodextrinen	50
2.8.5. Komplexierung von mTHPC.....	51
2.8.6. Desolvatation in Gegenwart von mTHPC-Cyclodextrin-Komplexen.....	51
2.9. PEG-HSA-Desolvatationsverfahren.....	53
2.9.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln.....	53
2.9.2. Aufreinigung und Charakterisierung hergestellter Nanopartikel	53
2.9.3. Abhängigkeit vom PEG-Volumen.....	53
2.9.4. pH-Abhängigkeit der PEG-HSA-Desolvatation	54
2.9.5. Nachweis von PEG-Rückständen im Waschüberstand.....	54
2.9.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	55
2.9.7. Inkorporierung mittels PEG-HSA-Desolvatation.....	55
2.10. Kovalente Bindung von Photosensibilisatoren	56
2.10.1. Herstellung von Photosensibilisator-HSA-Konjugaten	56
2.10.2. Voruntersuchungen zur kovalenten Bindung	56
2.10.3. Kovalente Bindung von mTHPP-COOH an HSA-Nanopartikel	57
2.10.4. Kovalente Bindung von mTHPC an HSA-Nanopartikel	58
2.10.5. Zeitabhängigkeit der kovalenten Bindung	58
2.10.6. Direktbestimmung von Photosensibilisatoren	58
2.10.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	59
2.10.8. Gefriertrocknung kovalent modifizierter HSA-Nanopartikel	59
2.11. Cetuximab-modifizierte HSA-Nanopartikel	61
2.11.1. Herstellung Antikörper-beladener Partikel.....	61
2.11.2. Charakterisierung Antikörper-beladener Partikel	62
2.11.3. Herstellung Antikörper-beladener Arzneistoffträgersysteme	62
2.11.4. Charakterisierung Antikörper-beladener Arzneistoffträgersysteme	62
2.11.5. „Labeling“ von mTHPC-HSA-Nanopartikeln mit 5-TAMRA	63
2.12. In vitro-Charakterisierung	64
2.12.1. Zubereitungen für die <i>in vitro</i> -Untersuchung	64
2.12.2. Photophysikalische Charakterisierung	64
2.12.3. Singulett-Sauerstoffmessung in Jurkat-Zellen	65
3. Ergebnisse und Diskussion.....	66
3.1. Physikochemische Charakterisierung von Photosensibilisatoren	68

3.1.1. Löslichkeitsuntersuchung in Ethanol	68
3.1.2. Löslichkeitsuntersuchung in HSA-stabilisierter Lösung	69
3.1.3. Stabilität gegenüber Glutaraldehyd	70
3.2. Adsorptive Bindung von Photosensibilisatoren	73
3.2.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln.....	73
3.2.2. Voruntersuchungen zur adsorptiven Bindung	75
3.2.3. Albumin-vermittelte, adsorptive Bindung an HSA-Nanopartikel	77
3.2.4. Zetapotentialmessung an beladenen HSA-Nanopartikeln.....	80
3.2.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	81
3.2.6. Untersuchung der Proteinadsorption.....	82
3.2.7. pH-Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion.....	84
3.2.8. Zeitabhängigkeit der Adsorptionsreaktion	86
3.2.9. Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion vom Quervernetzungsgrad	87
3.2.10. Desorption nach adsorptiver Bindung	87
3.2.11. Gefriertrocknung adsorptiv beladener HSA-Nanopartikel	90
3.3. Inkorporierung von Photosensibilisatoren.....	92
3.3.1. Desolvatation bei verschiedenen Ethanolvolumina	92
3.3.2. pH-Abhängigkeit der Inkorporierung	93
3.3.3. Desolvatation in Gegenwart von Cyclodextrinen.....	95
3.3.4. Inkorporierung in Gegenwart von Cyclodextrinen	96
3.3.5. Komplexierung von mTHPC.....	97
3.3.6. Desolvatation in Gegenwart von mTHPC-Cyclodextrin-Komplexen.....	99
3.4. PEG-HSA-Desolvatation.....	101
3.4.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln.....	102
3.4.2. pH-Abhängigkeit der PEG-HSA-Desolvatation	102
3.4.3. Abhängigkeit der PEG-HSA-Desolvatation vom PEG-Volumen.....	103
3.4.4. Nachweis von PEG-Rückständen im Waschüberstand.....	104
3.4.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	106
3.4.6. Inkorporierung mittels PEG-HSA-Desolvatation.....	106
3.5. Kovalente Bindung von Photosensibilisatoren an HSA-Nanopartikel..	108
3.5.1. Voruntersuchungen zur kovalenten Bindung von mTHPP-COOH	109
3.5.2. Voruntersuchungen zur kovalenten Bindung von mTHPC	113
3.5.3. Kovalente Bindung an HSA-Nanopartikel	115
3.5.4. Zeitabhängigkeit der kovalenten Modifikation	118
3.5.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	120
3.5.6. Gefriertrocknung kovalent modifizierter HSA-Nanopartikel.....	120
3.6. Cetuximab-modifizierte HSA-Nanopartikel.....	122
3.6.1. Charakterisierung des thiolierten Antikörpers	122
3.6.2. Herstellung von Cetuximab-beladenen HSA-Nanopartikeln.....	124
3.6.3. „Labeling“ von mTHPC-HSA-Nanopartikeln mit 5-TAMRA	126
3.7. In vitro-Charakterisierung	128
3.7.1. Adsorptiv beladene Trägersysteme.....	128
3.7.2. Photophysikalische Charakterisierung	129
3.7.3. Singulett-Sauerstoff-Messungen	133
3.7.4. Arzneistofffreisetzung und intrazelluläre Verteilung	135
3.7.5. Trägersysteme mit EGFR-„Targeting“.....	138

3.7.6. Antikörper-vermittelte Endozytose	138
4. Zusammenfassung	141
5. Ausblick	150
6. Anhang.....	151
6.1. Abkürzungsverzeichnis.....	151
6.2. Literaturverzeichnis.....	153
6.3. Abbildungsverzeichnis.....	161
6.4. Tabellenverzeichnis.....	162
6.5. Lebenslauf.....	164
6.6. Veröffentlichungen und Patente.....	165

1. Einführung

1.1. Ziele der Arbeit

Tumore sind die zweithäufigste Todesursache in den USA mit geschätzten 1,4 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2007 [1]. In Deutschland wird die Prävalenz von Krebserkrankungen für 2010 auf bis zu 2,8% der Gesamtbevölkerung geschätzt [2], und allein an Darmkrebs starben 2006 über 27.000 Patienten [3].

Eine verbesserte medizinische Versorgung und nicht zuletzt neue Arzneimittel haben jedoch dazu beigetragen, dass sich die 5-Jahres-Überlebensrate seit den 80er Jahren kontinuierlich steigerte.

Foscan[®] ist ein in Europa zugelassenes Arzneimittel, welches in der Photodynamischen Therapie (PDT) von Tumorerkrankungen Anwendung findet. Kernstück dieser Behandlung ist ein lichtsensitives Molekül, der Photosensibilisator, welcher sich im erkrankten Gewebe anreichert und dann nach Bestrahlung mit Licht zu dessen Abtötung führen soll.

Wie viele moderne Arzneistoffe, so ist auch der enthaltene Wirkstoff Temoporfin (Tetrakis-hydroxyphenylchlorin, mTHPC) durch nur ungenügende physikochemische Eigenschaften hinsichtlich einer parenteralen Applikation gekennzeichnet.

Da das lipophile Chlorin in Wasser nur geringe Löslichkeit besitzt, wurde in Foscan[®] ein Gemisch aus Ethanol und Propylenglykol zur Herstellung der Injektionslösung verwendet.

Zusätzlich zu den typischen Nebenwirkungen der Photodynamischen Therapie kommt es daher bei der Anwendung des Arzneimittels zur Unterschreitung des Löslichkeitsprodukts von Temoporfin. Die Bildung von Präzipitaten und Schmerzen am Injektionsort sind die Folge [4], ebenso wie die Bildung von kristallinen Depots, welche sich entlang der Injektionsvene verteilen.

Trotz dieser gravierenden Nebenwirkung muss die Formulierungsentwicklung über eine reine Löslichkeitsverbesserung des Arzneistoffs hinausgehen, da

der Photosensibilisator keine Selektivität für das erkrankte Gewebe besitzt [5] und eine höhere Bioverfügbarkeit direkt nach der Injektion auch eine starke Erhöhung weiterer Nebenwirkungen, wie z.B. der auftretenden Lichtempfindlichkeit, zur Folge hätte.

Auch die Nanotechnologie kann u.a. durch die Entwicklung spezifischer Arzneistoffträgersysteme einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung von Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen leisten. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines kolloidalen Trägersystems für die Photodynamische Therapie, welches eine Reduktion unerwünschter Arzneimittelwirkungen bei maximaler antitumoraler Effizienz, etwa durch erhöhte Selektivität für das Zielgewebe, ermöglichen sollte.

1.2. Nanopartikuläre Trägersysteme

1.2.1. Allgemeine Prinzipien

Die Nanotechnologie hat in den vergangenen Jahren zur Entwicklung verschiedenster kolloidaler Arzneistoffträgersysteme geführt, darunter liposomale und mizellare Formulierungen sowie Nanopartikel aus Polymeren oder Polymer-Arzneistoff-Konjugaten [6]. Feste kolloidale Trägersysteme mit einer Größe zwischen 10 und 1000 nm werden dabei allgemein als Nanopartikel bezeichnet, wobei dieser Begriff eine Vielzahl von Zubereitungen unterschiedlichster morphologischer und physikochemischer Charakteristika vereint.

Nanopartikel der neusten Generation zeichnen sich insbesondere durch ihre erhöhte Stabilität *in vivo* und eine kontrollierbare Geometrie und Größenverteilung aus, was ihre Eignung als Arzneistoffträger unterstreicht [6].

Hierbei hat der Partikeldurchmesser, wie in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, einen deutlichen Einfluss auf die Körperverteilung dieser Kolloide [7], wodurch eine Erhöhung der Akkumulation im Zielgewebe erreicht werden kann [1, 8].

In der Therapie von Tumorerkrankungen werden die im Markt befindlichen nanopartikulären Träger wie Transdrug[®] (noch in der klinischen Testung) oder Abraxane[®] meist zur Minderung der durch Zytostatika verursachten Nebenwirkungen eingesetzt, welche durch mangelnde Selektivität und eine unkontrollierbare Diffusion des Zytostatikums in das gesunde Gewebe hervorgerufen werden (siehe auch 1.2.7).

Auch die Löslichkeit und Stabilität verschiedener Substanzen erfuhr infolge nanotechnologischer Verarbeitung eine deutliche Verbesserung [9]. Weiterhin erwiesen sich kolloidale Trägersysteme als nützliche Werkzeuge für den Transport makromolekularer empfindlicher Wirkstoffe, wie Peptide [10], Proteine [11] und Nukleotide [12].

Dabei kamen synthetische und natürliche Polymere in der Herstellung von Nanopartikeln zum Einsatz, darunter Polymilchsäure (PLA), Polymilch-co-glykolsäure (PLGA), Gelatine und humanes Serumalbumin (HSA) [13-18]. Insbesondere die Koazervation, die Emulsionspolymerisation, die „*Solvent evaporation*“, die Nanopräzipitation und die Desolvatation als Herstellungsmethoden für kolloidale Trägersysteme erlangten hierbei einige Bedeutung, wodurch verschiedenste Nanopartikelspezies generiert werden konnten.

Die ethanolische Desolvatation, als etabliertes Laborverfahren liefert hierbei sphärische Nanopartikel von hoher Stabilität [13, 19, 20], deren Form und Größe u.a. durch pH, Ionenstärke und Durchmischung der Lösung sowie das Desolvatationsreagenz und die eingesetzte HSA-Konzentration beeinflusst wird. Nanopartikel aus natürlichen Polymeren wie Gelatine oder humanem Serumalbumin sind enzymatisch abbaubar [14], während der Abbau synthetischer Polymere *in vivo* häufig auf einfachen physikochemischen Mechanismen, wie etwa der sauren Hydrolyse nach lysosomaler Anreicherung, beruht.

Auch hinsichtlich ihrer Toxikologie haben Nanopartikel in den letzten Jahren einige Fragen aufgeworfen, welche im Bezug auf ihre therapeutische Nutzung Beantwortung finden müssen. Akute Toxizität und Antigenität sind ebenso für die Verwendung des Materials relevant [21], wie eine Akkumulation und damit verbundene, langfristige negative Einflüsse auf den Organismus, wie sie bei schwer degradierbaren Materialien zu erwarten sind [22]. Für Nanopartikel aus humanem Serumalbumin wurden viele dieser Fragen mit der Zulassung des Arzneimittels Abraxane[®] geklärt, was es zu einem attraktiven Trägermaterial für die Entwicklung neuer Therapeutika werden lässt.

1.2.2. Humanes Serumalbumin

Albumin ist das meistvertretene humane Blutprotein mit einer Plasmakonzentration zwischen 35 und 50 g/L und einem Molekulargewicht von 65 kDa. Wie die meisten Proteine wird es in der Leber synthetisiert und

besitzt eine Lebensdauer von etwa 19 Tagen. Es besitzt hohe Stabilität im pH-Bereich zwischen 4 und 9 und ist auch bei Ethanolkonzentrationen von bis zu 40% löslich [23]. Sein isoelektrischer Punkt liegt nach Bindung von Fettsäuren bei pH 4,8 [24]. Es trägt im menschlichen Organismus zu 80% zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks bei, was es aufgrund seiner hohen Stabilität sowie der geringen Toxizität und Antigenität [25] zu einem interessanten pharmazeutischen Hilfsstoff werden lässt.

Da Polymorphismen im Hinblick auf das für HSA codierende Gen fast nicht vorkommen [26] kann von einer einheitlichen Primärstruktur ausgegangen werden, welche mittlerweile auch in rekombinanter Form als Recombumin® (Novozymes Biopharma, Cambridge, USA) für den Markt produziert wird und eine dem nativen HSA vergleichbare Pharmakokinetik aufweist [27]. Die Struktur weist eine Vielzahl von Aminosäuren mit basischer oder saurer Seitenkette auf, welche für proteinchemische Modifikationen zur Verfügung stehen (darunter 59 Lysin-, 36 Asparaginsäure- und 62 Glutaminsäurereste).

Humanes Serumalbumin wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach als Arzneistoffträger sowohl für nieder- als auch makromolekulare Verbindungen evaluiert, da es die Eigenschaft besitzt eine Vielzahl verschiedener Stoffe zu binden [28, 29]. Seine dreidimensionale Struktur wurde mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt und kann als Ellipsoid, bestehend aus drei flexiblen, hintereinander angeordneten Domänen (Domäne I-III) aufgefasst werden [25, 30].

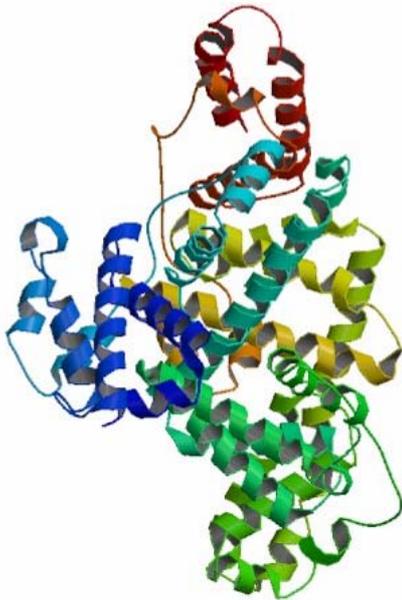


Abbildung 1: Kristallstruktur von humanem Serumalbumin. Die Abbildung entstammt der Brookhaven Protein Data Bank (ID 1E78).

Es besitzt zwei Bindungsstellen für niedermolekulare Verbindungen, zwei Bindungsstellen für langkettige Fettsäuren und zwei Bindungsstellen für Metallionen [24]. Bei Ethanolkonzentrationen von über 40% kommt es zur Denaturierung des Proteins, welches bei richtiger Wahl der Bedingungen nanopartikulär anfällt. Nach Durchführung dieser ethanolischen Desolvatation führt die Quervernetzung mit Glutaraldehyd in den beschriebenen Verfahren zur Stabilisierung des entstandenen Kolloidsystems [13].

1.2.3. Adsorptive und kovalente Arzneistoffbindung

Für die Bindung von Arzneistoffen an HSA-Nanopartikel stehen prinzipiell drei verschiedene Strategien zur Verfügung. Der Arzneistoff kann adsorptiv oder kovalent an die Partikeloberfläche gebunden, sowie in die Partikelmatrix inkorporiert werden [31, 32].

Die adsorptive Bindung umfasst hierbei sowohl unspezifische hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche (van-der-Vaals-Kräfte) sowie auch elektrostatische Interaktionen wie Polarisierung, Ionisation, Dipol- und Quadrupol-Wechselwirkungen. Es stellt sich ein

Verteilungsgleichgewicht zwischen dem umgebenden Medium und dem Kolloidsystem ein, welches für den nanopartikulären Träger umso günstiger ausfällt, je größer die Affinität zum Polymer bzw. je geringer die Affinität zum Lösungsmittel.

Aufschluss über den Ablauf dieses Verteilungsprozesses liefert der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient des verwendeten Arzneistoffs. Der berechnete log P-Wert von Temoporfin liegt bei 9,597 (berechnet mit ACD Labs Software, Version 8.19), der von humanem Serumalbumin hingegen bei -0,395 (nach Drug Data Bank, ID: DB00062), wodurch der Unterschied in den physikochemischen Eigenschaften von Arzneistoff und Träger deutlich wird.

Aufgrund seiner Hydrophilie eignet sich Albumin als Trägersystem für geladene Wirkstoffe, wie in vergangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte [32, 33].

Auch die Löslichkeit stellt ein wichtiges Charakteristikum für die Beurteilung der Adsorptionsneigung dar. Besitzt der Arzneistoff im umgebenden Medium eine gute Löslichkeit, so bedeutet dies gleichzeitig eine Verringerung der Adsorption, da die Ausbildung einer Lyosphäre hierbei in Konkurrenz mit der Bindung des Sorbats an den Sorbenten tritt [34].

Der Adsorption steht die kovalente Bindung von Arzneistoffen an humanes Serumalbumin gegenüber. Wie bereits dargelegt, weist das Protein eine Vielzahl funktioneller Gruppen auf, was eine proteinchemische Veränderung und die Bindung verschiedener Arzneistoffe oder „*Drug Targeting*“-Liganden ermöglicht. Die Entwicklungen der letzten Jahre umfassen hierbei sowohl die Herstellung von Albumin-Konjugaten, etwa von Methotrexat oder Doxorubicin [35, 36], sowie auch die Entwicklung oberflächenmodifizierter HSA-Nanopartikel [2, 19, 23, 32, 37].

Während adsorbierte Wirkstoffe in wässriger Suspension stets auch Desorptionsprozessen unterliegen, können durch kovalente Modifikation Partikelsysteme von erhöhter Stabilität *in vitro*, wie auch *in vivo* erreicht werden. Die Freisetzung des Wirkstoffs ist hierbei von der Hydrolyse der

eingeführten Bindung und nicht von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs abhängig.

1.2.4. Inkorporierung lipophiler Arzneistoffe in HSA-Nanopartikel

Der adsorptiven Bindung vergleichbar, sind die Mechanismen, welche der Inkorporierung von Arzneistoffen in HSA-Nanopartikel zugrunde liegen. Während die Adsorption an die Partikeloberfläche jedoch nach Herstellung eines chemisch stabilisierten Kolloidsystems erfolgt, liegt der Inkorporierung ein Verteilungsprozess zwischen dem gelösten Trägerprotein und dem verwendeten Arzneistoff zugrunde. Der Einschluss in humanes Serumalbumin erfolgt anschließend durch Fällung des gelösten Trägerproteins [32], wobei Molekülgröße und physikochemische Eigenschaften der beteiligten Stoffe deutlichen Einfluss auf die Effizienz der Einbettung nehmen. Je nach Zusammensetzung des entstehenden Mischpräzipitates sind hierbei deutliche Unterschiede der bislang entwickelten Formulierungen zu erkennen. Die Herstellung von Kopräzipitaten durch Hochdruckhomogenisation (siehe 1.2.5) führt oftmals zur Entstehung von Nanokapseln, welche Präzipitate des Arzneistoffs umschließen und auch ohne Einsatz des Stabilisators Glutaraldehyd eine gewisse Stabilität aufweisen [23].

HSA-Nanopartikel, die durch ethanolische Desolvation hergestellt wurden, zeigen hingegen eine sphärische, gleichmäßige Struktur, bei welcher die Eigenschaften vorwiegend durch den Überschuss des Polymers bestimmt werden.

Für Größe und Polydispersitätsindex ist hierbei auch die Ionenstärke entscheidend, da diese einen erheblichen Einfluss auf die Abstoßungskräfte des entstehenden Kolloidssystems nimmt [13]. Je nach Arzneistoff ist daher eine Optimierung des Einbettungsprozesses erforderlich. Negativ geladene Moleküle erhöhen die Oberflächenladung, so dass die Desolvation auch bei niedrigeren pH-Werten erfolgen kann [32].

Aufgrund der auftretenden intra- und intermolekularen Abstoßungskräfte kann vermutet werden, dass sich bei der Desolvatation von Albumin eine Porenstruktur ausbildet, deren Porendurchmesser auch von der Menge des eingesetzten Stabilisators Glutaraldehyd abhängig ist.

Makromolekulare Wirkstoffe werden dadurch aufgrund ihres Molekularvolumens zunehmend am Austreten in das umgebende Medium gehindert, während niedermolekulare Wirkstoffe hingegen im Partikelinneren in Form von Oligomeren oder Präzipitaten angereichert werden können [23].

Ein Ausdiffundieren von Antisense-Oligonukleotid-Wirkstoffen wurde in Arbeiten von Steinhauser et al. nach Abschluss des Herstellungsprozesses beobachtet. Die chemische Stabilisierung bewirkte hierbei eine deutliche Verringerung der während langer Lagerung austretenden Arzneistoffmenge gegenüber einer Hitzedenaturierung [12].

Das Desolvatationsreagenz übt hierbei einen gewissen Einfluss auf die Effizienz der Inkorporierung aus. Stoffe mit hoher Löslichkeit und unzureichender Affinität zum Protein können infolge des Desolvatationsprozesses in das umgebende Medium diffundieren und stehen dadurch für die Einbettung nicht mehr zur Verfügung.

1.2.5. Abraxane®

Die von American Bioscience Inc. entwickelte „*nabTM technology*“ stellt eine effiziente Form der Inkorporierung lipophiler Arzneistoffe in HSA-Nanopartikel dar. Das Arzneimittel Abraxane® wurde 2005 von der FDA und schließlich 2008 auch von der EMA für metastasierenden Brustkrebs zugelassen. Die Partikel mit einem Durchmesser von etwa 100 - 200 nm werden durch Hochdruckhomogenisation des lipophilen Wirkstoffs Paclitaxel in Gegenwart von 3-4% HSA hergestellt [38] und so mit dem Arzneistoff beladen.

Frühere Formulierungen des Zytostatikums (Taxol®) enthielten zur Stabilisierung den Emulgator Cremophor® EL und Ethanol, wodurch das Nebenwirkungspotential des Arzneimittels deutlich erhöht wurde.

Bei Abraxane[®] erfolgt eine Stabilisierung der Partikel durch Anreicherung des makromolekularen Trägers auf der Oberfläche nanonisierter Wirkstoffkristalle. Diese werden infolge der Hochdruckhomogenisation z.T. denaturiert und bilden eine Nanokapsel, die den Arzneistoff umhüllt [23].

Humanes Serumalbumin wurde bereits in früheren Arbeiten als Stabilisator für die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln identifiziert und lagert sich an dessen lipophiler Oberfläche an [39]. Das Protein wird bei der Herstellung von Abraxane[®] nicht aus der entstandenen Partikelsuspension entfernt. Es ist daher davon auszugehen, dass auch der hohe Anteil gelösten Albumins deutlichen Einfluss auf die Aggregationsneigung des kolloidalen Wirkstoffs besitzt. Deutliche Veränderungen der Wirkstofffreisetzung oder eine Modifikation der Körperverteilung durch Aufbringen von „*Drug Targeting*“-Liganden sind daher vermutlich nicht möglich. Proteinchemische Veränderungen des eingesetzten Albumins wären nur von geringer Auswirkung für den kristallinen Arzneistoff.

1.2.6. Methoden zur Fällung von Proteinen

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Methoden zur selektiven Fällung bestimmter Proteine evaluiert. Diese dienten hierbei meist der Abtrennung und Fraktionierung von Proteinspezies aus groben Lysaten oder aber waren Bestandteil eines Aufreinigungsverfahrens. Hierbei erlangten unter anderem das Aussalzen mit Ammoniumsulfat, die isoionische Präzipitation, die ethanolische Desolvation, die Präzipitation mittels di- oder trivalenter Metallkationen und die Verwendung neutraler Polymere als Ausschlussreagenzien sowie verschiedene Osmolyte einige Bedeutung [40].

Insbesondere aufgrund der starken chaotropen Eigenschaften des Sulfat-Ions ist Ammoniumsulfat das Mittel der Wahl für das Aussalzen von Proteinen.

Aufgrund seiner Ladungseigenschaften bildet das Ion eine äußerst stabile Hydrathülle, welche in Konkurrenz mit der Hydrathülle des Proteins tritt und diesem die Wassermoleküle entzieht. Es kommt dadurch verstärkt zu Protein-

Protein-Wechselwirkungen, welche dann zu einer Desolvatation und damit zum Ausfallen des Proteins beitragen. Der pH-Wert, die Hydrophobizität und Ladungsverteilung des Proteins nehmen dabei deutlichen Einfluss auf die Effizienz der Fällungsreaktion [41].

Proteine weisen im salzfreien, isoelektrischen Zustand die geringste Wasserlöslichkeit auf und sind dann aufgrund der neutralen Molekülladung am wenigsten hydratisiert. Ihre Löslichkeit wird von zwei wichtigen Parametern bestimmt, dem pH-Wert der Lösung und der Salzkonzentration. Manche Proteine, wie z.B. β -Lactoglobulin können daher durch präzise Einstellung dieser beiden Parameter präzipitiert werden [40]. Humanes Serumalbumin ist auch nahe des isoelektrischen Punktes noch löslich, weshalb eine Anwendung dieses Verfahrens für die Herstellung einer nanopartikulären Formulierung ausgeschlossen werden konnte, gleichzeitig jedoch ist eine Verringerung der Hydratation des Proteins durch Annäherung an den isoelektrischen Punkt auch bei verschiedenen anderen Verfahren hilfreich, welche auf einem Entzug der Hydrathülle beruhen.

Bei der ethanolischen Desolvatation konkurriert das organische Nicht-Lösungsmittel Ethanol mit den Wassermolekülen der Hydrathülle des Proteins und verdrängt diese schließlich, wodurch die Präzipitation von Albumin einsetzt [42]. Unter kontrollierten Bedingungen, hinsichtlich des pH-Wertes, der HSA-Konzentration, der Salzkonzentration sowie der Zutropfgeschwindigkeit des Desolvatationsmittels ließen sich mit diesem Verfahren, wie bereits dargelegt (siehe 1.2.1) nanopartikuläre Trägersysteme aus humanem Serumalbumin herstellen [13, 43].

Die Interaktionen di- und trivalenter Metallkationen mit Proteinen, welche zu deren Präzipitation führen können, wurden von Gurd et al. im Jahr 1956 beschrieben [44], und auch Untersuchungen der Interaktion zwischen HSA und Zink liegen bereits vor [45]. Oftmals ist die Fällung hier Ergebnis einer spezifischen Interaktion mit geladenen Gruppen auf der Oberfläche des Proteins, welche zu einer Konformationsänderung führen, oder aber sie

werden als verstärkende Agenzien zur Unterstützung anderer Methoden verwendet [40].

Die Präzipitation von Proteinen mittels makromolekularer Ausschlussreagenzien und Osmolyten wird durch die Verdrängung des Proteins aus dem Solvens verursacht, ebenso wie durch den Entzug der Hydrathülle, infolge der Hydratisierung des konkurrierenden Polymers [40]. Das Polymer nimmt hierbei ein so großes Volumen ein, dass das sogenannte „*Crowding*“, eine lokale Aufkonzentrierung der Proteine im Medium bei gleichzeitiger Verminderung der Hydratisierung hervorgerufen wird [46]. Für humanes Serumalbumin wurden bereits verschiedene Polyethylenglykole evaluiert und erfolgreich für dessen Fällung eingesetzt, nicht jedoch für die Herstellung eines nanopartikulären Trägersystems [47].

1.2.7. Aktives und passives „*Drug Targeting*“

In der Tumorthherapie kommen oftmals hochpotente Wirkstoffe zum Einsatz, deren Toxizität durch Verwendung kolloidaler Trägersysteme reduziert [48] werden kann.

Verantwortlich dafür ist oftmals eine erhöhte Selektivität infolge des sogenannten „*Enhanced Permeability and Retention*“ (EPR) Effekts (siehe Abbildung 2).

Durch die gesteigerte Angiogenese solider Tumore kommt es zu einer starken Hypervaskularisierung, welche die Blutversorgung des schnellteilenden Gewebes sicherstellen soll. Die gestörte vaskuläre Architektur weist verstärkt Lücken auf, ermöglicht das Austreten des nanopartikulären Trägers in das Tumorgewebe und führt aufgrund der defekten Lymphdrainage zu dessen Akkumulation [49, 50].

Art und Umfang der Anreicherung ist ganz wesentlich vom Partikeldurchmesser abhängig, da Partikel kleiner als 150 nm sehr schnell durch das fenestrierte Endothel in die Leber gelangen, während größere Partikel vom Immunsystem erkannt und durch Makrophagen abgebaut werden

[21]. Durch Veränderung der Partikelgröße kann daher ein sogenanntes passives Tumortargeting erfolgen, da im Größenbereich zwischen 150 und 300 nm einerseits eine unkontrollierbare Diffusion des Arzneistoffs in gesundes Gewebe vermindert und andererseits die frühzeitige Erkennung durch das Immunsystem erschwert werden kann.

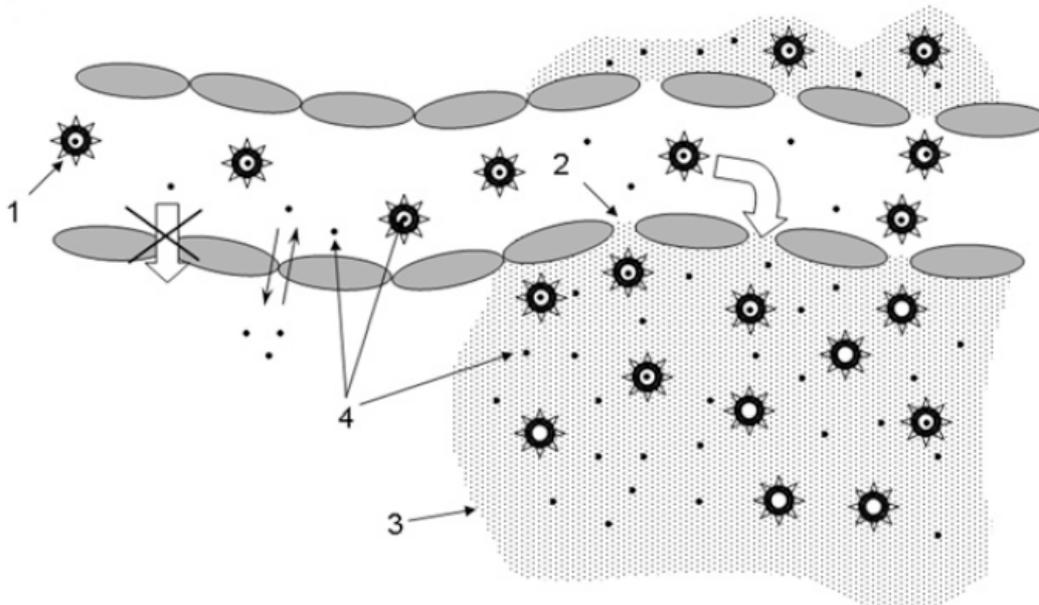


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verbesserten Anreicherung von nanopartikulären Trägersystemen (1) im Tumorgewebe, welches erhöhte Permeabilität (2) aufweist. Der Carrier reichert sich im Interstitium um das Tumorgewebe (3) an und setzt den Arzneistoff frei (4). Die Abbildung stammt aus [51].

Auch durch Modifikation der Partikeloberfläche mithilfe von Polyethylenglykolen konnte die Zirkulationsdauer im Blutkreislauf erhöht werden. Dies führt zu einer vermehrten Anreicherung der Partikel in soliden Tumoren infolge der mehrfachen Passage des erkrankten Gewebes, da es aufgrund der Hydrophilisierung der Partikeloberfläche zu geringeren Interaktionen mit dem Immunsystem kommt [52]. Diese Prinzipien des passiven Targetings stehen den aktiven Targetingmechanismen gegenüber.

So kann durch das Aufbringen bestimmter Liganden der Ort der Anreicherung nanopartikulärer Arzneistoffträgersysteme gesteuert werden. In früheren Untersuchungen wurden verschiedene Liganden für die Steuerung des Ortes

der Arzneistofffreisetzung evaluiert, darunter Antikörper [12, 37], Apolipoproteine [20], Integrine [53], Zuckermoleküle [54] und Rezeptoragonisten [55]. So war es möglich die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch Verwendung des Liganden Apolipoprotein E im Tiermodell zu belegen [20, 56] und auch die Selektivität von HSA-Nanopartikeln für bestimmte Tumorzelllinien wurde gezeigt [37].

1.3. Photodynamische Therapie (PDT)

1.3.1. Therapieprinzipien

Der Begriff der photodynamischen Aktivität wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch die Wissenschaftler von Tappeiner und Jesionek geprägt, welche erstmals Hautkrebs mit weißem Licht nach topischer Applikation von Eosin behandelten. In späteren Arbeiten wurden verschiedene Substanzen mit Licht kombiniert und führten schließlich zur Entwicklung der modernen Photodynamischen Therapie [57].

Sie basiert auf dem Zusammenwirken dreier Faktoren: dem Photosensibilisator, Licht und Sauerstoff. Dabei wird ein lichtsensitives und in den verabreichten Konzentrationen untoxisches Molekül, der sogenannte Photosensibilisator, zumeist intravenös oder topisch appliziert und anschließend durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge aktiviert.

Der Photosensibilisator geht dadurch vom Grundzustand S_0 (PhS) in den angeregten Singulett-Zustand S_1 ($^1\text{PhS}^*$) über und anschließend durch „*Intersystem-Crossing*“ in den angeregten Triplett-Zustand S_3 ($^3\text{PhS}^*$). Die nachfolgenden Reaktionen werden in Typ I- und Typ II-Reaktionen unterschieden. Die Reaktionen vom Typ I sind Radikal- oder Elektronentransferreaktionen des reduktiven „*Quenchings*“ mit Biomolekülen (zumeist mit Thiol- oder Aminogruppen) bzw. oxidativen „*Quenchings*“ mit Sauerstoffmolekülen.

Vorherrschend sind Reaktionen vom Typ II, welche zur Bildung von kurzlebigen, hochreaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) führen, der durch Reaktion mit verschiedenen Zellbestandteilen seine zytotoxische Wirkung entfaltet.

Für die Bestrahlungstherapie werden spezielle Lasersysteme eingesetzt, welche auch schwer zugängliche Tumore endoskopisch erreichbar machen [58]. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt die Eindringtiefe des Lichts in die

Haut zu, weshalb Stoffe mit Absorption im Wellenlängenbereich von etwa 680-800 nm gute Eignung für die Photodynamische Therapie besitzen [59].

Licht aus dem grünen und blauen Bereich des Spektrums besitzt eine Eindringtiefe von nur etwa 2 mm, während Licht aus dem roten Bereich (>600 nm) etwa 8-10 mm tief in die Haut eindringt. Gleichzeitig ist jedoch ein gewisser Mindestenergieeintrag in das Chromophor erforderlich, um die Photodynamische Aktivität zu stimulieren. Weiterhin neigen Moleküle, die auch im höheren Wellenlängenbereich absorbieren, eher zum „*Photobleaching*“ durch Reaktion mit Singulett-Sauerstoff und Zerstörung des Chromophors [60].

Neben der direkten Schädigung des Tumorgewebes tragen auch die anschließenden Entzündungsprozesse, die damit verbundene Stimulation des Immunsystems und die Zerstörung der zuführenden Blutgefäße zur Effektivität der Photodynamischen Therapie bei [61].

1.3.2. Photosensibilisatoren in der Tumortherapie

In der Photodynamischen Therapie (PDT) werden Arzneistoffe, welche sich bevorzugt in schnellteilendem Gewebe anreichern und dort nach Aktivierung durch Licht zytotoxische Sauerstoffspezies generieren, als Photosensibilisatoren („*Photosensitizer*“) bezeichnet [62].

Der ideale Photosensibilisator weist dabei eine minimale Dunkeltoxizität auf, wird schnell und selektiv vom erkrankten Gewebe angereichert, wird bei einer Wellenlänge mit ausreichender Gewebepenetration aktiviert, zeigt eine starke photodynamische Aktivität und wird anschließend rasch eliminiert, so dass keine ungewollte Photosensibilisierung auftreten kann [60]. Im Jahr 2003 waren weltweit drei Photosensibilisatoren für die Therapie von Tumoren zugelassen - Photofrin[®], Metvix[®] und Foscan[®] [57]. Während das in Metvix[®] enthaltene Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat) topisch appliziert wird, stehen mit Foscan[®] und Photofrin[®] Zubereitungen zur parenteralen Applikation zur Verfügung.

Photofrin[®] (Axcan Pharma, Birmingham, USA) war der erste zugelassene Photosensibilisator und enthält ein komplexes Gemisch von mehr als 60 verschiedenen Wirkstoffen, welche Mono-, Di- und Oligomere des Porphyrins Hematoporphyrin darstellen. Seit seiner Entwicklung vor mehr als 20 Jahren erwies er sich als effektiv in der Bekämpfung von Tumoren, besitzt geringe Dunkeltoxizität und kann aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit problemlos intravenös appliziert werden.

Gleichzeitig führt das Arzneimittel jedoch aufgrund der pharmakokinetischen Eigenschaften des Wirkstoffs zu einer langanhaltenden Photosensibilisierung über 6 Wochen. Des Weiteren ist eine Gewebspenetration der für die Aktivierung benötigten Wellenlängen (> 600 nm) auch in tiefe Hautschichten möglich, wodurch es auch dort zu typischen Verbrennungserscheinungen kommen kann. Außerdem besitzt Photofrin[®] wegen seines niedrigen Extinktionskoeffizienten nur geringe photodynamische Aktivität.

Das Arzneimittel Foscan[®] (Biolitec AG, Jena, Deutschland) ist ein Photosensibilisator der zweiten Generation mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften und einer hohen Affinität zu Epithelzellen (siehe auch 1.3.3).

1.3.3. Foscan[®]

Der Wirkstoff Temoporfin (mTHPC) gehört zu den effizientesten Photosensibilisatoren der zweiten Generation [63, 64] und wurde erstmals in der EU für die Palliativbehandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Kopf- und Nackenkarzinom zugelassen. Er kann hierbei sowohl zur Zerstörung von Gefäßwänden, wie auch von Tumorzellen eingesetzt werden, wobei die Effizienz seiner photodynamischen Aktivität in den jeweiligen Regionen stark vom sogenannten „*Drug Light Interval*“ (DLI) abhängig ist. Während 48 h nach der Applikation von Foscan[®] im Tiermodell eine bevorzugte Anreicherung von mTHPC in den Gefäßwänden gezeigt werden konnte [65, 66], wird in der klinischen Anwendung ein DLI von 96 h empfohlen. Diese vergleichsweise

lange Zeitspanne soll dabei die größtmögliche Akkumulation im Tumor und geringe Auswirkungen der Therapie auf das umliegende Gewebe garantieren [67]. In einigen Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass keine Korrelation zwischen der Konzentration des Photosensibilisators im Tumorgewebe und der photodynamischen Effektivität bestand. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Wirkung von Temoporfin vorwiegend auf der Zerstörung blutführender Gefäße und den daraus resultierenden nekrotischen und apoptotischen Gewebsveränderungen beruht [68].

Da der Arzneistoff nur geringe Wasserlöslichkeit besitzt, ist in der Injektionslösung Foscan[®] neben Temoporfin ein Gemisch der Lösungsmittel Ethanol und Propylenglykol enthalten. Sie wird in einer langsamen Bolusinjektion verabreicht, da es nahe der Injektionsstelle zur osmotischen Reizung des Gewebes sowie zur Präzipitation des Photosensibilisators kommen kann. Eine weitere typische Nebenwirkung des Arzneimittels ist die auftretende Photosensibilisierung. Diese hält für den gesamten Organismus etwa 2-4 Wochen nach der Behandlung mit Foscan[®] [69] an, kann jedoch entlang der Injektionsvene aufgrund der Bildung kristalliner Depots darüber hinaus andauern.

Grund für die Verringerung der Gewebspenetration im Vergleich zu Photofrin[®] ist höchstwahrscheinlich die hohe Plasmaproteinbindung des Arzneistoffes, welche vom Hersteller mit 85-87% angegeben wird.

1.4. Cetuximab

Der Antikörper Cetuximab wurde ursprünglich von der Firma ImClone Systems (New York, USA) entwickelt. Nachdem die FDA 2002 die Zulassung des Antikörpers überraschend versagte, wurde die Firma von Lilly (Indeanapolis, USA) übernommen. Außerhalb der USA wird Cetuximab heute von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) unter dem Handelsnamen Erbitux[®] vertrieben.

1.4.1. Der EGF-Rezeptor

Der humane „*epidermal growth factor receptor*“ (epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, EGFR, HER) ist ein Mitglied der ErbB-Familie, und bezeichnet eine Gruppe von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen (HER1-4, EGFR1-4) [70]. Die Kinasedomäne des Enzyms, welche auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert ist, wird über eine Transmembrandomäne mit der extrazellulären Domäne verbunden [71].

Die Bindung des Liganden „*epidermal growth factor*“ (EGF) führt zur Bildung von Homo- und Heterodimeren innerhalb der ErbB-Familie und es kommt zur Aktivierung der Kinase auf der Membraninnenseite, mit anschließender Autophosphorylierung des Proteins. Dadurch wird die Bindung verschiedener Singalproteine aus dem Zytoplasma ermöglicht [72], was zur Aktivierung bestimmter Signalkaskaden führt.

Die physiologische Bedeutung dieser Tyrosinkinasen liegt v.a. in der Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und –migration [73]. Für EGFR konnte als ersten Rezeptor eine Verbindung zwischen Rezeptorfunktion und Tumorentwicklung gezeigt werden [71, 74], was ihn zu einem interessanten Target für die Tumorthherapie werden ließ.

Viele Tumore zeigen eine Überexpression von EGFR, welche aufgrund der erhöhten Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche zur vermehrten Bildung von

Homodimeren führt. Dies wiederum bewirkt eine permanente Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase, die das Wachstum der Zelle stimuliert [74].

1.4.2. Mechanismus von Cetuximab

Cetuximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper, welcher sich gegen die extrazelluläre Domäne der ErbB-Rezeptorfamilie richtet und dadurch die Ligandenbindung sowie die anschließende Signaltransduktion unterbindet [75].

Die 3D-Struktur des Cetuximab-EGFR1-Komplexes ist bereits bekannt, wobei eine Bindung des Antikörpers an ein Epitop direkt an der Bindungsstelle des Liganden EGF offenbart wurde [76]. Zunächst wurde eine Korrelation der EGFR-Expression mit der Wirksamkeit des Antikörpers vermutet, es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Mutation des KRAS-Proteins in der nachgeschalteten Signalkaskade für das Ansprechen auf die Therapie mit Cetuximab deutlich mehr Aussagekraft besitzt [77]. Wenige Stunden nach der Bindung von Cetuximab an den Rezeptor kommt es zur Internalisierung des Komplexes, mit anschließendem lysosomalem Abbau der beteiligten Proteine, wie in Zellkultur gezeigt werden konnte [78].

1.4.3. Therapie mit Cetuximab

Cetuximab wurde für die Therapie von Kolonkarzinom 2003 in den USA, 2004 in der Europäischen Union und 2008 in Japan zugelassen. Der Antikörper zeigte mittlere Effizienz in zwei randomisierten Phase III-Studien, mit Ansprechraten von etwa 8% und einer signifikanten Erhöhung der progressionsfreien Überlebenszeit sowie der Gesamtüberlebenszeit von 4,6 auf 6,1 Monate verglichen mit der Standardtherapie [77].

Die auftretenden Nebenwirkungen bestanden v.a. in einem akneartigen Hautausschlag, welcher mit dem Ansprechen auf die Therapie zu korrelieren schien (bis zu 16%), allergischen Reaktionen (3,5-5%) sowie Lethargie (4-10,4%). Der Hautausschlag entwickelt sich normalerweise innerhalb der

ersten 3 Wochen, wobei eine topische Therapie mit Steroiden und Antibiotika keine Besserung brachte. Eine Erhöhung der Toxizität in Kombination mit anderen Standardtherapeutika wurde nicht beobachtet und der Antikörper wurde insgesamt gut vertragen [79, 80].

1.4.4. Aktives Targeting mit Cetuximab

Nach Bindung von Cetuximab an den EGF-Rezeptor kommt es zur Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes, wodurch eine aktive Targetingstrategie durch Kombination des Antikörpers mit einem Trägersystem möglich wird. In EGFR-positiven Zellen wurde eine Aufnahme in Endosomen oder Lysosomen durch Verwendung eines pH-sensitiven Fluoreszenzmarkers innerhalb von 2 Stunden nachgewiesen [78]. In früheren Untersuchungen wurde die erhöhte Aufnahme von HSA-Nanopartikeln durch Bindung des Antikörpers Trastuzumab untersucht, welcher ebenfalls einen monoklonalen IgG-Antikörper gegen einen Rezeptor aus der ErbB-Familie darstellt. Trotz Veränderungen des ursprünglichen Moleküls durch Thiolierung mit Traut's Reagenz konnte eine Verbesserung der Aufnahme in HER2-positiven Zellen mittels FACS und CLSM nachgewiesen werden [12, 81].

Wie bereits dargelegt sind andere Wirkstoffe (nicht Temoporfin) für die Photodynamische Therapie von Patienten mit Kolonkarzinom bereits zugelassen. Ein „*Targeting*“ der entwickelten Trägersysteme für EGFR-hochexprimierende Tumore im Darmtrakt sollte daher durch Bindung des Liganden Cetuximab ermöglicht werden.

1.5. Testmodelle für die in-vitro-Charakterisierung

1.5.1. Photophysikalische Charakterisierung

Durch die photophysikalische Charakterisierung der entwickelten Formulierungen sollte *in vitro* gezeigt werden, dass die wirksamkeitsbestimmenden Eigenschaften von Photosensibilisatoren auch in Kombination mit dem verwendeten Trägersystem erhalten bleiben bzw. eine die Wirkung beeinflussende Veränderung erfahren. Es wurden dafür Änderungen des Absorptionsspektrums, des Fluoreszenzspektrums, der Fluoreszenzlebensdauer und Generierung des reaktiven Triplett-Zustandes sowie des gebildeten Singulett-Sauerstoffs untersucht [82]. Durch Vergleich der letztgenannten Eigenschaften einerseits in wässriger Suspension und andererseits in lebenden Zellen (Jurkat-Zellen, siehe auch 2.5) sollte auch die Arzneistofffreisetzung mit der resultierenden Wirkverstärkung *in vitro* abgebildet werden.

Während die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften in erster Linie Hinweise auf den Bindungs- und Aggregationszustand der verwendeten Photosensibilisatoren liefern [83], wird über die Lumineszenz-Abklingkurve von Singulett-Sauerstoff auch das zytotoxische Agenz der Photodynamischen Therapie messbar [84].

1.5.2. Zellkulturmodelle

Für die *in vitro*-Charakterisierung wurde die Aufnahme der entwickelten Zubereitungen in verschiedenen Zelllinien untersucht (siehe 2.5). Während die Untersuchungen in Jurkat-Zellen vorwiegend photophysikalische Veränderungen des Photosensibilisator-beladenen Trägersystems in zellulärer Umgebung aufzeigen sollte, wurde in den aus Kolonkarzinomen isolierten DiFi- und LS174T-Zellen unter anderem das Prinzip des aktiven „*Drug Targetings*“ mit dem Antikörper Cetuximab erprobt.

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

Acetonitril EMPLURA®	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure 98-100%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cetuximab (Erbix®)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DMEM / F12	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
DMEN High glucose	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
Humanes Serumalbumin (Fraktion V) Chargen: 028K7550, 76K7555	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Hydroxylaminhydrochlorid	Fluka (Buchs, Schweiz)
Gibco® RPMI 1640 Zellkulturmedium	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Glutaraldehyd 25%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)
McCoy's 5A	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
mPEG5000-SPA	Nektar (Huntsville, USA)
Natronlauge 1N / 0,1N	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NHS-PEG5000-Mal	Rapp Polymere (Thübingen, Deutschland)
Saccharose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure 1N / 0,1N	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaN ₃	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Pepsin A	Sigma (Steinheim, Deutschland)

Pioloform	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Polyethylenglykol (PEG) 400	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Polyethylenglykol (PEG) 300	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Polyethylenglykol (PEG) 600	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Polyethylenglykol (PEG) 4000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trifluoressigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
2-Iminothiolan (Traut's Reagenz)	Pierce (Rockford, England)
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid*HCl	Pierce (Rockford, England)
5-Carboxytetramethylrhodamin-Succinimidylester (5-TAMRA-NHS)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-porphyrin (mTHPP)	Biolitec AG (Jena, Deutschland)
5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-chlorin (mTHPC)	Biolitec AG (Jena, Deutschland)
5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-tris(3-hydroxyphenyl)-porphyrin (mTHPP-COOH)	Biolitec AG (Jena, Deutschland)
5/6-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (FITC-NHS)	Pierce (Rockford, England)

2.2. Pufferrezepturen

Bicarbonatpuffer pH 9,2	1,43 g NaHCO ₃ 3,72 g Na ₂ CO ₃ x 10 H ₂ O ad 1000,0 mL gereinigtes Wasser
Citratpuffer pH 6,2	0,948 g Zitronensäure (wasserfrei) 13,38 g Natriumcitrat ad 1000,0 mL gereinigtes Wasser
Phosphatpuffer pH 7,4	1,36 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 6,18 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1000,0 mL gereinigtes Wasser
Phosphatpuffer pH 8,0	0,39 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 7,05 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1000,0 mL gereinigtes Wasser

2.3. Fließmittel

Phosphatpuffer pH 6,6	3,35 NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 1,75 Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 15,5 NaCl 0,25 NaN ₃ ad 1000,0 mL gereinigtes Wasser
HPLC / Arzneistoffe	57,5% Acetonitril 42,5% Trifluoressigsäure-Lösung 0,1% (in Wasser)
HPLC / PEG	10% Acetonitril 0,05 M Natriumnitrat-Lösung

2.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

200 Mesh Hexagonale Kupfernetzchen (3,05 mm), Art.Nr: G2450C	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Agilent HPLC / SEC Isokratic pump 1200 Series 1200 Series Autosampler 1200 Series UV/VIS Detector Agilent Chemstation Software	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
PSS Proteema Säule 5 µm, 300 x 8 mm	Polymer Standard Service (Mainz, Deutschland)

CamScan CS4 Rasterelektronenmikroskop	Cambridge Scanning Company (Cambridge, UK)
Centrifuge 5417 D	Eppendorf (Engelsdorf, Deutschland)
Christ Alpha 1-4 Gefriertrockner	Martin Christ GmbH (Osterode, Deutschland)
Christ Epsilon 1-4 Gefriertrockner	Martin Christ GmbH (Osterode, Deutschland)
Cougar NdVO4-Laser	Time Bandwidth products (Zürich, Schweiz)
Fluoview™ FV1000 Konfokalmikroskop	Olympus (Hamburg, Deutschland)
FLIM-Erweiterung	PicoQuant GmbH (Berlin, Deutschland)
Ge-diode Detektors EO-817P	North Coast Inc. (Santa Rosa, USA)
Handtacho	Mayer & Wonisch (Arnsberg, Deutschland)
Hitachi U-3000 Spectrophotometer	Hitachi (Tokio, Japan)
Ismatec IPN Pumpensystem	Ismatec (Zürich, Schweiz)
LOT-Oriel Instaspec IV CDD-Matrix	LOT-Oriel (Massy, Frankreich)
Malvern Zetasizer 3000 HSA	Malvern (Malvern, UK)
Merck Hitachi HPLC L-6220 Pump L7200 Autosampler RI-71 Differential Refractometer	Merck Hitachi (Darmstadt, Deutschland)
Kontron PC Integration Pack	Kontron (Milan, Italien)
PSS Suprema Säule 10 µm, 50 x 8 mm	Polymer Standard Service (Mainz, Deutschland)
Merck-Hitachi HPLC / SEC D-7000 Interface L-7120 Pump L-7200 Autosampler L-7455 Diode Array Detector HPLC Manager Software	Merck Hitachi (Darmstadt, Deutschland)
Gemini NX Säule 5 µm, 250 x 250 mm Biosep SEC S-3000-Säule 5 µm, 300 x 7,80 mm,	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)

Microcon [®] 30.000 Microconcentrators	Amicon (Beverly, USA)
Mikrowaage Sartorius Supermicro	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Millipore VSWP 0,025 µm	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop	Philips (Andover, USA)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick (Berlin, Deutschland)
R3809-01 Mikrokanalplatte	Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)
Shimadzu Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Sputter SCD 040	BALTEC (Liechtenstein)
Ultraschallbad Transonic Digital	Elma (Singen, Deutschland)
Variomag Multipoint Magnetrührplatte	H+P Labortechnik AG (Oberschleißheim, Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Whatman [®] FP30/0,2 Sterilfilter	Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
Xenon Lampe Osram XBO 150	Osram (Winterthur, Schweiz)
Monochromator	LOT-Oriel (Massy, Frankreich)

2.5. Zelllinien

	Clone E 6-1 Akute T-Zell-Leukämie ATCC, ID TIB-152™
Jurkat-Zellen	Humane lymphozytäre Leukämiezelllinie, die 1976 aus dem peripheren Blut eines an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankten 14 Jahre alten Jungen entnommen wurden [85].
	Humanes Kolonkarzinom Indivumed (Hamburg, Deutschland)
DiFi	Humane epitheliale Kolonkarzinom-Zelllinie, die 1993 aus einer 46 Jahre alten Patientin mit Gardner-Syndrom entnommen wurde [86].
	Humanes Kolonkarzinom, ATCC , ID CL-188™
LS174T	Humane epitheliale Kolonkarzinom-Zelllinie, die 1974 aus einer 58 Jahre alten Patientin isoliert wurde [87].

2.6. Physikochemische Charakterisierung von Photosensibilisatoren

2.6.1. Löslichkeitsuntersuchungen in ethanolischer Lösung

Die Löslichkeit von mTHPP, mTHPC und mTHPP-COOH in Ethanol 96% [V/V] wurde durch Filtrationstechnik bestimmt. Es wurde jeweils eine Lösung des Photosensibilisators mit einer Sollkonzentration von 5 mg/mL hergestellt und in der Zentrifuge (20817 g, 15 °C, 10 min) durch einen Microcon[®] 30 kDa-Ausschlussfilter filtriert. Vor und nach der Zentrifugation wurde die Probe für 2 Minuten in einem VortexGenie2[®] auf maximaler Stufe homogenisiert und der Gehalt photometrisch bestimmt.

Für die Löslichkeitsbestimmung in Ethanol 55,0% und 62,3% [V/V] erfolgte die Bestimmung der Löslichkeit mit einer eingestellten Sollkonzentration von 1 mg/mL unter Verwendung desselben Verfahrens.

2.6.2. Löslichkeitsuntersuchungen in HSA-stabilisierter Lösung

Zur Untersuchung der Stabilität in HSA-haltigen Beladungsmedien wurden einer hydroethanolischen Lösung (0,15 mg/mL mTHPP bzw. mTHPC in Ethanol 34,3% [V/V]) definierte Mengen an HSA (0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00%, 1,25%, 1,50%, 1,75%, 2,00% HSA) zugesetzt und über 24 h bei 15 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 120 min zentrifugiert (20817 g, 15 °C, 10 min). Vor und nach Beginn der Inkubation wurden 200 µL der entstandenen Lösungen abgenommen und der Gehalt an Photosensibilisator photometrisch bei einer Wellenlänge von 512 nm für mTHPP und 517 nm für mTHPC bestimmt.

2.6.3. Stabilität gegenüber Glutaraldehyd

Da spätere Versuche eine Einbettung der Photosensibilisatoren in HSA-Nanopartikel und die Quervernetzung dieser Partikel mit Glutaraldehyd vorsahen, wurde die Stabilität des Arzneistoffs gegenüber Glutaraldehyd bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dazu wurden 13 µL einer ethanolischen Lösung mit 1 mg/mL der Photosensibilisatoren mTHPP, mTHPC bzw. mTHPP-COOH, 597 µL Ethanol 96% [V/V] und 90 µL einer wässrigen Glutaraldehyd-Lösung 8% [V/V] versetzt. Anschließend wurden jeweils 100 µL eines 50 mM Citratpuffers pH 6,2, eines Phosphatpuffers pH 7,2 bzw. eines Bicarbonatpuffers pH 9,2 zugegeben und über 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden Standards gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne Arzneistoff bzw. ohne Glutaraldehyd hergestellt. Die Untersuchung der Proben erfolgte auf einer Merck-Hitachi HPLC Anlage mit einer Gemini NX Säule.

2.6.4. HPLC-Bestimmung von Photosensibilisatoren

Die chromatographische Trennung wurde bei einer Flussrate von 1,0 mL/min und Raumtemperatur durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus 57,5% Acetonitril und 42,5% einer 0,1-%igen [V/V] wässrigen Trifluoressigsäurelösung. Die Detektion erfolgte photometrisch mittels eines Diodenarray-Detektors bei 200-600 nm und wurde mithilfe der HPLC System Manager (Verion 4.1) Software bei einer Wellenlänge von 420 nm ausgewertet.

2.7. Adsorptive Bindung von Photosensibilisatoren

2.7.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln

a) Desolvation unter Verwendung eines Magnetrührsystems

Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA) wurden nach einer bereits beschriebenen Methode [13, 19, 43] durch ethanolische Desolvation hergestellt. Dazu wurden 200 mg humanes Serumalbumin (HSA) in 2 mL 10 mM NaCl-Lösung gelöst, der pH auf 7 - 8,5 eingestellt und anschließend durch einen Filter der Porengröße 0,22 μm filtriert. Die 10%-ige Lösung wurde unter permanentem Rühren auf einer Magnetrührplatte (400 – 500 U/min) tropfenweise mit 8,0 mL Ethanol 96% [V/V] versetzt. Die erhaltenen Nanopartikel wurden anschließend durch die Zugabe von 115,6, 80,8 oder 46,2 μL Glutaraldehydlösung 8% quervernetzt (entspricht einem Quervernetzungsgrad von 100%, 70% und 40% bezogen auf die 60 Aminogruppen des HSA-Moleküls) und über 12 Stunden gerührt, um die Ausbildung eines stabilen Kolloidsystems zu ermöglichen.

b) Desolvation unter Verwendung verschiedener Flügelrührsysteme

Die zuvor konstruierten Flügelrührsysteme (siehe Abbildung 5 in 3.2.1) wurden mit einer Spannung von 3 V betrieben und wie folgt eingesetzt.

Die Drehgeschwindigkeit der Rührer wurde mittels eines Handtachometers auf eine Geschwindigkeit von 400 - 500 U/min eingestellt. Die Geschwindigkeitsmessung erfolgte aus einem Abstand von 10 cm. Für das „Upscaling“ der HSA-Desolvation wurden Volumina von 4, 10 und 20 mL einer 10-%igen HSA-Lösung auf pH 7 - 8,5 eingestellt und anschließend unter permanentem Rühren durch tropfenweise Zugabe von 16, 40 oder 80 mL Ethanol 96% [V/V] desolvatisiert. Die Quervernetzung erfolgte durch Zugabe von 231, 470, 1175 oder 2350 μL Glutaraldehyd 8% (entspricht einem Quervernetzungsgrad von 100% für ein Volumen von 4 mL HSA-Lösung bzw.

200% für die Volumina von 4, 10 und 20 mL HSA-Lösung bezogen auf die 60 Aminogruppen des HSA-Moleküls). Anschließend wurde die Suspension über 12 Stunden gerührt, um die Ausbildung eines stabilen Kolloidsystems zu ermöglichen.

Diese Vergrößerung des Herstellungsprozesses erfolgte in zwei Schritten. Auf dem System Nanopaddle I wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 mL und einem Quervernetzungsgrad von 100% hergestellt. Mit dem größeren System Nanopaddle II wurden Ansatzgrößen von 20, 50 und 100 mL desolvatisiert und anschließend zu 200% quervernetzt.

2.7.2. Aufreinigung und Charakterisierung hergestellter Nanopartikel

Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgte durch 3-faches Zentrifugieren (16100 g, 20 °C, 8 min) und Resuspendieren des erhaltenen Pellets im halben Volumen gereinigten Wassers. Die gewaschenen Ansätze wurden wieder vereinigt und bezüglich Partikelgröße und Polydispersitätsindex mit einem Malvern Zetasizer 3000 HSA (25 °C, Messung über dynamische Lichtstreuung bei einem Winkel von 90°) charakterisiert. Der Gehalt wurde mittels Mikrogravimetrie bestimmt. Dazu wurden 50,0 µl der Partikelsuspension in ein Aluminiumwägeschiffchen pipettiert und diese Probe im Trockenschrank bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Partikelgehalt wurde anschließend durch Wägung auf einer Mikrowaage des Typs Sartorius Supermicro ermittelt.

2.7.3. Voruntersuchungen zur adsorptiven Bindung

Die Suspension wurde im Inkubationsmedium auf eine definierte Partikelkonzentration von 3,33 mg/mL eingestellt und mit mTHPP inkubiert, wobei ein 15-60-facher stöchiometrischer Überschuss berechnet auf die eingesetzte HSA-Menge zugegeben wurde. Ethanol 96% [V/V] wurden in allen Reaktionsansätzen auf eine definierte Lösungsmittelkonzentration eingestellt (Ethanol 55,0% und 62,3% [V/V]). Die Ansätze wurden unter permanentem

Schütteln und Lichtausschluss über 24 h inkubiert und die Proteinpartikel anschließend abzentrifugiert.

Der Überstand wurde nach der Zentrifugation (30 min, 15 °C, 16100 g) abgenommen und der Gehalt an mTHPP photometrisch bei 512 nm bestimmt.

2.7.4. Albumin-vermittelte, adsorptive Bindung an HSA-Nanopartikel

Für die Adsorption der Photosensibilisatoren mTHPP und mTHPC an HSA-Nanopartikel wurden 100 mg humanes Serumalbumin (HSA) in 1 mL einer 10 mM NaCl-Lösung gelöst, der pH auf 8,0 eingestellt und die Lösung durch einen Filter der Porengröße 0,22 µm filtriert. Anschließend wurden 5 mg der zuvor hergestellten HSA-Nanopartikel in einer hydroethanolischen Arzneistofflösung (0,15 mg/mL des Photosensibilisators in Ethanol 34,3% [V/V]) über 24 h inkubiert. Dabei wurden im Inkubationsmedium Konzentrationen des gelösten Proteins von 0,75 - 2,0% [m/V] eingestellt. Den vorherigen Untersuchungen zufolge ist eine Konzentration von mindestens 0,5% [m/V] an gelöstem Protein im verwendeten Medium erforderlich, um die gewählte Arzneistoffkonzentration hinsichtlich auftretender Präzipitation zu stabilisieren (siehe 3.1.2).

Die Partikel wurden abzentrifugiert (15 °C, 20817 g, 10 min) und das Pellet in jeweils 1,0 mL gereinigtem Wasser im Ultraschallbad (5 min) resuspendiert. Nach jedem Aufreinigungsschritt wurde die Arzneistoffkonzentration aus 50 µL des Überstandes photometrisch bei 512 nm für mTHPP bzw. 517 nm für mTHPC bestimmt.

Die Partikel wurden hinsichtlich ihrer Größe und des Polydispersitätsindex mit einem Malvern Zetasizer 3000 HSA charakterisiert. Der Gehalt wurde mittels Mikrogravimetrie bestimmt (siehe auch 2.7.2).

2.7.5. Direktbestimmung von Photosensibilisatoren

Für die Direktbestimmung von Photosensibilisatoren aus einer Nanopartikelsuspension wurde zunächst ein enzymatischer Verdau der Partikel durchgeführt.

Hierzu wurden 10 mg Pepsin in 1,0 mL einer 1-%igen wässrigen Ameisensäurelösung [V/V] gelöst. Nach Bestimmung des Nanopartikelgehalts wurde das Volumen der Suspension, welches 1 mg Nanopartikeln entspricht mit 250 μ L Pepsin-Lösung versetzt und das Gemisch mit gereinigtem Wasser auf 500 μ L aufgefüllt. Die Proben wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1,0 mL Ethanol 96% [V/V] zugegeben, die Proben wurden homogenisiert und anschließend Rückstände der enthaltenen Proteine abzentrifugiert (20817 g, 30 min, 15 °C). Einem Volumen von 800 μ L des entstehenden Überstandes wurden 200 μ L eines 50 mM Bicarbonatpuffers (pH 9,2) zugegeben und der Gehalt an mTHPP bei 512 nm bzw. an mTHPC bei 517 nm photometrisch ermittelt.

2.7.6. Zetapotentialmessung an beladenen HSA-Nanopartikeln

HSA-Nanopartikel wurden in Gegenwart von 1,5% HSA mit mTHPP und 2,0% HSA mit mTHPC beladen und anschließend aufgereinigt. Das Zetapotential wurde nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen mit einem Malvern Zetasizer 3000 HSA (25 °C, Messung über dynamische Lichtstreuung bei einem Winkel von 90°) bestimmt. Als Kontrollproben dienten unbeladene HSA-Nanopartikel.

2.7.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung von Nanopartikeln hinsichtlich ihrer Größe und Gestalt bietet die Elektronenmikroskopie.

Es wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop HSA-Nanopartikel mit einem Quervernetzungsgrad von 200%, für die Rasterelektronenmikroskopie Partikel

mit einem Quervernetzungsgrad von 100% eingesetzt und in Gegenwart von 2,0% [m/V] gelöstem HSA wie beschrieben mit mTHPC beladen.

a) Transmissionselektronenmikroskopie

Die Untersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM), ebenso wie die folgend beschriebenen Vorbereitungen wurden von Frau Anja Zensi am Institut für Pharmazeutische Technologie (Goethe Universität, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt.

Vor dem Aufbringen der Partikelsuspension war eine Vorbereitung der Trägernetze erforderlich. Dazu wurden zunächst 200 Mesh Hexagonale Kupfernetzchen 3,05 mm mit einem Pioloform-Film versehen.

Anschließend wurden 5 µl der Nanopartikelsuspension auf die befilmten TEM-Netzchen aufgetropft. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurde die überschüssige Suspension mit einem Filterpapier abgesaugt und trocknen gelassen.

Die Untersuchung erfolgte in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) der Firma Philips bei einer Normalspannung von 80 kV. Hierbei wurde ausgenutzt, dass Nanopartikel aus HSA, die mit 200% Glutaraldehyd quervernetzt wurden eine hohe Elektronendichte besitzen und ohne weitere Kontrastierung im Transmissionselektronenmikroskop sichtbar sind. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera und Gatan-Software.

b) Rasterelektronenmikroskopie

Die Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop (REM) ebenso wie die folgend beschriebenen Vorbereitungen wurden von Frau Karin Possemeyer am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie (Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Deutschland) durchgeführt.

Ein Volumen von 20 µL der zuvor hergestellten Partikelsuspension (siehe oben) wurde auf einen Millipore VSWP Membranfilter gegeben und über 4 h

im Exsiccator getrocknet. Der Membranfilter wurde mit Gold bedampft. Unter gleichen Bedingungen wurde das gleiche Volumen gereinigten Wassers vorbereitet und diente als Kontrolle. Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden in einem CamScan CS4 Mikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV, einem Abstand von 10 mm und 20000-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.7.8. Untersuchung der Proteinadsorption

HSA-Nanopartikel wurden wie beschrieben in Gegenwart von 2,0% [m/V] gelöstem HSA mit mTHPC beladen. Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand mittels einer bereits beschriebenen gelpermeationschromatographischen Methode [14] auf den Gehalt an HSA untersucht. Eine Kontrollprobe der gleichen Zusammensetzung, jedoch ohne HSA-Nanopartikel wurde verwendet.

2.7.9. pH-Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion

Um die pH-Abhängigkeit der adsorptiven Beladung zu bestimmen, wurden HSA-Nanopartikel in Gegenwart von 1,5% des gelösten Proteins mit Photosensibilisator (mTHPP und mTHPC) inkubiert. Der pH-Wert der HSA-Lösung wurde zuvor auf 4, 8 und 10 eingestellt. Während der Partikelaufreinigung wurde dann der pH-Wert der endgültigen Zubereitung aus dem Überstand der ersten Zentrifugation bestimmt um Einflüsse der übrigen zur Beladung eingesetzten Hilfsstoffe zu berücksichtigen. In der Darstellung der Ergebnisse ist der endgültige pH-Wert der Zubereitungen aufgeführt.

2.7.10. Zeitabhängigkeit der Adsorptionsreaktion

Für die Untersuchung des Einflusses der Inkubationszeit auf die Adsorption des Photosensibilisators wurden HSA-Nanopartikel wie beschrieben in Gegenwart des gelösten Proteins (1,5% [m/V] für mTHPP und 2,0% [m/V] für mTHPC) mit Arzneistoff beladen. Die Proben wurden unter permanentem

Schütteln (15 °C, 660 rpm) für 0,5, 1 bzw. 24 h inkubiert und anschließend wie beschrieben aufgereinigt und charakterisiert.

2.7.11. Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion vom Quervernetzungsgrad

Um die Adsorption abhängig des Vernetzungsgrades von HSA-Nanopartikeln zu bestimmen wurden Partikelchargen mit einem Vernetzungsgrad von 40%, 70% und 100% wie beschrieben hergestellt.

Die Chargen wurden dann in Ethanol 34,3% [V/V] bei einer Partikelkonzentration von 3,0 mg/mL unter Zusatz von 1,0% [m/V] HSA unter permanentem Schütteln (über 24 h, 15°C) mit mTHPP (0,15 mg/mL) inkubiert. Die Partikel wurden abzentrifugiert und der Arzneistoffgehalt photometrisch bei 512 nm gegen eine Standardlösung ohne HSA-Nanopartikel bestimmt.

2.7.12. Desorption nach adsorptiver Bindung

Die vorgeformten HSA-Nanopartikel wurden wie beschrieben in Gegenwart von 1,5% [m/V] gelöstem HSA mit mTHPP beladen und anschließend auf Desorption des Arzneistoffes untersucht.

Dazu wurden 50 µL des Partikelsystems (entsprechend 0,5 mg Partikelmasse) mit einem definierten Volumen der folgenden Medien gemischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

- 650 µL Zellkulturmedium für DiFi-Zellen
DMEM/F-12
10% [V/V] FKS-Gold
1% [V/V] Pen/Strep
- 650 µL Zellkulturmedium für HT29-Zellen
McCoy's 5A
10% [V/V] FKS-Gold
1% [V/V] Pen/Strep

- 650 μL Zellkulturmedium für LS174T-Zellen
DMEM high glucose (ohne Pyruvat, ohne L-Glutamin)
10% [V/V] FKS-Gold
1% Pen/Strep
1% L-Glutamin
1% Na-Pyruvat

Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert und die desorbierte mTHPP-Menge photometrisch bei 512 nm aus dem Überstand bestimmt.

Zum Vergleich wurden 50 μL derselben Partikelcharge mit Ethanol 96% [V/V] gewaschen (die Desorption in Ethanol wurde als 100% betrachtet). Um die Wiederfindung des Arzneistoffs im Zellkulturmedium zu bestimmen, wurden 50 μL einer mTHPP-Lösung (0,15 mg/mL) mit 650 μL Ethanol sowie mit 650 μL jedes Zellkulturmediums verdünnt. Die auftretende Volumenkontraktion wurde hierbei vernachlässigt. Anschließend wurde der mTHPP-Gehalt photometrisch ermittelt.

2.7.13. Gefriertrocknung adsorptiv beladener Nanopartikel

Die zuvor hergestellten HSA-Nanopartikel wurden wie beschrieben in Gegenwart von 2,0% [m/V] gelöstem HSA adsorptiv mit mTHPC beladen.

Die Gefriertrocknung erfolgte in einem Christ Epsilon 1-4 Gefriertrockner. Dazu wurden 5 mg der beladenen Nanopartikel in 1,0 mL einer 3-%igen Saccharose-Lösung [m/V] suspendiert. Kontrollproben gleicher Zusammenstellung, jedoch ohne den Kryoprotektor Saccharose wurden verwendet. Zunächst wurde die Produkttemperatur mit einer Geschwindigkeit von 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von +20 $^{\circ}\text{C}$ auf -40 $^{\circ}\text{C}$ gesenkt. Diese Parameter wurden für 2 h beibehalten und anschließend die Temperatur in einem Zeitintervall von 30 min auf -30 $^{\circ}\text{C}$ erhöht. Mit Evakuierung der Gefriertrocknungskammer auf 1,030 mbar wurde die Primärtrocknung eingeleitet. Nach Erhöhung der Temperatur auf -15 $^{\circ}\text{C}$ (0,1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) und anschließend auf +20 $^{\circ}\text{C}$ begann die Sekundärtrocknung. Diese Parameter wurden für 9,5 h beibehalten und

anschließend der Druck auf 0,001 mbar sowie die Temperatur auf +30 °C erhöht (0,2 °C/min). Nach 2 h unter den genannten Bedingungen war die Gefriertrocknung beendet und die Proben wurden nach Entfernen des Vakuums bei Normaldruck verschlossen.

Die gefriergetrockneten Proben wurden für 1 Tag sowie 3 und 6 Wochen bei Raumtemperatur gelagert und anschließend in 1 mL gereinigtem Wasser resuspendiert. Nach einer Wartezeit von 5 min, welche die gleichmäßige Durchfeuchtung der Proben gewährleisten sollte, folgte 5-minütiges Homogenisieren der Proben mithilfe eines Vortexers. Kontrollproben, welche eine wässrige Suspension der mTHPC-HSA-Nanopartikel und den Kryoprotektor Saccharose enthielten wurden bei 4 °C gelagert.

Alle Proben wurden nach der definierten Lagerzeit wie beschrieben auf Partikelgröße und Polydispersität charakterisiert.

2.8. Inkorporierung durch ethanolische Desolvatation

2.8.1. Desolvatation bei verschiedenen Ethanol-Volumina

Ein Volumen von 1,0 mL einer 6-%igen [m/V] HSA-Lösung in Ethanol 34,3% [V/V] mit 1 mg/mL mTHPP bzw. mTHPC wurde unter permanentem Rühren auf einer Magnetrührplatte (400 – 500 U/min) tropfenweise mit 1,28, 0,8 oder 0,6 mL Ethanol 96% [V/V] versetzt. Der pH-Wert der HSA-Lösung wurde zuvor auf 8,5 eingestellt.

Nach Ausformung der Partikel wurden diese durch Zugabe von 34,8 µL Glutaraldehyd quervernetzt (entsprechend einem Quervernetzungsgrad von 100%). Anschließend wurde die Suspension über 12 Stunden gerührt, um die Ausbildung eines stabilen Kolloidsystems zu ermöglichen. Es folgte die Aufreinigung und Charakterisierung (siehe 2.7.2). Der Arzneistoffgehalt wurde nach enzymatischem Abbau des Partikelsystems ermittelt (siehe 2.7.5).

2.8.2. pH-Abhängigkeit der Inkorporierung

Ein Volumen von 1,0 mL einer 6-%igen [m/V] HSA-Lösung in Ethanol 34,3% [V/V] mit 1 mg/mL mTHPP bzw. mTHPC wurde unter permanentem Rühren auf einer Magnetrührplatte (400 – 500 U/min) tropfenweise mit 1,28 mL Ethanol 96% [V/V] versetzt.

Der pH der HSA-Lösung wurde zuvor auf 6,5, 7,0 oder 8,0 eingestellt um die Abhängigkeit der Inkorporierungseffizienz vom pH-Wert zu untersuchen.

Die entstandenen Nanopartikel wurden durch Zugabe von 69,6 µL Glutaraldehyd (entsprechend einem Quervernetzungsgrad von 200%) quervernetzt. Anschließend wurde die Suspension über 12 h gerührt um die Ausbildung eines stabilen Kolloidsystems zu ermöglichen. Die Charakterisierung erfolgte wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben.

2.8.3. Desolvatation in Gegenwart von Cyclodextrinen

Ein Volumen von 1,0 mL einer 6-%igen [m/V] HSA-Lösung in Ethanol 17,3% [V/V] wurde in Gegenwart von 3,1, 6,2, 9,3 oder 24,7 mg/mL Cavasol W7 HP (Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, entsprechend einem 2-16-fachen molaren Überschuss auf die Photosensibilisator-Konzentration) unter permanentem Rühren durch tropfenweise Zugabe von 2,5 mL Ethanol 96% [V/V] desolvatisiert. Die entstandenen Nanopartikel wurden durch Zugabe von 69,6 μ L Glutaraldehyd (entsprechend einem Quervernetzungsgrad von 200%) quervernetzt. Anschließend wurde die Suspension über 12 h gerührt, um die Ausbildung eines stabilen Kolloidsystems zu ermöglichen. Die Charakterisierung erfolgte wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben.

2.8.4. Inkorporierung in Gegenwart von Cyclodextrinen

Zur Einbettung von mTHPP in die Partikelmatrix der HSA-Nanopartikel wurde eine 6-%ige [m/V] HSA-Lösung in Ethanol 17,3% [V/V] und 0,75 mg/mL mTHPP in Gegenwart von 9,3 oder 24,7 mg/mL Cavasol W7 HP[®] auf pH 8-9 eingestellt und durch Zugabe von 2,5 mL Ethanol 96% [V/V] bzw. einer ethanolischen mTHPP-Lösung mit 1 mg/mL desolvatisiert.

Ein Teil der Ansätze wurde dabei nach Vermischen von 150 μ L einer Arzneistofflösung (5 mg/mL) und dem 16-fachen molaren Überschuss an Cyclodextrin in 250 μ L Wasser einer Vorinkubation unterzogen. Anschließend wurden 600 μ L einer 10-%igen [m/V] HSA-Lösung zugegeben, 2 Minuten gewartet und daraufhin unter den beschriebenen Bedingungen (siehe oben) desolvatisiert.

Die Quervernetzung erfolgte durch Zugabe von 69,6 μ L Glutaraldehyd. Anschließend wurde die Suspension über 12 h gerührt, um die Ausbildung eines stabilen Kolloidsystems zu ermöglichen.

2.8.5. Komplexierung von mTHPC

Zur Komplexierung von mTHPC wurden 2 mg des Photosensibilisators in 0,5 mL Ethanol 55,5 % [V/V] gelöst, wobei eine leichte Übersättigung eintrat. Der Lösung wurden 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 oder 2,0 mg Zinkchlorid bzw. jeweils 10, 15 oder 20 mg des Hydroxypropyl- β -Cyclodextrins Cavasol W7 HP[®] sowie Methyl- β -Cyclodextrin zugesetzt. Anschließend erfolgte die Ausformung des mTHPC-Komplexes durch Gefriertrocknung in einem Christ Alpha 1-4 Gefriertrockner. Zunächst wurde die Produkttemperatur mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min von +20 °C auf -25 °C gesenkt. Nach 2 h wurde mit Evakuierung der Gefriertrocknungskammer auf 1,030 mbar die Primärtrocknung eingeleitet. Die Sekundärtrocknung begann nach 9,5 h mit Erhöhung der Temperatur auf +20 °C (1 °C/min). Der Druck wurde anschließend auf 0,001 mbar gesenkt. Nach 2 h unter den genannten Bedingungen war die Gefriertrocknung beendet. Die Proben wurden in Wasser resuspendiert und anschließend überschüssiges mTHPC abzentrifugiert (20817 g, 30 min, RT). Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter der Porengröße 0,22 μ m filtriert und der Gehalt an Cyclodextrin aus dem Überstand bestimmt.

2.8.6. Desolvation in Gegenwart von mTHPC-Cyclodextrin-Komplexen

Zur Desolvation von HSA in Gegenwart eines mTHPC-Cyclodextrin-Komplexes wurden 0,5 mL einer hydroethanolischen Lösung (Ethanol 55,0%) mit 2 mg/mL mTHPC, 2% [m/V] β -Methylcyclodextrin und 6% Saccharose [m/V] unter den in 2.8.5 beschriebenen Bedingungen gefriergetrocknet. Saccharose diente dabei als Kryoprotektor um die Herstellung einer weitgehend homogenen Dispersion des Arzneistoffs bei Redispergieren zu gewährleisten. Der gefriergetrocknete Kuchen wurde in 0,3 mL gereinigtem Wasser resuspendiert und anschließend mit 0,7 mL einer 10-%igen [m/V] wässrigen HSA-Lösung (pH 7-8) versetzt, gevortext und durch Zugabe von 2,8 mL Ethanol 96% [V/V] desolvatisiert. Die Suspension wurde mit einem Volumen von 80,2 μ L Glutaraldehyd quervernetzt (entspricht einem

Quervernetzungsgrad von 200%) wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben aufgereinigt und charakterisiert.

2.9. PEG-HSA-Desolvatationsverfahren

2.9.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln

Für die Desolvatation von HSA mit Polyethylenglykol wurden 90 mg humanes Serumalbumin in 0,9 mL 10 mM NaCl-Lösung gelöst und der pH auf 6 - 8 eingestellt. Die 10%-ige Lösung wurde mit 0,1 mL Ethanol 96% [V/V] versetzt und unter permanentem Rühren auf einer Magnetrührplatte (400 – 500 U/min) tropfenweise 4,0 mL einer 40-%igen [m/V] PEG 4000-Lösung zugegeben. Die erhaltenen Nanopartikel wurden durch die Zugabe von 182 µL Glutaraldehyd (entsprechend einem Quervernetzungsgrad von 350%) quervernetzt. Anschließend wurde die Suspension über 12 h gerührt, um die Ausbildung eines stabilen Kolloidsystems zu ermöglichen. Es folgte die Aufreinigung und Charakterisierung des Kolloidsystems.

2.9.2. Aufreinigung und Charakterisierung hergestellter Nanopartikel

Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgte durch 5-maliges Zentrifugieren von jeweils 2,0 mL der Suspension für 30 min (20817 g, 35 °C) bei erster Zentrifugation und 15 min für alle folgenden Zentrifugationsschritte mit anschließendem Resuspendieren des Pellets im Ultraschallbad in 1,0 mL gereinigtem Wasser. Die gewaschenen Ansätze wurden vereinigt und bezüglich Partikelgröße und Polydispersität mit einem Malvern Zetasizer 3000 HSA charakterisiert. Der Gehalt wurde mittels Mikrogravimetrie bestimmt (siehe auch 2.7.2).

2.9.3. Abhängigkeit vom PEG-Volumen

Das beschriebene Herstellungsprotokoll wurde mit PEG-Volumina von 2, 3 und 4 mL einer 40-%igen [m/V] Polyethylenglykol-Lösung (PEG 4000) durchgeführt um Einflüsse des PEG-Volumens auf die Desolvatation zu

untersuchen. Anschließend erfolgten Aufreinigung und Charakterisierung der entstandenen Partikel wie beschrieben (siehe 2.9.2).

2.9.4. pH-Abhängigkeit der PEG-HSA-Desolvatation

Zur Untersuchung von pH-Einflüssen auf die Desolvatation von HSA durch PEG 4000, wurde die HSA-Lösung vor Zugabe von 4,0 mL 40-%iger PEG-Lösung auf pH 5,8, 6,0, 6,1, 6,2 oder 7,2 eingestellt. Anschließend erfolgten die Desolvatation, Aufreinigung und Charakterisierung wie in den Abschnitten 2.9.1 und 2.9.2 beschrieben.

2.9.5. Nachweis von PEG-Rückständen im Waschüberstand

Zum Nachweis der vollständigen Auswaschung ungebundener PEG-Anteile wurden die Waschüberstände der beschriebenen Aufreinigungsschritte auf PEG-Rückstände untersucht.

Dazu wurden bei der in Abschnitt 2.9.2 beschriebenen Aufreinigung vor Resuspendieren des Partikelpellets (gebildet durch Zentrifugation von 2 mL der desolvatisierten Lösung) in jedem Aufreinigungsschritt 300 µL des Überstandes entnommen und der PEG-Gehalt mittels HPLC bestimmt.

Die Quantifizierung erfolgte auf einer Merck-Hitachi HPLC Anlage mit einer PSS SUPREMA-Säule und einer PSS SUPREMA-Vorsäule.

Die chromatographische Trennung wurde bei einer Flussrate von 1,0 mL/min und Raumtemperatur durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus einer 0,05 M wässrigen Natriumnitrat-Lösung mit 10% Acetonitril. Die Detektion erfolgte anhand des Brechungsindex und wurde mittels der Kontron PC Integration Pack Software ausgewertet. Für die graphische Darstellung (siehe Abbildung 18) wurde der prozentuale PEG-Gehalt, ausgehend vom theoretischen Anfangsgehalt von 320 mg/mL PEG 4000 in der Ausgangslösung berechnet.

2.9.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Transmissions-elektronenmikroskop erfolgte die Herstellung der PEG-desolvatisierten HSA-Nanopartikel gemäß den in Abschnitt 2.9.1 beschriebenen Parametern. Die Partikel wurden zu 350% quervernetzt. Die Versuche und alle notwendigen Vorbereitungen (siehe 2.7.7) wurden von Frau Anja Zensi am Institut für Pharmazeutische Technologie (Goethe Universität, Frankfurt) durchgeführt.

2.9.7. Inkorporierung mittels PEG-HSA-Desolvatation

Die Inkorporierung wurde durch Desolvatation von HSA mittels Polyethylenglykol durchgeführt. Hier wurde jedoch statt 100 μ L Ethanol 96% [V/V] (siehe 2.9.1) dasselbe Volumen mTHPC-Lösung vor der Desolvatation zugegeben. Dabei wurde die mTHPC-Konzentration so gewählt, dass die vorgelegte HSA-Lösung die in Tabelle 13 (siehe unter Ergebnisse und Diskussion) beschriebenen Endkonzentrationen des Photosensibilisators erreichte.

2.10. Kovalente Bindung von Photosensibilisatoren

2.10.1. Herstellung von Photosensibilisator-HSA-Konjugaten

Zur kovalenten Bindung der Photosensibilisatoren mTHPP-COOH und mTHPC an gelöstes HSA wurden 10 mg des Proteins in 1 mL einer hydroethanolischen Lösung des Arzneistoffs (1 mg/mL in Ethanol 34,4% [V/V]) gelöst und unter Verwendung des Reaktionsvermittlers 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) umgesetzt. Das Carbodiimid wurde in einem 5-fachen molaren Überschuss, berechnet auf die Arzneistoffkonzentration, zugegeben. Nach 60 min Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µL einer wässrigen Hydroxylaminlösung mit 125 mg/mL abgebrochen.

2.10.2. Voruntersuchungen zur kovalenten Bindung

Für die Charakterisierung der Konjugate wurden die Reaktionsansätze durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert, um große Aggregate unter den Reaktionsprodukten abzutrennen und anschließend 0,450 mL der entstandenen Lösung auf eine D-SaltTM Dextran Größenausschlusssäule gegeben. Als Eluent diente jeweils 1 mL Ethanol 34,3% [V/V]. Insgesamt wurden 9 solche Fraktionen gesammelt und photometrisch bei 512 nm, 420 nm und 280 nm gemessen um sowohl enthaltene Proteinanteile, als auch den enthaltenen Photosensibilisator zu bestimmen.

Anschließend wurden die Fraktionen mittels Gelpermeationschromatographie analysiert. Dazu wurden 30 µL der vierten und fünften Fraktion, welche den größten Anteil des Arzneistoffs enthielten, bei einer Flussrate von 1 mL/min in ein Agilent 1200 SEC/GPC System eingespritzt und auf einer PSS Proteoma Säule getrennt. Als mobile Phase diente PBS 6,6 (konserviert mit 0,01% Natriumazid), die Detektion erfolgte mittels eines Agilent UV/VIS-Detektors bei 280 bzw. 420 nm.

Spätere Untersuchungen, welche die Bindung von mTHPC und mTHPP-COOH an gelöstes HSA einschlossen, wurden auf einem Merck-Hitachi HPLC System durchgeführt. Die Proben wurden hierbei bei einer Flussrate von 1 mL/min auf einer PSS Biosep SEC S-3000-Säule analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines Dioden Array Detektors bei 200-550 nm.

2.10.3. Kovalente Bindung von mTHPP-COOH an HSA-Nanopartikel

a) Bindungsreaktion unter Verwendung eines Magnetrührsystems

Zur kovalenten Bindung des Photosensibilisators wurden 10 mg der leeren HSA-Nanopartikel (siehe 2.7.1) in hydroethanolischer Lösung mit mTHPP-COOH umgesetzt (1 mg/mL in Ethanol 52,2% [V/V]). Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 2,5-fachen, 5-fachen bzw. 10-fachen molaren Überschusses des Crosslinkers 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid gestartet und nach 60 min durch Zugabe von 500 µL einer wässrigen Hydroxylamin-Lösung (125 mg/mL) beendet. Die Partikel wurden durch 5-faches Zentrifugieren (16100 g, 8 min) und Redispergieren des Pellets aufgereinigt. Die ersten beiden Aufreinigungsschritte erfolgten in Ethanol, alle übrigen in gereinigtem Wasser.

Die gewaschenen Ansätze wurden bezüglich Partikelgröße und Polydispersität mit einem Malvern Zetasizer 3000 HSA charakterisiert und der Gehalt mittels Mikrogravimetrie bestimmt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Arzneistoffes (siehe 2.10.6).

b) Bindungsreaktion unter Verwendung eines Flügelrührsystems

Da bei Verwendung eines Magnetrührers in einigen Fällen die Polydispersität der Proben stark anstieg, wurde das Gerät Nanopaddle I (siehe Abbildung 5) für die Bindungsreaktion erprobt. Die Drehgeschwindigkeit des Rührers wurde mittels eines Handtachometers auf eine Geschwindigkeit von 200 U/min eingestellt. Die Messung erfolgte aus einem Abstand von 10 cm.

2.10.4. Kovalente Bindung von mTHPC an HSA-Nanopartikel

Nach erfolgreicher Bindung von mTHPP-COOH an HSA-Nanopartikel unter Verwendung des Crosslinkers EDC wurde in einem weiteren Schritt die Bindung des Phenols mTHPC an HSA-Nanopartikel untersucht.

Die Reaktionsbedingungen entsprachen den für mTHPP-COOH gewählten Parametern. Auf eine Untersuchung der Bindungsreaktion unter Verwendung des Flügelrührsystems wurde verzichtet.

2.10.5. Zeitabhängigkeit der kovalenten Bindung

Um die Zeitabhängigkeit der Bindungsreaktionen beider Arzneistoffe zu untersuchen wurden die Photosensibilisatoren mTHPP-COOH und mTHPC in Gegenwart eines 10-fachen molaren Überschusses des Crosslinkers EDC an HSA-Nanopartikel gebunden. Die Reaktion wurde nach 60, 90, 180 und 300 min durch Zugabe von 500 μ L einer Hydroxylaminlösung abgebrochen und die Partikel wie beschrieben charakterisiert. Alle übrigen Bedingungen entsprachen den bereits beschriebenen Parametern (siehe 2.10.3).

2.10.6. Direktbestimmung von Photosensibilisatoren

Für die Direktbestimmung von mTHPP-COOH und mTHPC in wässriger Nanopartikelsuspension nach kovalenter Bindung an HSA-Nanopartikel ist eine enzymatische Spaltung der Partikel mittels Pepsin mit anschließender basischer Hydrolyse der durch die EDC-Reaktion vermittelten Bindung erforderlich.

Dazu wurden 10 mg Pepsin in 1 mL einer wässrigen HCl-Lösung (0,1 M) gelöst. Nach Bestimmung des Nanopartikelgehalts wurde das Volumen der Suspension, welches 1 mg Nanopartikeln entspricht, mit 250 μ L Pepsin-Lösung versetzt und das Gemisch mit gereinigtem Wasser auf 500 μ L aufgefüllt. Die Proben wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 μ L einer wässrigen NaOH-Lösung (1 M) zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL Ethanol 96% [V/V] konnte der

Gehalt photometrisch bei 518,2 nm (mTHPP-COOH) bzw. 517 nm (mTHPC) ermittelt werden.

2.10.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wie auch die notwendigen Vorbereitungen wurden von Frau Karin Possemeyer am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität (Münster, Deutschland) durchgeführt.

Ein Volumen von 20 μL der zuvor hergestellten Partikelsuspension (siehe oben) wurde auf einen Millipore VSWP 0,025 μm Membranfilter gegeben und über 4 h im Exsiccator getrocknet. Der Membranfilter wurde mit Gold bedampft. Unter gleichen Bedingungen wurde das gleiche Volumen gereinigten Wassers vorbereitet und diente als Kontrolle. Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden in einem CamScan CS4 Mikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV, einem Abstand von 10 mm und 20000-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.10.8. Gefriertrocknung kovalent modifizierter HSA-Nanopartikel

Die zuvor hergestellten HSA-Nanopartikel mit einem Quervernetzungsgrad von 100% wurden unter Verwendung eines 10-fachen Überschusses an EDC und bei einer Inkubationszeit von 240 min mit mTHPC und mTHPP-COOH beladen.

Die Gefriertrocknung erfolgte in einem Christ Epsilon 1-4 Gefriertrockner. Dazu wurden 5 mg der beladenen Nanopartikel in 1,0 mL einer 3%-igen Saccharose-Lösung [m/V] suspendiert. Kontrollproben gleicher Zusammenstellung, jedoch ohne den Kryoprotektor Saccharose wurden verwendet. Zunächst wurde die Produkttemperatur mit einer Geschwindigkeit von 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von +20 $^{\circ}\text{C}$ auf -40 $^{\circ}\text{C}$ gesenkt. Diese Parameter wurden für 2 h beibehalten und anschließend die Temperatur in einem Zeitintervall von 30 min auf -30 $^{\circ}\text{C}$ erhöht. Mit Evakuierung der Gefriertrocknungskammer auf

1,030 mbar wurde die Primärtrocknung eingeleitet. Nach Erhöhung der Temperatur auf -15°C ($0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) und anschließend auf $+20^{\circ}\text{C}$ begann die Sekundärtrocknung. Diese Parameter wurden für 9,5 h beibehalten und anschließend der Druck auf 0,001 mbar sowie die Temperatur auf $+30^{\circ}\text{C}$ erhöht ($0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Nach 2 h unter den genannten Bedingungen war die Gefriertrocknung beendet.

Die gefriergetrockneten Proben wurden für 1 Tag sowie 3 und 6 Wochen bei Raumtemperatur gelagert und anschließend in 1 mL MQ resuspendiert. Nach einer Wartezeit von 5 min, welche die gleichmäßige Durchfeuchtung der Proben gewährleisten sollte, folgte 5-minütiges Homogenisieren der Proben mittels eines Vortexers. Kontrollproben, welche eine wässrige Suspension der mTHPC-HSA-Nanopartikel bzw. mTHPP-COOH-HSA-Nanopartikel und den Kryoprotektor Saccharose enthielten, wurden bei 4°C gelagert.

Alle Proben wurden nach der definierten Lagerzeit wie beschrieben auf Partikelgröße und Polydispersität charakterisiert (siehe 2.10.3).

2.11. Cetuximab-modifizierte HSA-Nanopartikel

2.11.1. Herstellung Antikörper-beladener Partikel

Nanopartikel aus humanem Serumalbumin wurden wie beschrieben hergestellt (siehe 2.7.1) und anschließend mit dem Antikörper Cetuximab oberflächenmodifiziert.

Eine Masse von 2 mg des kommerziell als Erbitux[®] erhältlichen Antikörpers wurde zunächst über eine D-Salt[™] Dextran Größenausschlusssäule von den Hilfsstoffen der Formulierung gereinigt und die proteinhaltigen Fraktionen photometrisch ermittelt. Anschließend erfolgte die Oberflächenmodifikation der Nanopartikel nach einer in der Literatur für andere Antikörper bereits beschriebenen Methode [32, 88].

Hierzu wurden die zwei proteinhaltigen Fraktionen der Antikörperaufreinigung vereinigt und mit einem 50-fachen molaren Überschuss an Traut's Reagenz (2-Iminothiolan), berechnet auf die ursprünglich eingesetzte Masse des Antikörpers, thioliert. Die Umsetzung erfolgte in Phosphatpuffer pH 8,0 über einen Zeitraum von 2 h bei 20 °C im Thermomixer (600 rpm). Es folgte erneut eine Aufreinigung des Antikörpers über eine Größenausschlusssäule (siehe oben).

Die Partikelsuspension (0,5 mL mit einer Partikelkonzentration 20 mg/mL) wurde für die Anbindung des Antikörpers mit 100,0 µl des heterobifunktionalen Crosslinkers NHS-PEG5000-Mal (44,0 mg in 500,0 µl Phosphatpuffer pH 8,0) aktiviert.

Die aktivierten Partikel wurden durch Zentrifugation (16100 g, 8 min, RT) und Redispergieren in 0,5 mL Phosphatpuffer pH 8,0 aufgereinigt und anschließend mit 0,5 mL einer Lösung des thiolierten Antikörpers (dies entspricht etwa 250 µg Cetuximab) unter permanentem Schütteln über 1 h bei 20 °C umgesetzt. Die Proben wurden anschließend durch Zentrifugation (16100 g, 8 min) und Redispergieren in 0,5 ml gereinigten Wassers aufgereinigt.

2.11.2. Charakterisierung Antikörper-beladener Partikel

Die Quantifizierung des Antikörpers erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie nach einer bereits beschriebenen Methode [14, 32] und wurde auf einem Merck-Hitachi-HPLC-System mit Dioden-Array-Detektor bei 200 bis 500 nm Wellenlänge durchgeführt (siehe auch 2.10.2). Das Einspritzvolumen wurde auf 30 μL erhöht um die Genauigkeit der Bestimmung zu erhöhen.

Die Gesamtmenge des an die Partikeloberfläche gebundenen Cetuximabs wurde aus der Differenz zwischen der Antikörpermenge, die nach Thiolierung und Aufreinigung erhalten wurde, und der im Überstand detektierten Menge des ungebundenen Antikörpers nach der Konjugation berechnet. Eine Charakterisierung hinsichtlich Partikelgröße, Polydispersität und Partikelgehalt erfolgte wie beschrieben (siehe 2.7.2).

2.11.3. Herstellung Antikörper-beladener Arzneistoffträgersysteme

Die Antikörperbindung wurde ebenfalls mit mTHPC-HSA-Nanopartikeln durchgeführt. Hierbei wurde das Protokoll überarbeitet und eine Gesamtmasse von 5 mg der kovalent modifizierten mTHPC-HSA-Nanopartikel mit derselben Menge des heterobifunktionalen Crosslinkers (siehe oben) und 125 μg des Antikörpers umgesetzt. Alle Arbeiten wurden wie in Abschnitt 2.11.1 beschrieben durchgeführt.

2.11.4. Charakterisierung Antikörper-beladener Arzneistoffträgersysteme

Die Charakterisierung Antikörper-beladener mTHPC-HSA-Nanopartikel wurde analog den konjugierten Leerpartikeln durchgeführt. Der Arzneistoffgehalt wurde vor der Antikörperbindung nach enzymatischem Abbau des Partikelsystems und Hydrolyse der Amidbindung bestimmt.

2.11.5. „Labeling“ von mTHPC-HSA-Nanopartikeln mit 5-TAMRA

Für das Aufbringen des Fluoreszenzfarbstoffs 5-TAMRA auf mTHPC-HSA-Nanopartikel wurden 5 mg des kovalent modifizierten Trägersystems in Aceton resuspendiert. Nach Hinzufügen von 100 µL einer Lösung mit 0,5 mg/mL von 5-Carboxytetramethylrhodamin-Succinimidylester (5-TAMRA-NHS-Ester) in Aceton wurden die Proben für eine Dauer von 3 h inkubiert und anschließend abzentrifugiert (16100 g, 8 min, RT). Der ungebundene Anteil des „Labels“ wurde photometrisch bei 550 nm aus dem Überstand bestimmt. Die Aufreinigung erfolgte anschließend durch Resuspendieren in Aceton (2 Aufreinigungsschritte) und gereinigtem Wasser (2 Aufreinigungsschritte).

2.12. *In vitro*-Charakterisierung

Alle photophysikalischen Untersuchungen sowie ein Teil der Zellkulturergebnisse (Messungen in Jurkat-Zellen), wurden an der Humboldt-Universität Berlin (Institut für Physik, Abteilung Photophysik) von Herrn Kuan Chen und Frau Annegret Preuss unter der Leitung von Frau Prof. Beate Röder durchgeführt.

Die übrigen Ergebnisse aus der Zellkultur entstanden im Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT, St. Ingbert, Saarland). Die Versuche wurden dort von Frau Karin Löw unter der Leitung von Prof. Dr. Hagen von Briesen durchgeführt.

2.12.1. Zubereitungen für die *in vitro*-Untersuchung

Die photophysikalische Charakterisierung sowie alle Experimente in Jurkat-Zellen wurden mit HSA-Nanopartikeln mit einem Quervernetzungsgrad von 40% - 200% durchgeführt, welche in Gegenwart von 0,75%, 1,5% und 2,0% gelöstem HSA adsorptiv mit Photosensibilisator beladen wurden (siehe 2.7.4).

Die Antikörper-modifizierten Nanopartikel wurden wie beschrieben mit Cetuximab konjugiert und der Antikörpergehalt aus den Partikelüberständen nach der Aufreinigung bestimmt.

Alle Zubereitungen lagen in wässriger Suspension vor. Eine Partikelgröße zwischen 150 und 300 nm sowie ein Polydispersitätsindex $< 0,1$ dienten als Spezifikationen für die Verwendung.

2.12.2. Photophysikalische Charakterisierung

Die photophysikalische Charakterisierung wurde an der Humboldt-Universität Berlin durchgeführt und wird in der Publikation „*Photosensitizer loaded HSA nanoparticles I: Preparation and photophysical properties*“ [82] umfassend erläutert. Die Absorptionsspektren wurden auf einem Shimadzu

Spektrophotometer bei Raumtemperatur bestimmt. Die „*Fluorescence Life Time*“-Messung (FLIM) erfolgte mittels „*Time-Correlated Single-Photon Counting*“ (TCSPC). Die Singulett-sauerstoff-Lumineszenz wurde mittels eines stickstoffgekühlten Germanium-Dioden-Detektors bestimmt. Die Konzentration der Photosensibilisatoren betrug in allen Versuchen 8 μM . Für die reinen Arzneistoffe mTHPP, mTHPC und die in der Literatur bereits beschriebene Referenz [89] Pheophorbid A wurden die Messungen in Ethanol durchgeführt. Die Singulett-sauerstoff-Lumineszenz der mTHPP- und mTHPC-beladenen Nanopartikel wurde in D_2O bestimmt, wobei Rose Bengal in D_2O als Referenz diente [89].

2.12.3. Singulett-sauerstoffmessung in Jurkat-Zellen

Für die Bestimmung der Singulett-sauerstoff-Ausbeute wurden zunächst Jurkat Zellen mit mTHPP, mTHPC sowie mTHPP- und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln inkubiert. Die Arzneistoffkonzentration wurde jeweils auf 3 μM eingestellt und die Zellen für 5 h bei 37 °C inkubiert [90]. Nach Inkubation wurden die Zellen geerntet und gezählt. Die Messung der Singulett-sauerstoff-Lumineszenz wurde nach einer neuartigen, in der Literatur beschriebenen Methode [83, 84], basierend auf dem „*Time Correlated Multi Photon Counting*“ (TCMPC) durchgeführt und ist ebenfalls Gegenstand der genannten Publikation (siehe auch 2.12.2) [82].

3. Ergebnisse und Diskussion

Eine Vielzahl von Nebenwirkungen heute verwendeter Arzneimittel werden von ungünstigen physikochemischen Eigenschaften sowie einer unvorteilhaften Körperverteilung hervorgerufen [91]. Nanopartikuläre Trägersysteme können durch Beeinflussung dieser Parameter deutlich zur Verbesserung von Verträglichkeit und Effizienz moderner Tumorthérapien beitragen [92, 93].

Im Vordergrund der vorliegenden Untersuchungen stand die Entwicklung eines Albumin-basierten, nanopartikulären Trägersystems, welches hochpotente Wirkstoffe für die Photodynamische Therapie zum Wirkort transportieren soll.

Um dieses Ziel umzusetzen sollten verschiedene Grundprinzipien der pharmazeutischen Nanotechnologie Anwendung finden. Die Bindung an ein kolloidales Trägersystem kann hierbei einerseits durch adsorptive oder kovalente Bindung des Arzneistoffs an die Oberfläche des nanopartikulären Trägers oder andererseits durch Einbettung des Arzneistoffs in die Partikelmatrix erfolgen [1, 92].

Verschiedene Arzneistoffe wurden unter Verwendung dieser Strategien in der Vergangenheit erfolgreich in ihre kolloidalen Formulierungen überführt [32, 94, 95] und 2008 wurde mit Abraxane[®] auch erstmals ein albuminbasiertes Trägersystem von der EMA zugelassen.

Humanes Serumalbumin besitzt als physiologisches Carrierprotein des menschlichen Organismus ideale Voraussetzungen, da es einerseits durch seine Struktur nur wenig Angriffspunkte für immunologische Reaktionen bietet [23] und sich andererseits bereits in früheren Untersuchungen als effiziente Trägermatrix für schwerlösliche Arzneistoffe erwiesen hat [88]. Im Hinblick auf die Untersuchung des entwickelten Nanocarriers *in vitro* wie *in vivo*, sollte anschließend die Spezifität des Trägersystems durch Aufbringen eines Liganden auf die Partikeloberfläche weiter gesteigert werden.

Albumin bietet ein breites Portfolio an funktionellen Gruppen, welche auch nach der Fällung durch Desolvatation und anschließende Quervernetzung eines Teils der Aminogruppen verschiedene Oberflächenmodifikationen zulassen [20, 32, 88, 96].

3.1. Physikochemische Charakterisierung von Photosensibilisatoren

Am Anfang der Entwicklung stand die physikochemische Charakterisierung der eingesetzten Photosensibilisatoren. Hierbei sollten sowohl die galenischen als auch die analytischen Möglichkeiten untersucht werden.

Die der Adsorption wie auch der Inkorporierung zugrunde liegenden Prozesse hängen wesentlich von Löslichkeit und Stabilität des Photosensibilisators im umgebenden Medium ab, weshalb erste Untersuchungen zum Ziel hatten, geeignete Lösungsmittel für die Umsetzung des Arzneistoffs mit dem Trägersystem zu finden.

3.1.1. Löslichkeitsuntersuchung in Ethanol

In der Literatur sind Untersuchungen zum Löslichkeitsverhalten des Photosensibilisators mTHPC in Methanol-Wasser-Gemischen zu finden, welche daher geeignet erschienen die Polarität des Lösungsmittels für eine Optimierung der Adsorption anzupassen [97]. Aufgrund der geplanten parenteralen Verwendung schien es jedoch ratsam für die anschließenden Versuche hydroethanolische Medien zu verwenden, welche toxikologisch unbedenklich sind und gleichzeitig eine Einschätzung der Löslichkeit unter den Bedingungen der ethanolischen Desolvatation [13] erlauben. Die Löslichkeit der Photosensibilisatoren in Ethanol wurde dazu mittels Filtrationsversuchen bestimmt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Prozentualer Gehalt verschiedener Photosensibilisatoren nach Filtration bezogen auf den gemessenen 100%-Wert vor Filtration (Mittelwert \pm Standardabweichung; n=3).

Photosensibilisator	Wiederfindung [%]	Gehalt [mg/mL]
mTHPP	91,42% \pm 2,73	4,57 \pm 0,14 mg/mL
mTHPC	93,36% \pm 4,41	4,67 \pm 0,22 mg/mL
mTHPP-COOH	100,84% \pm 5,45	5,04 \pm 0,27 mg/mL

Es konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 5 mg/mL des jeweiligen Photosensibilisators in Ethanol 96% [V/V] eine stabile Lösung

ergab. Die Wiederfindung lag bei nahezu 100% für alle verwendeten Arzneistoffe. Eine Übersättigung der Lösung wurde nicht beobachtet.

Tabelle 2: Löslichkeit verschiedener Photosensibilisatoren in Ethanol 55,0% und 62,3% [V/V] bezogen auf den gemessenen 100%-Wert vor Filtration (Mittelwert \pm Standardabweichung; n=3).

Photosensibilisator	Löslichkeit [mg/mL]
mTHPP in Ethanol 62,3%	> 1 mg/mL
mTHPC in Ethanol 62,3%	> 1 mg/mL
mTHPP in Ethanol 55,0%	0,27 \pm 0,01 mg/mL
mTHPC in Ethanol 55,0%	0,05 \pm 0,01 mg/mL

Für die Adsorptionsversuche wurden zudem Löslichkeiten von mTHPP und mTHPC in Ethanol 62,3% [V/V] und Ethanol 55,0% [V/V] bestimmt. In Ethanol 62,3% war die eingesetzte Konzentration von 1 mg/mL für beide Arzneistoffe vollständig löslich. Es stellte sich daher bei dieser Konzentration keine Sättigung ein, welche für die Bestimmung der Sättigungskonzentration erforderlich ist. In Ethanol 55,0% [V/V] wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Löslichkeiten bestimmt.

3.1.2. Löslichkeitsuntersuchung in HSA-stabilisierter Lösung

Für den Photosensibilisator mTHPC wurde die Bindung an verschiedene Plasmaproteine bereits in der Literatur beschrieben [98-100]. Die Komplexbildung des Arzneistoffs durch bovines Serumalbumin (BSA), ließ auch auf eine hohe Affinität zu humanem Serumalbumin (HSA) hoffen.

Um die adsorptive Bindung zu optimieren sollte ein hydroethanolisches Medium verwendet werden, in welchem der Arzneistoff nur unzureichend löslich ist, um anschließend die Löslichkeit durch Zusatz von HSA zu verbessern. Ein Ethanolgehalt von 34,3% [V/V] verhindert einerseits eine ungewollte Desolvatation des Proteins und ist andererseits so gering gewählt,

dass bei der gewählten Arzneistoffkonzentration von 0,15 mg/mL eine Übersättigung eintritt.

Es wurden steigende HSA-Konzentrationen eingesetzt und anschließend die Wiederfindung der Photosensibilisatoren photometrisch aus dem Überstand bestimmt.

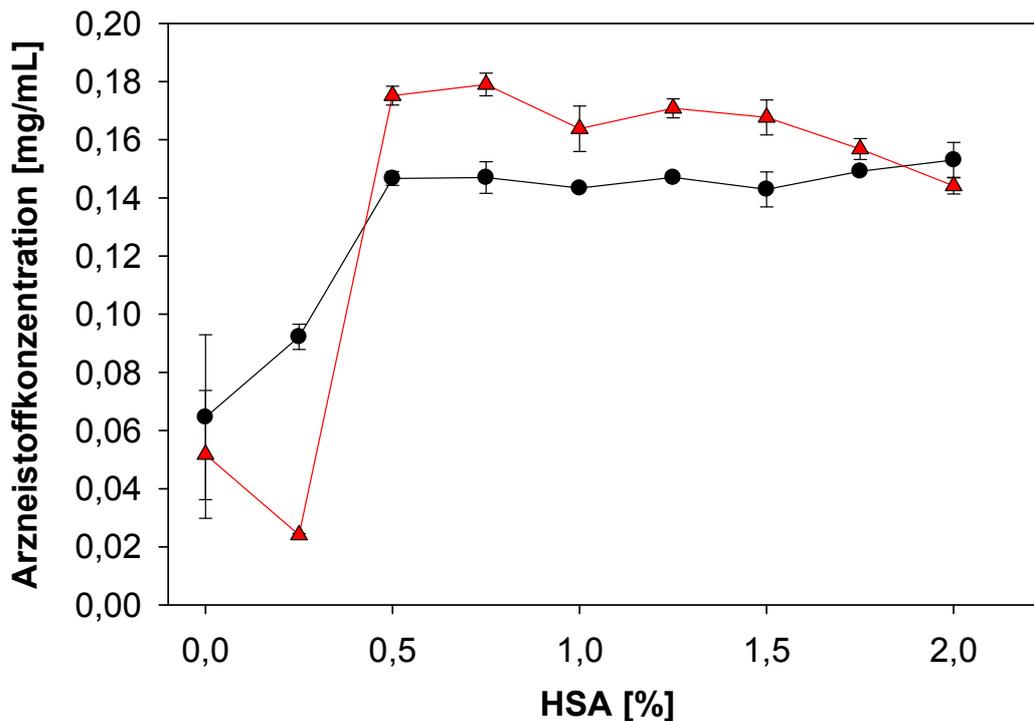


Abbildung 3: Wiedergefundene Arzneistoffkonzentration von mTHPP (—●—) und mTHPC (—▲—) in Ethanol 34,3% [V/V] unter Zusatz von 0,0 - 2,0% HSA (Mittelwert ± Standardabweichung; n=3).

Wie aus Abbildung 3 hervorgeht war eine Konzentration von 0,5% [m/V] des Proteins erforderlich, um die Arzneistofflösung über 24 h (und zweistündiger Zentrifugation) zu stabilisieren. Bei dieser oder höheren HSA-Konzentrationen war die Wiederfindung von mTHPC und mTHPP bei 100%, ohne dass sich Anzeichen einer Präzipitation zeigten.

3.1.3. Stabilität gegenüber Glutaraldehyd

Die Herstellung von HSA-Nanopartikeln nach dem Desolvationsverfahren bedient sich des Glutaraldehyds als Crosslinker, welches die gebildeten

Nanopartikel nach Abschluss der Desolvation quervernetzt und damit zu einer Stabilisierung des Kolloidsystems beiträgt [13, 19, 43].

Die Inkorporierung von Arzneistoffen in die Partikelmatrix wird üblicherweise zwischen pH 6 und 9 durch Desolvation in Gegenwart des Arzneistoffes mit anschließender Quervernetzung durchgeführt [94].

Es war daher notwendig die Stabilität der Photosensibilisatoren unter diesen Bedingungen zu untersuchen, um die Inkorporierung vorzubereiten. Alle eingesetzten Arzneistoffe wurden dazu bei pH 6, 7 und 9 in Gegenwart eines hohen Überschusses Glutaraldehyd inkubiert und anschließend mittels HPLC untersucht.

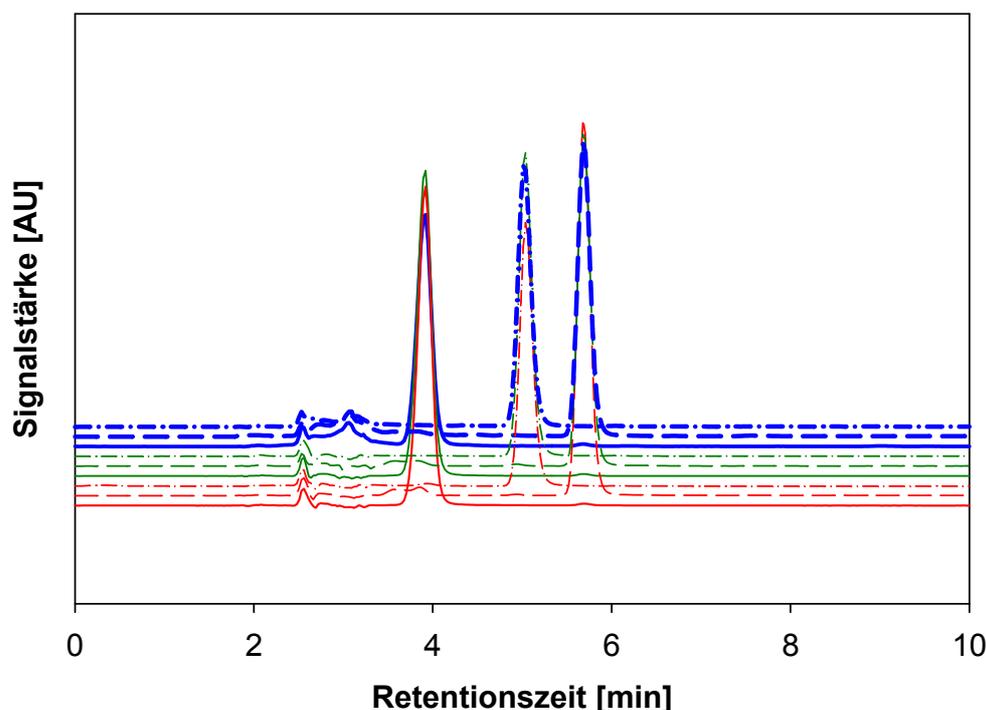


Abbildung 4: HPLC-Chromatogramme von mTHPP (—), mTHPC(– –) und mTHPP-COOH (– • –) in Acetonitril / Trifluoressigsäure 0,1% nach 24 h Inkubation mit Glutaraldehyd bei den pH-Werten 6 (■), 7 (■) und 9 (■), Detektionswellenlänge 420 nm.

Die Photosensibilisatoren zeigten ohne Vorbehandlung mit dem Crosslinker einen einzigen scharfen Peak im Chromatogramm (siehe Abbildung 4).

Bei der Umsetzung bei pH 9 war jedoch ein weiterer, breiter Peak mit kürzerer Retentionszeit zu erkennen, während die Peakfläche des Arzneistoffes in

gleichem Maße abnahm (siehe Abbildung 4, Blau). Dies weist auf eine Veränderung des Photosensibilisators durch den Quervernetzer oder den pH-Wert der Lösung hin.

So konnte gezeigt werden, dass eine Desolvatation in Gegenwart des Arzneistoffes nur bei niedrigeren pH-Werten erfolgen sollte. Bei pH 9 kommt es offensichtlich zu einer Veränderung des Farbstoffmoleküls.

3.2. Adsorptive Bindung von Photosensibilisatoren

Erste Schritte dienten der Adsorption der Photosensibilisatoren mTHPP und mTHPC an ein bestehendes Partikelsystem aus humanem Serumalbumin.

Zur Umsetzung dieses Prinzips erfolgt zunächst die Herstellung eines Kolloidsystems aus der Trägermatrix, an welches im zweiten Schritt der Arzneistoff adsorbiert werden sollte. HSA-Nanopartikel mit einem Partikeldurchmesser zwischen 150 und 300 nm und einem Polydispersitätsindex $<0,1$ wurden durch ethanolische Desolvation hergestellt. Für Partikel dieser Größe wurde eine erhöhte Anreicherung in Tumorgewebe infolge des „*Enhanced Permeability and Retention*“-Effekts, kurz EPR-Effekts (siehe auch 1.2.7), beschrieben [49, 50, 101].

Bei der adsorptiven Bindung stellt sich hierbei ein Verteilungsgleichgewicht zwischen dem umgebenden Medium und der lipophilen Oberfläche des Kolloids ein, was zu einer Anreicherung des Wirkstoffs am Partikelsystem führt [33, 94].

3.2.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln

Die Herstellung von unbeladenen HSA-Nanopartikeln durch Desolvation ist ein etabliertes Verfahren und wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Dem Protein wird hierbei durch Zutropfen von Ethanol die Lyosphäre entzogen, und es kommt zu einer kontrollierten Präzipitation des Makromoleküls, welche mit einer Lipophilisierung der Oberflächenstruktur des Polymers einhergeht.

Nach Stabilisierung des Kolloidssystems mit Glutaraldehyd ist diese Strukturänderung irreversibel [19], wodurch die anschließende Adsorption des Arzneistoffs auch in Medien mit deutlich verringertem Ethanolgehalt durchgeführt werden kann.

Für Größe und Größenverteilung des entstehenden Kolloidsystems sind hierbei die Abstoßungskräfte der HSA-Moleküle von entscheidender Bedeutung. Diese werden u.a. durch pH, Ionenstärke und Durchmischung der Lösung beeinflusst [13, 19, 43].

Im Labormaßstab wird zur Durchmischung während der Desolvatation meist ein Magnetrührer verwendet, ein Verfahren, welches sich jedoch nur schlecht für die industrielle Produktion in großen Maßstäben eignet. Es wurden daher auch zwei eigens für diesen Zweck konstruierte Flügelrührer eingesetzt (siehe Abbildung 5), welche eine Vergrößerung der hergestellten Partikelchargen ermöglichen sollte.

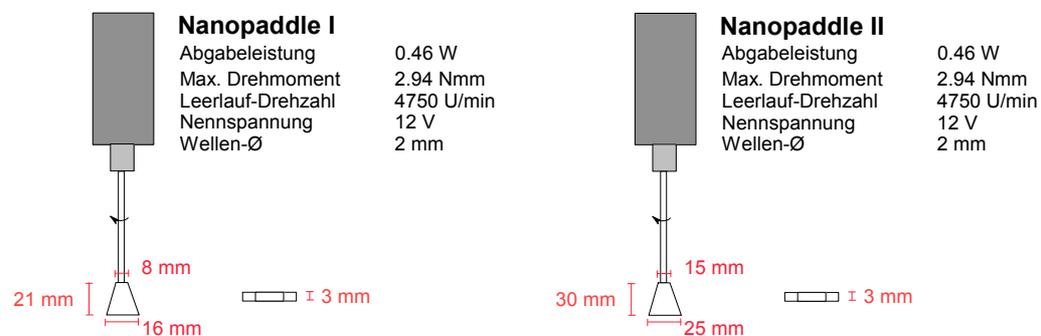


Abbildung 5: Schematische Darstellung der verwendeten Flügelrührer.

In Abbildung 6 sind Partikelgrößen und Polydispersitätsindices der hergestellten Partikelchargen aufgeführt. Alle übrigen Parameter der Herstellung waren dem Standardverfahren identisch, es wurden lediglich unterschiedliche Rührsysteme für die Herstellung verwendet.

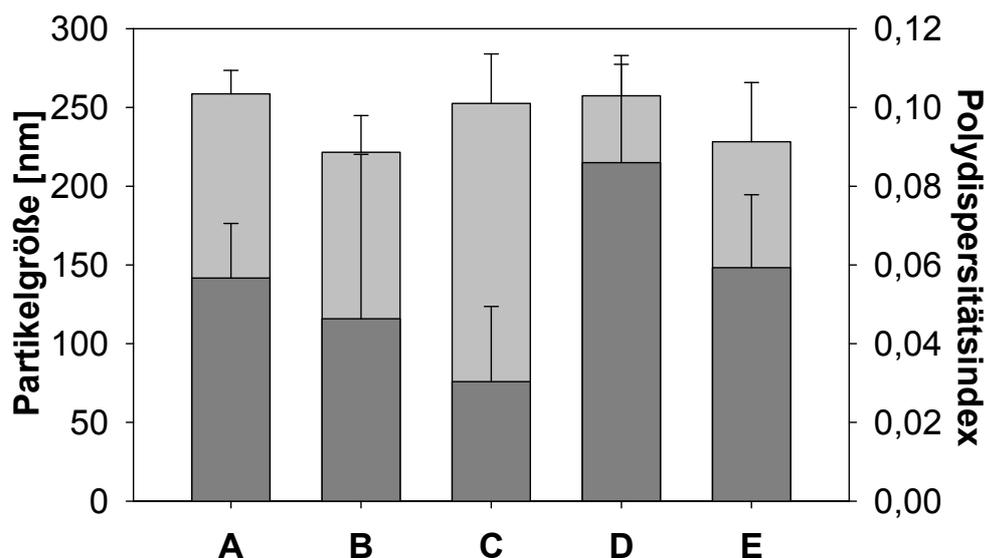


Abbildung 6: Partikelgröße (■) und Polydispersität (■) bei Herstellung von HSA-Nanopartikeln nach dem Standardverfahren/10 mL (A), mit dem Nanopaddle I / 20 mL (B) und mit dem Nanopaddle II (C) / 20 mL (D) / 100 mL (E). (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n=3$)

Es zeigte sich im Vergleich zur Standardmethode kein signifikanter Unterschied in Partikelgröße oder Polydispersitätsindex bei Gesamtvolumina zwischen 10 und 100 mL (siehe Abbildung 6), wodurch belegt werden konnte, dass die ethanolische Desolvatation auch mittels eines Flügelrührsystems und bei größeren Volumina durchführbar ist.

3.2.2. Voruntersuchungen zur adsorptiven Bindung

Erste Voruntersuchungen zur adsorptiven Arzneistoffbindung wurden zunächst mit dem Porphyrinderivat mTHPP in hydroethanolischer Lösung durchgeführt, wobei eine Optimierung der Adsorption durch Einstellung der Polarität des Inkubationsmediums erfolgen sollte.

Die Untersuchung in Ethanol 55,0% [V/V] zeigte eine steigende Beladung des Partikelsystems von $19,14 \pm 7,33$ auf $30,81 \pm 15,02$ μg Photosensibilisator pro mg HSA bei steigender Konzentration des Arzneistoffs. Dieser wurde in 15- bis 60-fachem, molarem Überschuss (berechnet auf die molare Menge HSA in der eingesetzten Partikelmasse) zugegeben.

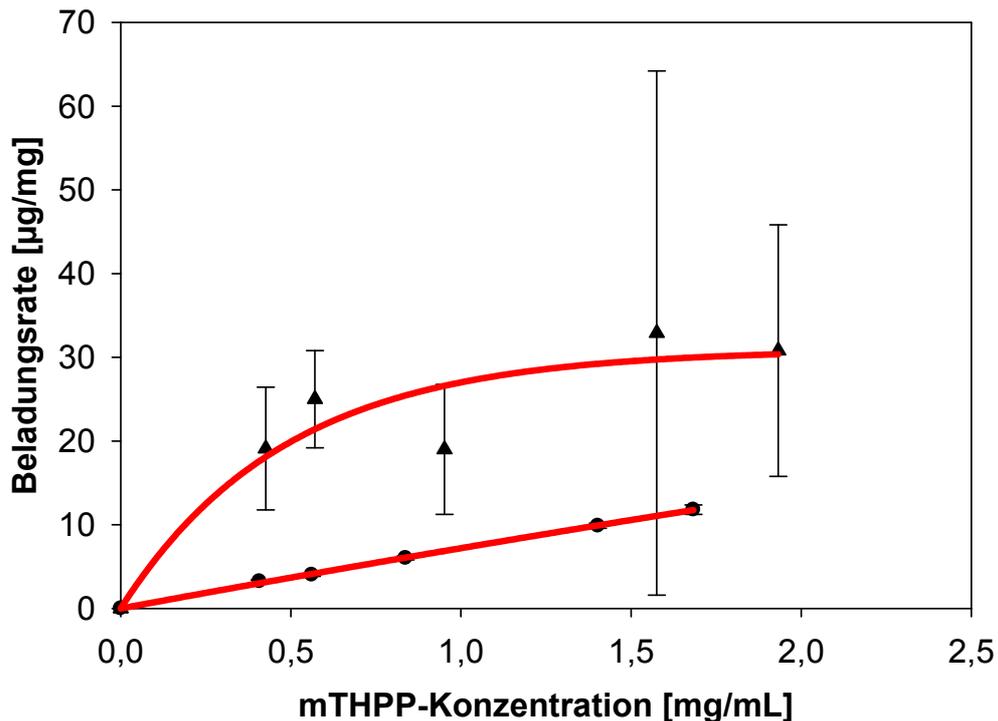


Abbildung 7: Freundlich-Isotherme (rot) zur Adsorption von mTHPP an HSA-Nanopartikel in Ethanol 55,0% [V/V] (\blacktriangle) und Ethanol 62,3% [V/V] (\blacksquare). (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n=3$)

Relevant für die Beurteilung der Effizienz ist auch die prozentuale Beladung, welche bei zunehmender mTHPP-Konzentration von 18,34% auf 7,38% abfiel.

Eine weitere Bindungsstudie in Ethanol 62,3% [V/V] zeigte eine wesentlich geringere Beladung des Kolloidsystems (siehe Abbildung 7), was sich durch die Lipophilie des umgebenden Mediums und das veränderte Verteilungsgleichgewicht erklären lässt.

Die prozentuale Beladung war ebenfalls deutlich niedriger als die des hydrophileren Inkubationsmediums. Die Sorption des Arzneistoffs an die Partikeloberfläche kann durch die Freundlich-Isotherme beschrieben werden (siehe Abbildung 7). Diese Darstellung berücksichtigt, dass bei stärkerer Beladung der Sorptionsoberflächen des Sorbenten weniger Sorbat aufgenommen werden kann. Es fällt auf, dass die Beladungsrate insbesondere in Ethanol 55,0% [V/V] stark variiert, sich jedoch gleichzeitig eine deutliche Sättigung des Kolloids im Sinne der Freundlich-Isotherme zeigt. Eine solche Deutung der Ergebnisse stellte sich jedoch als problematisch dar.

Im Verlauf der Adsorptionsstudien trat bei höheren Konzentrationen optisch erkennbare Präzipitation des Arzneistoffes auf und gab Anlass für eine Löslichkeitsuntersuchung des Photosensibilisators mTHPP in den verwendeten Inkubationsmedien. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergaben, dass die Löslichkeit von mTHPP in Ethanol 55,0% etwa bei 0,05 mg/mL liegt (siehe auch 3.1.1.)

Es kann daher angenommen werden, dass die gezeigte Beladungssteigerung (siehe Abbildung 7) durch Erhöhung der Arzneistoffkonzentration vom Ausfallen des Arzneistoffs begleitet wird. Das Kolloidsystem weist in diesem Fall Instabilität auf und es ist von der Bildung einer polyformen und polydispersen Suspension auszugehen.

3.2.3. Albumin-vermittelte, adsorptive Bindung an HSA-Nanopartikel

Für die Entwicklung einer stabilen nanopartikulären Formulierung der untersuchten Photosensibilisatoren, wurden verschiedene Hilfsstoffe erprobt. In der Literatur ist die Komplexierung von mTHPC mit bovinem Serumalbumin (BSA) beschrieben [98, 100], wodurch eine molekulardisperse Verteilung des Arzneistoffes erreicht werden kann. In den gezeigten Löslichkeitsuntersuchungen wurde nachgewiesen, dass bei einer Arzneistoffkonzentration von 0,15 mg/mL mTHPC bzw. mTHPP in Ethanol 34,3% [V/V] eine Konzentration von mindestens 0,5% [m/V] gelöstem HSA erforderlich ist um das Inkubationsmedium zu stabilisieren. Es wurden daher Adsorptionsversuche mit mTHPP und mTHPC in Gegenwart von 0,75-2,0% [m/V] gelöstem HSA durchgeführt. Zur Charakterisierung der entstandenen Partikelsysteme wurden Größe, Polydispersitätsindex, Zetapotential und Arzneistoffbeladung bestimmt.

Die Quantifizierung des Photosensibilisators in wässriger Nanopartikelsuspension wurde nach enzymatischer Degradation des Partikelsystems mit Pepsin bei einem pH von 1 – 3 durchgeführt.

Für ein Partikelsystem dieses Quervernetzungsgrades (100% bezogen auf die 60 Aminogruppen des HSA-Moleküls) wurde in der Literatur eine Zersetzung innerhalb von 30 min beschrieben [14]. Um einen sicheren Abbau auch in Gegenwart der Photosensibilisatoren zu gewährleisten, wurden die Partikel über 2 h mit dem Enzym inkubiert.

Tabelle 3: Beladung von HSA-Nanopartikeln bei 0,15 mg/mL mTHPP in Ethanol 34,3% [V/V] und verschiedenen Konzentrationen an gelöstem HSA (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6)

Parameter	Leer	0,75% HSA	1,0% HSA	1,25% HSA	1,5% HSA	1,75% HSA	2,0% HSA
Partikelgröße [nm]	189,9 \pm 0,4	194,7 \pm 6,4	197,0 \pm 5,0	195,6 \pm 3,0	204,0 \pm 5,2	199,7 \pm 14,3	203,0 \pm 18,0
Polydispersität	0,045 \pm 0,024	0,050 \pm 0,001	0,026 \pm 0,011	0,064 \pm 0,016	0,009 \pm 0,009	0,069 \pm 0,009	0,086 \pm 0,082
mTHPP-Beladung [μg/mg]	-	21,6 \pm 6,8	21,0 \pm 7,0	21,1 \pm 0,2	20,3 \pm 1,0	18,6 \pm 0,2	17,3 \pm 0,3

Unabhängig von der eingesetzten HSA-Konzentration wurden Partikelgrößen von 194,7 - 204,0 nm und Polydispersitätsindices von 0,009 - 0,086 für mTHPP-beladene HSA-Nanopartikel ermittelt (siehe Tabelle 3). Für mTHPC-beladene Partikel wurden Partikelgrößen zwischen 199,0 und 208,2 nm mit Polydispersitätsindices zwischen 0,006 und 0,081 bestimmt (siehe Tabelle 4).

In beiden Fällen konnte keine signifikante Veränderung der Partikelgröße infolge der Adsorption gezeigt werden.

Tabelle 4: Beladung von HSA-Nanopartikeln bei 0,15 mg/mL mTHPC in Ethanol 34,3% [V/V] und verschiedenen Konzentrationen an gelöstem HSA (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3):

Parameter	Leer	0,75% HSA	1,0% HSA	1,25% HSA	1,5% HSA	1,75% HSA	2,0% HSA
Partikelgröße [nm]	211,6 \pm 5,7	200,4 \pm 0,9	199,6 \pm 0,8	199,0 \pm 1,8	203,2 \pm 2,2	208,2 \pm 2,7	206,9 \pm 3,6
Polydispersität	0,038 \pm 0,008	0,043 \pm 0,018	0,006 \pm 0,004	0,044 \pm 0,012	0,055 \pm 0,018	0,016 \pm 0,010	0,081 \pm 0,062
mTHPC-Beladung [μg/mg]	-	21,4 \pm 2,4	22,7 \pm 2,6	19,8 \pm 1,7	20,9 \pm 2,1	19,5 \pm 1,7	21,2 \pm 2,7

Mit ansteigender Albuminkonzentration von 0,75 auf 2,0% [m/V] konnte ein geringfügiges, jedoch nicht signifikantes (ANOVA) Abfallen der Arzneistoffbeladung für mTHPP von 21,6 auf 17,3 μg pro mg HSA beobachtet werden (siehe Tabelle 3). Es kann daher eine Solubilisation des Photosensibilisators durch den großen Überschuss des Proteins mit Verringerung der Adsorption vermutet werden. Bei geringeren Proteinkonzentrationen (0,75 und 1,0%) ist die Beladungsrate von mTHPP großen Schwankungen ausgesetzt, wie sich an der erhöhten Standardabweichung zeigt (siehe Abbildung 8). Dies könnte ein Hinweis auf eine geringe Stabilität des Beladungsmediums und der daraus resultierenden Formulierung sein.

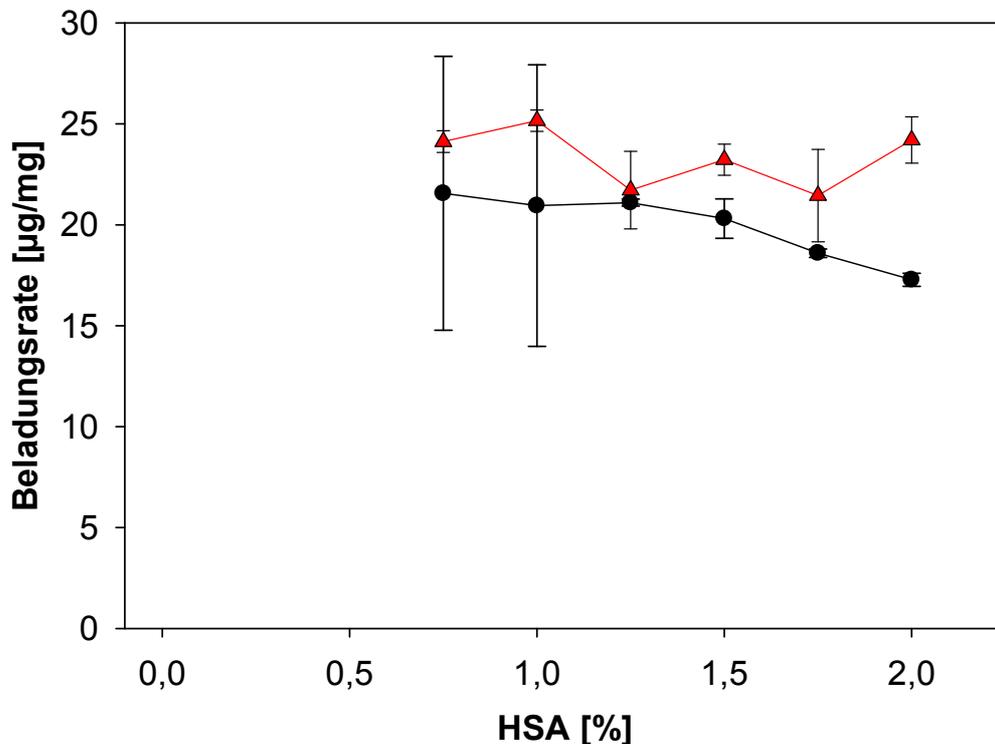


Abbildung 8: Adsorption von mTHPC (—▲—) und mTHPP (—●—) an HSA-Nanopartikel bei steigenden Konzentrationen an gelöstem HSA (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Standardprotokoll für die Beladung von HSA-Nanopartikeln mit mTHPP unter Verwendung von 1,5% gelöstem HSA entwickelt. Diese Proteinkonzentration garantiert einerseits eine stabile Formulierung und verhindert andererseits die Verringerung der Beladung durch Desorptionseffekte.

Bei der adsorptiven Beladung von HSA-Nanopartikeln mit mTHPC wurden zwischen 19,5 und 22,7 μg des Photosensibilisators pro mg des Proteins gebunden. Hierbei konnte eine nahezu konstante Beladung für alle Proteinkonzentrationen gezeigt werden (siehe Tabelle 4). In diesem Fall wurde eine Konzentration von 2,0% an gelöstem HSA für die Beladung gewählt, um maximale Stabilität der Partikelformulierung zu erreichen.

In beiden Fällen wurde keine Veränderung der Teilchengröße oder der Größenverteilung festgestellt, wie sie z.B. bei Auftreten von Präzipitaten oder Aggregaten zu erwarten wäre.

3.2.4. Zetapotentialmessung an beladenen HSA-Nanopartikeln

Neben der Partikelgröße ist auch das Zetapotential ein wichtiges Charakteristikum zur Beurteilung der Stabilität des Partikelsystems. Es wurden daher die Zetapotentiale von Leerpartikeln und adsorptiv beladenen Partikeln über 5 Tage, beginnend nach adsorptiver Bindung des Photosensibilisators untersucht.

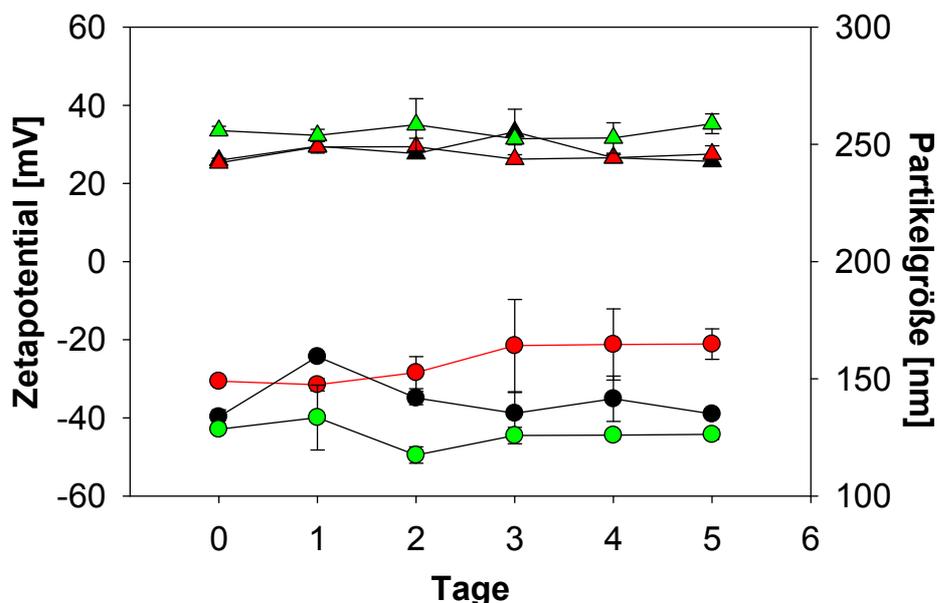


Abbildung 9: Zetapotential (—●—) und Partikelgröße (—▲—) von leeren (■) sowie mTHPC- (■) und mTHPP-beladenen HSA-Nanopartikeln (■) (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3)

Es konnte eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Erhöhung des Zetapotentials festgestellt werden, die auf die Stabilität des Partikelsystems keinen Einfluss hat. Eine Veränderung des Zetapotentials spricht für eine adsorptive Bindung des Arzneistoffs, da adsorbierte Wirkstoffmoleküle in jedem Fall eine Veränderung der Oberflächenladung des Kolloidsystems bewirken sollten.

3.2.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung ist ein Standardverfahren für die Messung kleinster Partikelgrößen. Um die Stabilität der entstandenen Kolloidsysteme jedoch durch weitere Verfahren zu erhärten, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen der adsorptiv mit mTHPC bzw. mTHPP beladenen HSA-Nanopartikel vorgenommen.

a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Das Partikelsystem zeigte im Rasterelektronenmikroskop keine Anzeichen von Präzipitaten, wie sie bei Instabilität des Reaktionsmediums aufgetreten wären. Die Nanopartikel wurde für diese Untersuchung in wässriger Suspension auf eine Filtermembran aufgetragen und getrocknet. Auf den Bildern sind keine kristallinen Strukturen des Photosensibilisators, sondern lediglich HSA-Nanopartikel in erwarteter Größe und Polydispersität zu erkennen (siehe Abbildung 10). Als Kontrollprobe wurde die Filtermembran mit demselben Volumen gereinigten Wassers inkubiert und untersucht. Es ist lediglich die Porenstruktur der Membran zu erkennen.

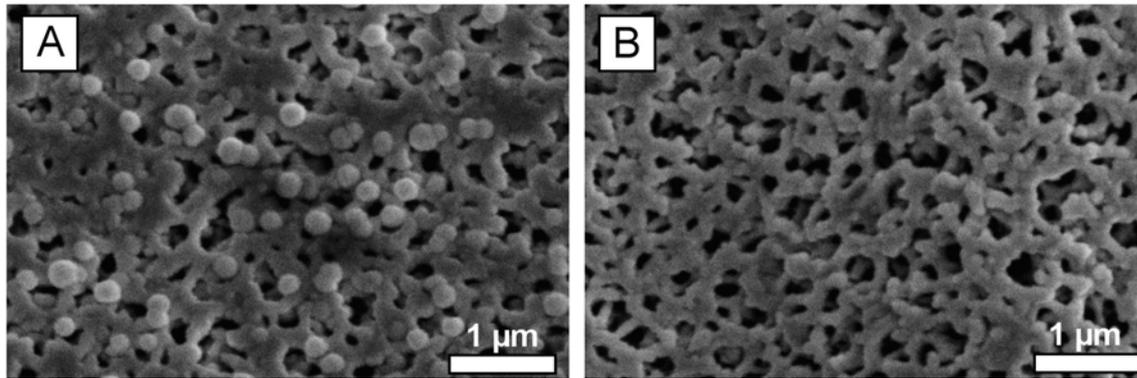


Abbildung 10: Rasterelektronenmikroskopie (REM) von (A) mTHPC beladenen HSA Nanopartikeln und (B) einer leeren Membranfiltereinheit (Probenvorbereitung mit gereinigtem Wasser).

b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen

Eine weitere Untersuchung von mTHPP-HSA-Nanopartikeln erfolgte im Transmissionselektronenmikroskop. Bei der gewählten HSA-Konzentration ist keine Instabilität des Partikelsystems zu erwarten. Die Bilder zeigen ebenfalls keine Präzipitate oder Aggregate, sondern lediglich HSA-Nanopartikel mit monodisperser Größenverteilung.

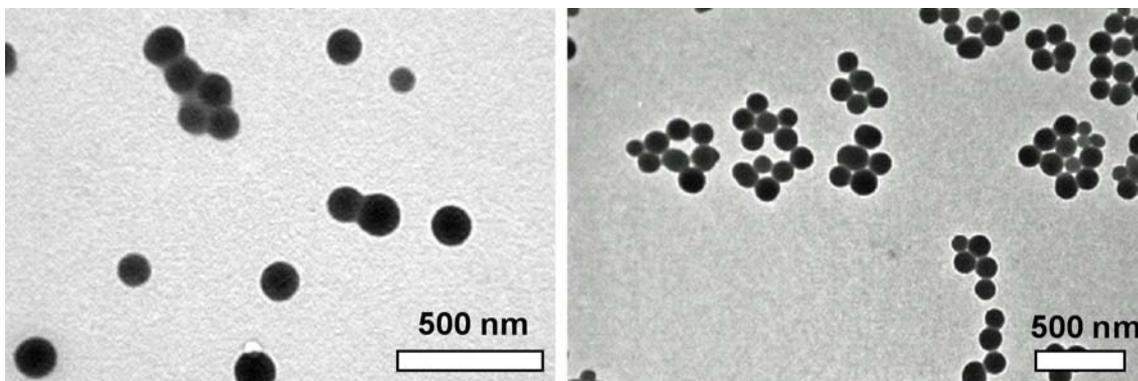


Abbildung 11: HSA-Nanopartikel, beladen mit mTHPP in Gegenwart von 1,25% gelöstem HSA. Es war aufgrund der hohen Elektronendichte der Partikel keine Kontrastierung erforderlich.

3.2.6. Untersuchung der Proteinadsorption

In Voruntersuchungen zur adsorptiven Bindung des Photosensibilisators mTHPP in hydroethanolischen Lösungen konnte eine Arzneistoffbindung von $30,81 \pm 15,02 \mu\text{g}$ erreicht werden. Diese wurde jedoch einerseits von Präzipitation des Arzneistoffes im Inkubationsmedium begleitet und machte andererseits nur 7,38% der eingesetzten Masse des Photosensibilisators aus.

Die Bildung von Präzipitaten und eine erhöhte Adsorption des Arzneistoffs infolge der Teilchendichte im umgebenden Medium sind daher wahrscheinlich. Führt man die Adsorption unter den gewählten Bedingungen in Gegenwart des gelösten Proteins durch, so kann eine stabile Formulierung erreicht werden. Dies zeigt sich sowohl in der geringen Standardabweichung der adsorbierten Arzneistoffmenge, als auch im gleich bleibenden Arzneistoffgehalt des Inkubationsmediums (siehe Abbildung 3), der durch die Löslichkeitsuntersuchung bestätigt wird. Weiterhin werden von der eingesetzten Arzneistoffmenge 88,8% bei mTHPP und 93,0% bei mTHPC gebunden. Aufgrund der deutlich verbesserten Effizienz des Verfahrens (eine Bindung von über 90%, gegenüber 7,38% gebundenen Arzneistoffes bei Verwendung von Ethanol-Wasser-Gemischen ohne HSA) kann daher vermutet werden, dass humanes Serumalbumin zu einer zusätzlichen Adsorptionssteigerung führt, welche sich nicht nur durch die lösungsvermittelnden Eigenschaften des Proteins erklären lässt. In der Literatur werden die Bindungseigenschaften von HSA [23] und die Komplexbildung vom mTHPC durch strukturverwandte Proteine [98, 100] ebenso beschrieben wie die Adsorption von Plasmaproteinen an verschiedene Kolloidsysteme [102].

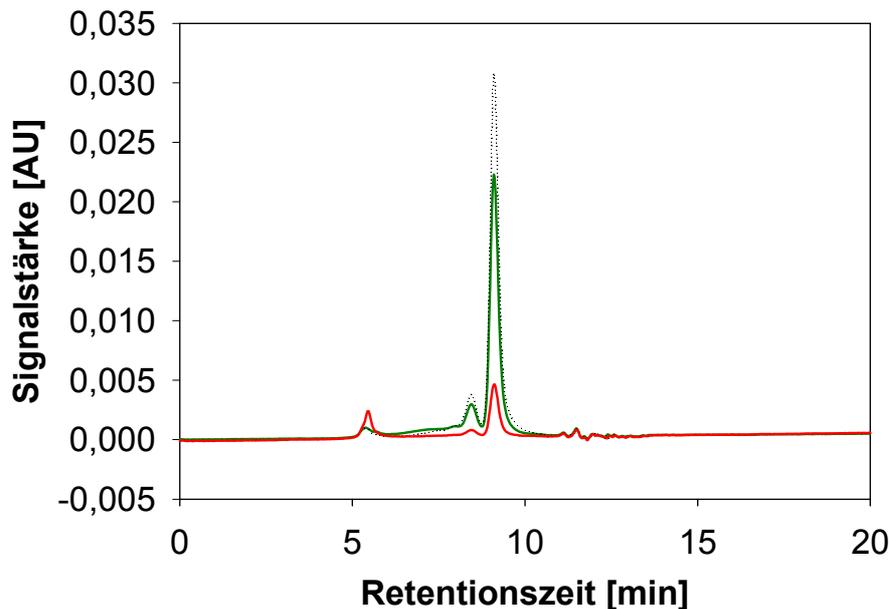


Abbildung 12: GPC-Chromatogramme des Überstandes von mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln (2,0% HSA) nach der ersten Zentrifugation (■), eines Standards mit einer hydroethanolischen, proteinstabilisierten mTHPC-Lösung (2,0% HSA) (■), und von HSA in wässriger Lösung (•••).

Es kann daher vermutet werden, dass das Plasmaprotein Albumin eine starke Affinität zu HSA-Nanopartikeln besitzt und die Adsorption von Photosensitizer-Protein-Komplexen zu einer Erhöhung der Beladungseffizienz führt. Um diese Vermutung zu bekräftigen wurde die Adsorption des Proteins durch Gelpermeationschromatographie untersucht. Das Chromatogramm (siehe Abbildung 12) zeigt ein Abfallen der HSA-Konzentration von 65,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in der proteinstabilisierten, hydroethanolischen Arzneistofflösung ohne Nanopartikel, auf 12,36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Überstand des Kolloidsystems nach Zentrifugation. Dies entspricht einer Adsorption von 81% des eingesetzten Proteins und stützt die Annahme einer Adsorption der gebildeten Komplexe.

3.2.7. pH-Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion

Es wurde bereits dargelegt, dass die Adsorption von Arzneistoffen sehr wesentlich durch ihre Lipophilie bestimmt wird. In früheren Studien [103] konnte gezeigt werden, dass der Verteilungskoeffizient von mTHPP und mTHPC sowie ihrer Derivate dem Einfluss des pH-Wertes unterliegt. Daher

sollte die adsorptive Bindung ebenfalls auf pH-Abhängigkeit untersucht werden.

Für mTHPP wurden wie zuvor festgelegt 1,5%, für mTHPC 2,0% des gelösten Proteins für die adsorptive Bindung an das Partikelsystem verwendet. Es zeigte sich im pH-Bereich von 5 bis 10 kein signifikanter Einfluss des pH auf die Effizienz der Arzneistoffbindung von mTHPC (siehe Abbildung 13). Für mTHPP wurde eine signifikante Abnahme der Beladung bei höheren pH-Werten gezeigt. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass das Kolloidsystem bei pH 5 instabil wurde und es zu einer sichtbaren Aggregation kam.

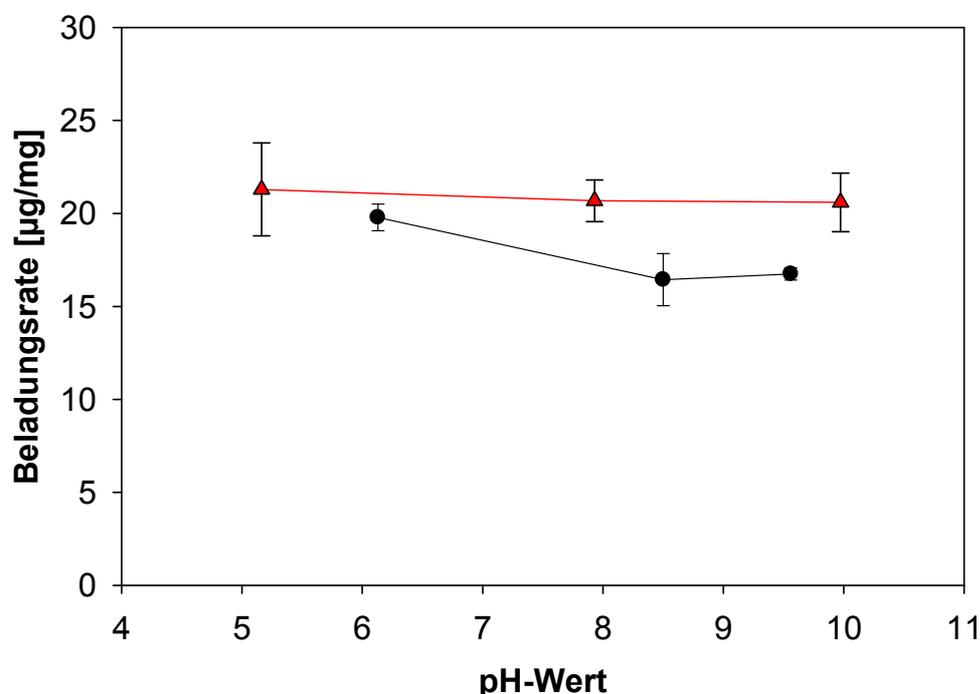


Abbildung 13: Vergleich der Adsorption von mTHPC (—▲—) und mTHPP (—●—) in Abhängigkeit des pH-Wertes. (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3)

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden alle weiteren Versuche zur Beladung von mTHPP bei pH 8 und für mTHPC bei pH 7 durchgeführt. So sollte einerseits eine Veränderung der Arzneistoffbindung ausgeschlossen und eine mögliche Aggregatbildung durch Erhöhung der Oberflächenladung verhindert werden. Aus früheren Studien ist bekannt, dass das Kolloidsystem durch das negative Zetapotential der Partikel ladungsstabilisiert wird und somit niedrigere pH-Werte zur Aggregation führen können [13].

3.2.8. Zeitabhängigkeit der Adsorptionsreaktion

Die Komplexierung von mTHPP und mTHPC durch humanes Serumalbumin führt sowohl zu einer deutlichen Löslichkeitsverbesserung der beiden Photosensibilisatoren (siehe Abbildung 3), als auch zu einer Steigerung der Adsorption (siehe Abbildung 8). In der Literatur wird beschrieben, dass die Verteilung und Monomerisierung des Photosensibilisators durch BSA zeitabhängig verläuft [98, 100], wobei hier wesentlich geringere Konzentrationen des Proteins zum Einsatz kamen. In den meisten Fällen verläuft die adsorptive Bindung von Arzneistoffen sehr schnell, es sollte jedoch auch in diesem Fall untersucht werden, ob eine Zeitabhängigkeit der Adsorption besteht. Dazu wurden die Proben bis zu 24 h unter den beschriebenen Bedingungen mit Arzneistoff inkubiert und der Gehalt anschließend nach enzymatischer Degradation des Partikelsystems photometrisch bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass keine signifikante Abhängigkeit zwischen Inkubationszeit und der Beladungsrate bestand (siehe Tabelle 5). Auch bei der geringsten gewählten Inkubationsdauer zeigte sich keine veränderte Adsorption der Wirkstoffe.

Tabelle 5: Adsorption von mTHPC und mTHPP an HSA-Nanopartikel bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (Mittelwert \pm Standardabweichung; n=3).

Zeit [h]	mTHPP [%]	mTHPP / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	mTHPC [%]	mTHPC / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
0,5	79,63%	17,9 \pm 0,3	92,4%	20,8 \pm 0,7
1	81,43%	18,3 \pm 0,1	85,8%	19,3 \pm 0,6
2	79,51%	17,9 \pm 0,4	89,2%	20,1 \pm 0,5
24	79,73%	18,0 \pm 0,4	82,7%	18,6 \pm 0,4

Aus diesem Grunde, wurde für die Herstellung der Partikelsysteme in allen weiteren Versuchen die kürzeste untersuchte Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt.

3.2.9. Abhängigkeit der Adsorptionsreaktion vom Quervernetzungsgrad

Die Oberflächenstruktur der HSA-Nanopartikel wird durch die Quervernetzung mit Glutaraldehyd [13, 19] deutlich verändert. Die Abhängigkeit der Adsorption des Arzneistoffs vom Quervernetzungsgrad des Partikelsystems wurde daher nach Quervernetzung mit 40%, 70% und 100% Glutaraldehyd untersucht. Anschließend erfolgte die Beladung der Partikel in Gegenwart von gelöstem HSA wie zuvor beschrieben. Die Bestimmung des Arzneistoffgehaltes erfolgte aus dem Überstand gegen einen Standard, welcher keine HSA-Nanopartikel enthielt, wodurch sich auch die Ungenauigkeit in der Bestimmung des Gehaltes und die damit vergleichsweise hohen Beladungswerte erklären lassen. Bei indirekter Bestimmung kommt es im Zuge der mehrfachen Aufreinigung zu einer Unterschreitung der für die photometrische Bestimmung erforderlichen Photosensibilisatorkonzentration (beim 2. und 3. Aufreinigungsschritt), wodurch diese für die Gehaltsbestimmung nicht berücksichtigt werden können.

Tabelle 6: Adsorption von mTHPP bei unterschiedlichem Quervernetzungsgrad der verwendeten HSA-Nanopartikel.

Quervernetzungsgrad [%]	Beladung [%]	Beladung mTHPP / HSA [µg/mg]
40%	85,46%	27,9
70%	87,71%	28,6
100%	90,31%	29,5

Für die verwendeten Partikelchargen wurde kein Unterschied in der Beladung festgestellt (siehe Tabelle 6).

3.2.10. Desorption nach adsorptiver Bindung

Die adsorptive Arzneistoffbindung beruht lediglich auf unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Sorbent und Sorbat, weshalb nur geringe Stabilität der etablierten Formulierungen in Zellkulturmedien oder auch *in vivo* zu erwarten ist. In Gegenwart eines starken Lösungsmittels tritt eine Umverteilung des Arzneistoffes von der Oberfläche der Nanopartikel ein, und das Gleichgewicht verschiebt sich zugunsten der lipophilen Umgebung [97].

Da der Arzneistoff vermutlich zu einem großen Teil in Form eines Proteinkomplexes adsorbiert wird, ist weiterhin eine Konkurrenz mit Proteinen des umgebenden Mediums zu erwarten [100, 102], und es kann zu Umverteilungsprozessen kommen.

Die eingesetzten Zellkulturmedien der *in vitro* Testsysteme (siehe 3.7) enthalten zahlreiche Proteine, welche eine Solubilisation des Arzneistoffes durch Präsentation von lipophilen Bindungstaschen bewirken [23, 100] und gleichzeitig durch ihre, dem HSA ähnliche Struktur mit den gebundenen Proteinen auf der Oberfläche des Partikelsystems konkurrieren.

Nach Entwicklung eines Protokolls für die Herstellung von mTHPP-beladenen HSA-Nanopartikeln sollte daher die Desorption des Arzneistoffes in den verschiedenen Zellkulturmedien untersucht werden. Dazu wurde das Kolloidsystem sowohl in Ethanol als auch in den verschiedenen Zellkulturmedien inkubiert und der Photosensibilisator anschließend nach Abzentrifugieren der Nanopartikel photometrisch aus dem Überstand quantifiziert. Die Desorption in Ethanol 96% [V/V] wurde dabei auf 100% gesetzt und anschließend die Desorption in den anderen Medien anteilig berechnet (siehe Tabelle 7). Es konnte gezeigt werden, dass nach 24 h zwischen 22,49% und 44,49% der eingesetzten Arzneistoffmenge im Zellkulturmedium desorbieren und somit nicht mehr für die gleichzeitige Aufnahme mit HSA-Nanopartikeln zur Verfügung stehen.

Tabelle 7: Desorption von mTHPP von mTHPP-HSA-Nanopartikeln in Zellkulturmedien (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

Parameter		DiFi-Zellkulturmedium	HT29-Zellkulturmedium	LS174T-Zellkulturmedium
Partikelgröße [nm]	160,6 nm			
Polydispersitätsindex	0,041	40,09% \pm 12,97%	44,49% \pm 6,22%	22,49% \pm 8,17%
HSA [m/V]	1,5%			
Beladung [μ g/mg]	20,0			

Gleichzeitig wurde die Wiederfindung des Arzneistoffes in den Zellkulturmedien untersucht. Diese lag bei etwa 70-85% (siehe Tabelle 8). Kombiniert man diese Informationen, so ist davon auszugehen, dass ein deutlich höherer Anteil der adsorbierten Arzneistoffmenge wieder desorbiert wird.

Tabelle 8: Wiederfindung von mTHPP in Zellkulturmedien im Vergleich zu Ethanol 96% [V/V] (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

Medium	
DiFi-Zellkulturmedium	76,62% \pm 3,31%
HT29-Zellkulturmedium	84,12% \pm 2,82%
LS174T-Zellkulturmedium	72,13% \pm 2,68%

Ein Grund für die geringe Wiederfindung ist sicherlich die Bildung von Präzipitaten im wässrigen Milieu der Zellkultur, was jedoch gleichzeitig die geringe Aufnahmefähigkeit der Medien für den Arzneistoff belegt. Diese stellt auch ein analytisches Problem bei Bestimmung des vom Partikelsystem desorbierten Photosensibilisators dar. So liegt bei Untersuchung der Wiederfindung, wie auch bei Desorptionsuntersuchung ein Milieu vor, welches einerseits Komplexierung durch Proteinbestandteile des Mediums und andererseits die Aggregatbildung und Sedimentation des Arzneistoffes zulässt.

3.2.11. Gefriertrocknung adsorptiv beladener HSA-Nanopartikel

In einer weiteren Untersuchung erfolgte die Gefriertrocknung adsorptiv beladener mTHPC-HSA-Nanopartikel, um die Lagereigenschaften des Kolloidsystems zu verbessern. Vergleicht man die beiden Photosensibilisatoren mTHPP und mTHPC hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, so ist mTHPC das potentere Derivat, dessen Wirksamkeit und Verträglichkeit aufgrund des Zulassungsverfahrens oftmals belegt wurde [104].

Für Parenteralia ist die Gefriertrocknung ein Standardverfahren, welches die Zubereitungen bei Lagerung vor Hydrolyse und biologischer Kontamination schützt. Weiterhin können Desorptionseffekte, wie sie in den vorangegangenen Untersuchungen beschrieben wurden (siehe 2.7.12) durch Entzug der flüssigen Phase ausgeschlossen werden.

Bereits zuvor evaluierte man verschiedene Kryoprotektoren wie Mannitol, Saccharose oder Trehalose für die Gefriertrocknung von HSA-Nanopartikeln [105], weshalb hier Saccharose als Hilfsstoff für die Gefriertrocknung des adsorptiv beladenen Trägersystems ausgewählt wurde.

In der durchgeführten Studie, wurde die physikalische Stabilität des Kolloidsystems über eine maximale Lagerdauer von 6 Wochen getestet. Die eingesetzten Kontrollproben wurden über denselben Zeitraum mit einer 3-%igen Saccharoselösung inkubiert und bei 4 °C gelagert. Sowohl die Kontrollproben, als auch die gefriergetrockneten Proben zeigten keinerlei Auffälligkeit hinsichtlich ihrer Partikelgröße oder des Polydispersitätsindex.

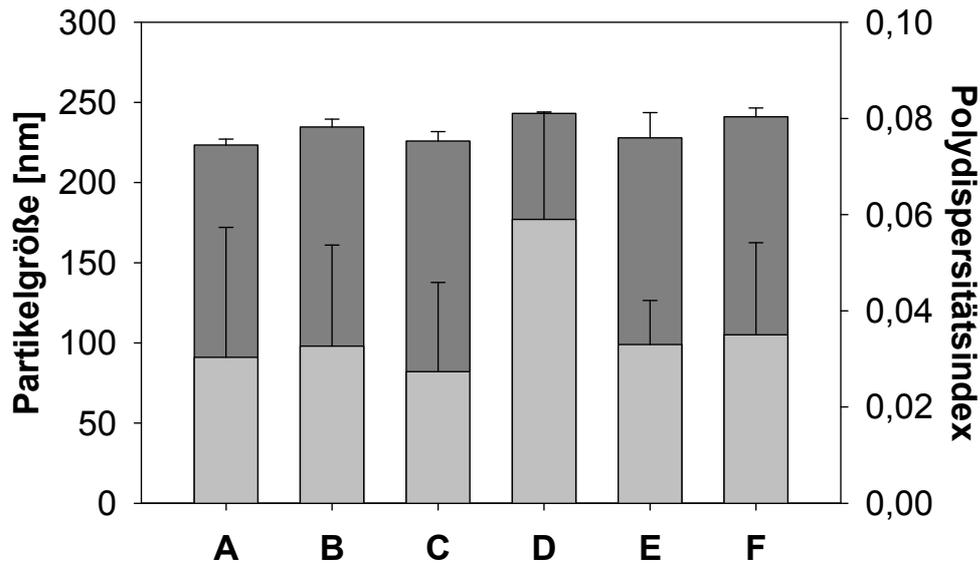


Abbildung 14: Partikelgröße (■) und Polydispersitätsindex (■) von adsorptiv mit mTHPC beladenen HSA-Nanopartikeln nach einer Lagerzeit von 1 Tag (A), 3 Wochen (C) und 6 Wochen (E) bei 4 °C in 3%-iger wässriger Saccharoselösung sowie Zubereitungen gleicher Zusammensetzung nach Gefriertrocknung. Die gefriergetrockneten Formulierungen wurden nach einer Lagerzeit von 1 Tag (B), 3 Wochen (D), and 6 Wochen (F) in gereinigtem Wasser resuspendiert (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 3).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann daher davon ausgegangen werden, dass mTHPP- und mTHPC-beladene HSA-Nanopartikel nach Gefriertrocknung in Gegenwart von Saccharose dauerhaft lagerstabil sind und kein nachteiliger Effekt auf das Partikelsystem zu befürchten ist.

3.3. Inkorporierung von Photosensibilisatoren

Die Gefriertrocknung der fertigen Formulierungen von mTHPP und mTHPC stellt den Abschluss der Untersuchungen zur adsorptiven Bindung von Photosensibilisatoren an HSA-Nanopartikel dar. Im nächsten Schritt sollte die Inkorporierung des Arzneistoffs auf der Basis früherer Arbeiten [33, 95] erprobt werden.

Die Einbettung erfolgte durch Fällung von Albumin mit Ethanol in Gegenwart des Arzneistoffs. Hierbei sollen sich die Photosensibilisatormoleküle an das aggregierende Protein anlagern und nach Stabilisierung mit Glutaraldehyd eingeschlossen vorliegen. Es wurde bereits gezeigt, dass die eingesetzten Wirkstoffe in Ethanol gute Löslichkeit besitzen (siehe 3.1.1), weshalb es zu einer ungünstigen Verteilung des Arzneistoffs hinsichtlich einer Inkorporierung kommen kann. Der Arzneistoff wird in diesem Fall aufgrund seiner Lipophilie im eingesetzten Titrator angereichert und es kommt möglicherweise nicht zur gewünschten Kopräzipitation.

3.3.1. Desolvatation bei verschiedenen Ethanolvolumina

Das Prinzip der ethanolischen Desolvatation wurde bereits erfolgreich zur Herstellung leerer HSA-Nanopartikel angewandt. Durch Zugabe geringerer Ethanolvolumina zur HSA-Arzneistoff-Lösung sollte die Lipophilie des Desolvatationsmediums verringert und die Einbettung dadurch schrittweise verbessert werden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Desolvation von jeweils 1 mL mTHPP- bzw. mTHPC-haltiger 6%-iger HSA-Lösungen mit unterschiedlichen Ethanol-Volumina (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

Versuchsparameter	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung PhS / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
mTHPP 1,28 mL Ethanol	193,0 \pm 30,0	0,081 \pm 0,078	13,8 \pm 0,29
mTHPC 1,28 mL Ethanol	159,4 \pm 3,8	0,051 \pm 0,007	10,3 \pm 0,36
mTHPC 0,8 mL Ethanol	171,5 \pm 2,6	0,049 \pm 0,016	11,1 \pm 0,12
mTHPC 0,6 mL Ethanol	Keine Desolvation	-	-

Obwohl es bei Volumina von mehr als 0,6 mL Ethanol zu einer nanopartikulären Fällung des Proteins kommt, konnte der Arzneistoff unter den gewählten Bedingungen nicht hinreichend gebunden werden. Bei geringeren Ethanolvolumina kommt es zu einer Unterschreitung der für die Desolvation notwendigen Ethanolkonzentration, die bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurde [13].

Der Arzneistoffgehalt wurde nach enzymatischer Degradation des Trägersystems mit Pepsin bestimmt, ein Verfahren, welches bereits bei adsorptiv beladenen HSA-Nanopartikeln verwendet wurde (siehe 2.7.5). Die Verringerung des Ethanolvolumens ist, abschließend betrachtet, keine geeignete Methode für die effizientere Einbettung des Arzneistoffs in das Partikelsystem. Zum einen fällt durch die unvollständige Desolvation infolge der zu niedrigen Ethanolkonzentration eine geringere Partikelmasse an und zum anderen konnte keine ausreichende Erhöhung der Arzneistoffbeladung gezeigt werden.

3.3.2. pH-Abhängigkeit der Inkorporierung

Ein wichtiges Kriterium für die Einbettungseffizienz von Arzneistoffen durch Inkorporierung in Albumin ist der pH, da er einerseits die Effizienz der Desolvation beeinflusst [13] und andererseits die Moleküleigenschaften der Photosensibilisatoren zu verändern vermag [103]. Die Fällung des Proteins wurde bei pH 6,5, 7,0 und 8,5 durchgeführt (siehe Tabelle 10), wobei ein

verringertes Ethanolvolumen von 1,28 mL verwendet wurde. Bei pH 6 kam es nicht zu einer nanopartikulären Fällung des Proteins, obwohl diese für andere Arzneistoffe auch bei geringeren pH-Werten bereits gezeigt werden konnte [12].

Tabelle 10: pH-Abhängigkeit der Desolvatation von HSA in Gegenwart von mTHPC (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

pH	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung PhS / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
6,5	> 40000	1	-
7,0	197,9 \pm 12,2	0,037 \pm 0,021	2,3 \pm 0,12
8,5	159,4 \pm 3,8	0,051 \pm 0,007	10,3 \pm 0,36

Der Grund dafür dürfte in der geringen Polarität des Arzneistoffs zu finden sein. Kam es in früheren Untersuchungen auch bei pH-Werten kleiner als 7 zu einer kontrollierbaren Fällung des Proteins, so wurden durch den verwendeten Arzneistoff oder zugesetzte Hilfsstoffe zusätzliche negative Ladungen in das Kolloid eingeführt [32, 106], welche die stärkere Protonierung der beteiligten HSA-Moleküle ausgleichen konnten.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Arzneistoff keinen wesentlichen Einfluss auf die Oberflächenladung des Proteins nimmt, wie auch die Zetapotentialuntersuchungen adsorptiv beladenener Nanopartikel belegen (siehe 2.7.6).

In den vorliegenden Versuchen konnte eine signifikante Steigerung der Partikelbeladung erreicht werden. Der Arzneistoffgehalt stieg durch Veränderung des pH-Wertes von 7 auf 8,5 um das 5-fache. Allerdings wurde in vorherigen Untersuchungen gezeigt, dass eine weitere Erhöhung des pH zu einer Verringerung der Desolvatationseffizienz führt [13]. Zudem belegen die zuvor durchgeführten Stabilitätsuntersuchung (siehe 3.1.3), dass es bei pH 9 zur Instabilität des Arzneistoffs in Gegenwart von Glutaraldehyd kommt. Es konnte daher durch Variation des pH keine weitere Verbesserung der Inkorporierungseffizienz erreicht werden.

3.3.3. Desolvation in Gegenwart von Cyclodextrinen

In der Literatur wurde die Löslichkeitsverbesserung von Photosensibilisatoren durch Cyclodextrine mehrfach beschrieben [107, 108] und auch die Komplexbildung mit Temoporfin ist hinreichend bekannt [109]. Eine Steigerung der Inkorporierung durch Komplexbildung schien möglich, da eine Hydrophilisierung des Arzneistoffs zu einer Steigerung unspezifischer Wechselwirkungen mit hydrophilen Strukturen des HSA-Moleküls [23] führen und eine Vergrößerung des Molekularvolumens die Einbettung hätte erleichtern können.

In Vorbereitung der Inkorporierungsversuche sollte zunächst der Einfluss von Cyclodextrinen auf den Desolvationsprozess untersucht werden. Es ist hinreichend bekannt, dass z.B. hohe Salzkonzentrationen die Desolvation stören und zu einer unkontrollierten Fällung des Proteins unter Bildung polydispenser und zum Teil mikropartikulärer Suspensionen führen [13]. Eine vergleichbare Untersuchung der Desolvation in Gegenwart von Zuckermolekülen wurde bislang nicht durchgeführt.

Da die anschließenden Inkorporierungsversuche bei einer Arzneistoffkonzentration von 0,75 mg/mL durchgeführt werden sollten, wurden Cyclodextrinkonzentrationen entsprechend einem 2-16-fachen molaren Überschuss in Bezug auf die Arzneistoffkonzentration untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Einflüsse verschiedener Cyclodextrin-Konzentrationen auf die ethanolische Desolvation (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

Versuchsparameter	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung mTHPP / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
3,1 mg/mL Cavasol W7 HP®	154,3 \pm 0,7	0,045 \pm 0,007	-
6,2 mg/mL Cavasol W7 HP®	147,3 \pm 4,0	0,064 \pm 0,023	-
9,3 mg/mL Cavasol W7 HP®	148,9 \pm 1,1	0,060 \pm 0,004	-
24,7 mg/mL Cavasol W7 HP®	189,6 \pm 13,5	0,030 \pm 0,034	-

Es konnte gezeigt werden, dass Cyclodextrinkonzentrationen von bis zu 2,5% keine Auswirkung auf den Desolvationsprozess besitzen, was sie zu geeigneten Werkzeugen für die Inkorporierung schwerlöslicher Arzneistoffe werden lässt.

3.3.4. Inkorporierung in Gegenwart von Cyclodextrinen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Cyclodextrine keinen störenden Einfluss auf die Desolvation besitzen, wurde die Inkorporierung von mTHPP in Gegenwart der Komplexbildner untersucht. Hierbei wurde die Desolvation mit Ethanol, wie auch mit ethanolischer mTHPP-Lösung durchgeführt um der stetigen Verdünnung des Arzneistoffs während der Desolvation vorzubeugen. Wie die Ergebnisse in Tabelle 12 zeigen, konnten jedoch nur geringe Arzneistoffmengen in das Partikelsystem inkorporiert werden.

Da nach Herstellerangaben eine Komplexierung mittels Cavasol W7 HP[®] durch Inkubation des Gastmoleküls mit Cyclodextrinen über 6-8 h durchgeführt werden muss, folgte in einem weiteren Versuch ein Vorinkubationsschritt des Arzneistoffs mit dem Cyclodextrin über 24 h, bevor HSA zugegeben und die Desolvation durchgeführt wurde.

Tabelle 12: Inkorporierung durch Desolvation von mTHPP in Anwesenheit von Cavasol W7 HP[®] Pharma (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

Versuchsparameter	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung mTHPP / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
Ethanol 96% keine Vorinkubation	120,7 \pm 0,032	0,051 \pm 0,027	11,65 \pm 0,02
mTHPP 1 mg/mL keine Vorinkubation	112,3 \pm 3,75	0,061 \pm 0,004	12,5 \pm 0,01
mTHPP 1 mg/mL mit Vorinkubation	129,5 \pm 1,27	0,029 \pm 0,063	12,5 \pm 0,01

Auch in diesem Fall zeigte sich keine gesteigerte Inkorporierung, wofür verschiedene Ursachen in Betracht kamen. Zum einen könnte eine geringe Affinität des Cyclodextrins zu humanem Serumalbumin die Effizienz der Einbettung vermindern und zum anderen liegt unter den gegebenen

Bedingungen kein Beweis für die tatsächliche Bildung eines Cyclodextrinkomplexes vor. In vorherigen Untersuchungen wurde für verschiedene Arzneistoffe die Aufkonzentrierung im Gefriertrocknungsprozess zur Komplexbildung mit Cyclodextrinen genutzt [110]. Dieses Prinzip sollte im nächsten Schritt auf mTHPC übertragen werden.

3.3.5. Komplexbildung von mTHPC

β -Methyl-Cyclodextrin erwies sich in anderen Arbeiten als effizientester Komplexbildner im Zusammenspiel mit mTHPC [109], während 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrine im Gegensatz zum erstgenannten Derivat bereits in parenteralen Arzneizubereitungen Anwendung finden und eine geringere Toxizität aufweisen [111]. Der Einschluss von mTHPC wurde daher mit beiden Cyclodextrinen erprobt.

Nach Resuspendieren der gefriergetrockneten Stoffe in gereinigtem Wasser und Abtrennen der ungelösten Bestandteile ergaben sich die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse. Beide Cyclodextrine waren in der Lage den Arzneistoff in Konzentrationen von mehr als 1 mg/mL in Lösung zu halten, wobei das β -Methyl-Cyclodextrin erwartungsgemäß den besseren Lösungsvermittler darstellte. Die erreichbare Maximalkonzentration lag bei 2 mg/mL (siehe Abbildung 15).

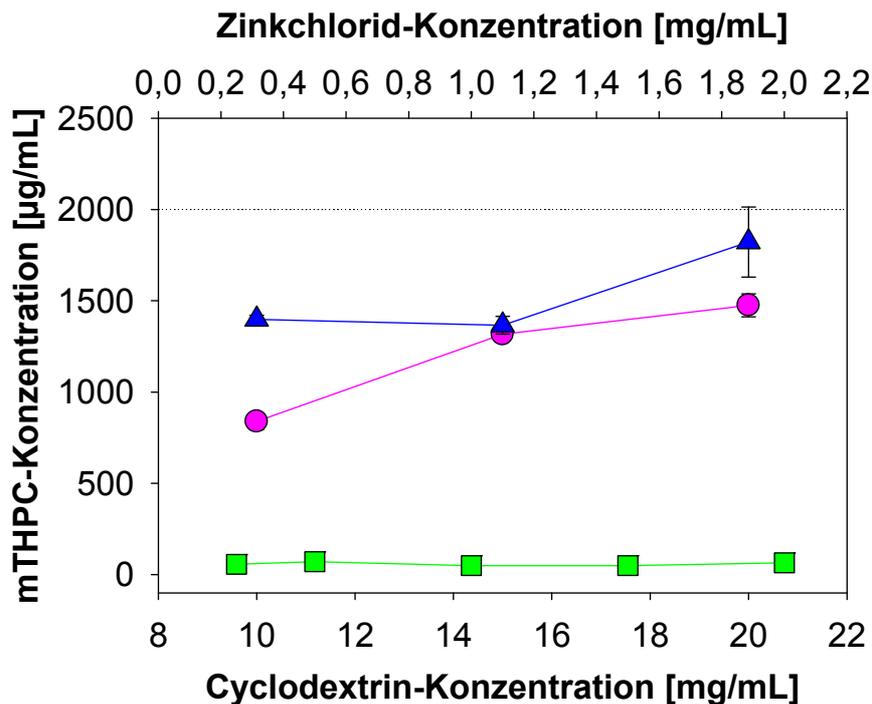


Abbildung 15: Löslichkeitsverbesserung von mTHPC mit 2-Hydroxypropylcyclodextrin (●), β-Methylcyclodextrin(▲) und Zinkchlorid (■) in Ethanol 55,0% bei einer eingesetzten Maximalkonzentration von 2 mg/mL mTHPC (•••) (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3).

Ein weiterer Versuch der Komplexbildung wurde mit Zinkchlorid durchgeführt. In der Natur ist eine Vielzahl zinkhaltiger Chlorine bekannt [112], ebenso wie Interaktionen zwischen Zink und dem HSA-Molekül [45]. Eine *in vivo* instabiler Komplex parenteral verträglicher Metallionen mit dem Arzneistoff hätte die Einbettung in das Kolloidsystem möglicherweise verbessern können, ohne dabei starken Einfluss auf die photodynamische Aktivität zu nehmen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass es auch unter den Bedingungen der Gefriertrocknung nicht zur Bildung relevanter Mengen des Zinkkomplexes kommt.

Die Komplexbildung war somit zum Teil erfolgreich, wobei deutliche Unterschiede hinsichtlich der Komplexbildungseigenschaften zutage traten. So wurden unter den gewählten Bedingungen von β-Methyl-Cyclodextrin 91%, von 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin 74% und von Zinkchlorid 3% des eingesetzten Wirkstoffs komplexiert. Schließlich wurde 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin zur weiteren Verwendung ausgewählt, da eine Komplexbildung

von 74% ausreichend erschien und der Hilfsstoff bereits zur intravenösen Applikation zugelassen wurde [111].

3.3.6. Desolvation in Gegenwart von mTHPC-Cyclodextrin-Komplexen

Humanes Serumalbumin wurde in Gegenwart von ausgeformten mTHPC-Cyclodextrin-Komplexen desolvatisiert und anschließend eine Aufreinigung des Kolloidsystems in gereinigtem Wasser durchgeführt. Während der Gefriertrocknung wurde Saccharose als Kryoprotektor verwendet um die Bildung eines Kuchens mit guter Redispergierbarkeit in Wasser zu fördern. Die Desolvation in Gegenwart des Cyclodextrinkomplexes verlief erfolgreich. Die entstandenen Partikel besaßen eine Größe von $184,0 \pm 9,3$ nm und einen Polydispersitätsindex von $0,024 \pm 0,004$. Gleichzeitig führte die Bildung eines Arzneistoffkomplexes jedoch nicht zu einer vermehrten Inkorporierung des Arzneistoffes, obwohl der Quervernetzungsgrad nochmals erhöht wurde, um ein Ausspülen des Komplexes aus dem Partikelinneren zu erschweren. Während der Aufreinigungsschritte zeigte insbesondere der erste Überstand eine deutlich rote Färbung, was auf ein Auswaschen des Komplexes aus dem desolvatisierten Protein schließen ließ. Im Folgenden wurde eine Gehaltsbestimmung nach enzymatischer Degradation durchgeführt, welche dieses Ergebnis bestätigte und keine mit der verwendeten Methode quantifizierbare Menge des Photosensibilisators offenbarte.

Aufgrund des hohen Albuminüberschusses wurde zwar eine geringe Beladung erwartet, gleichzeitig wurde jedoch von einer fast vollständigen Einbettung des vorhandenen Wirkstoffs ausgegangen, welche leider nicht bestätigt werden konnte. Offensichtlich führen Cyclodextrine weder zu einer vermehrten Einbettung des Wirkstoffs, noch können sie durch Hydrophilisierung zu seiner Adsorption an HSA-Nanopartikel eingesetzt werden. Vielmehr treten sie, wie auch für lipophile Lösungsmittel gezeigt werden konnte (siehe auch 3.2.2 und 3.3.1), in Konkurrenz mit dem desolvatisierten Protein und führen zu einem deutlichen Affinitätsverlust des Wirkstoffes zu seiner Trägermatrix. Die

Untersuchungen zur Inkorporierung von Photosensibilisatoren durch ethanolische Desolvatation wurden daher abgeschlossen.

3.4. PEG-HSA-Desolvatation

Die Fällung von Proteinen durch Desolvatation ist ein etabliertes Verfahren, welches bereits mehrfach für die Herstellung nanopartikulärer Trägersysteme, wie auch für die Inkorporierung von Wirkstoffen genutzt wurde [13, 14, 19, 20, 56, 105].

Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass der Entzug der Hydrathülle von Proteinen auch durch weitere Desolvatationsreagenzien herbeigeführt werden kann. Allerdings wurden hier zumeist lipophile Lösungsmittel, wie z.B. Aceton [18] verwendet. Höherkettige Polyethylenglykole sind als schonende Fällungsreagenzien für verschiedene Eiweiße und u.a. auch für humanes Serumalbumin bekannt [47]. Eine Evaluierung der Nutzung dieser Eigenschaften für die Herstellung eines nanopartikulären Trägersystems erfolgte jedoch bislang nicht.

Polyethylenglykole sind aufgrund ihrer hydrophilen Struktur in Wasser löslich und werden üblicherweise in Konzentrationen von 20-30% [m/V] zur Fällung von Albumin eingesetzt [47]

Für die Entwicklung eines Albumin-basierten Trägersystems für Photosensibilisatoren schienen sie gute Eignung zu besitzen. Aus den gezeigten Löslichkeitsuntersuchungen (siehe 3.1.1) geht hervor, dass diese Wirkstoffe in lipophilen Lösungsmitteln eine ausgezeichnete Löslichkeit besitzen und daher während des Desolvatationsprozesses die Affinität zur Trägermatrix mit steigendem Ethanolvolumen abnimmt (siehe 3.3.1). Da das bevorzugte Polyethylenglykol in einer wässrigen Lösung mit einem Wasseranteil von bis zu 60% zugesetzt werden kann, schien eine Desolvatation von HSA bei Kopräzipitation des Wirkstoffs durch das polare Fällungsreagenz möglich.

3.4.1. Herstellung von leeren HSA-Nanopartikeln

Die Desolvatation von HSA durch Polyethylenglykol erbrachte bei pH 6,2 ein stabiles Kolloidsystem mit einer Partikelgröße von $220,5 \pm 4,7$ nm und einem Polydispersitätsindex von $0,061 \pm 0,008$ (siehe Tabelle 13). Es wurde während der Desolvatation eine Verlangsamung der Rührgeschwindigkeit beobachtet, welche auf die Viskosität des zugegebenen gelartigen Desolvatationsreagenzes zurückzuführen war. Der geringe Zusatz von 10,1% [V/V] Ethanol zum Desolvatationsmedium wurde gewählt, um später die Zugabe des Photosensibilisators in ethanolischer Lösung zu ermöglichen.

Der Quervernetzungsgrad von 350% war erforderlich, da geringere Mengen Glutaraldehyd zu keiner Stabilisierung des Kolloidsystems führten, wie während der Aufreinigung deutlich wurde. Es ist wahrscheinlich, dass die höhere Viskosität der Lösung bei gleicher Drehgeschwindigkeit des Rührers zu geringerer Diffusion und dadurch zu verminderter Quervernetzung durch Glutaraldehyd beitrug.

Die neu hergestellten Partikel wurden aufgrund des Herstellungsverfahrens als „*PEG-desolvated HSA nanoparticles*“, kurz PD HSA-Nanopartikel bezeichnet, um sie von den ähnlich zusammengesetzten, aber auf andere Art und Weise gewonnenen Partikelsystemen (siehe 2.7.1) abzugrenzen.

3.4.2. pH-Abhängigkeit der PEG-HSA-Desolvatation

Die pH-Abhängigkeit des beschriebenen Desolvatationsprozesses wurde im Bereich zwischen pH 6 und 6,5 untersucht (siehe Abbildung 16). Es konnte gezeigt werden, dass die Partikelgröße bei niedrigeren pH-Werten deutlich zunahm, während es bei höheren pH-Werten offensichtlich zu einer verringerten Fällung mit gleichzeitigem Anstieg der Polydispersität kam, vermutlich verursacht durch die Quervernetzung des noch gelösten Proteins.

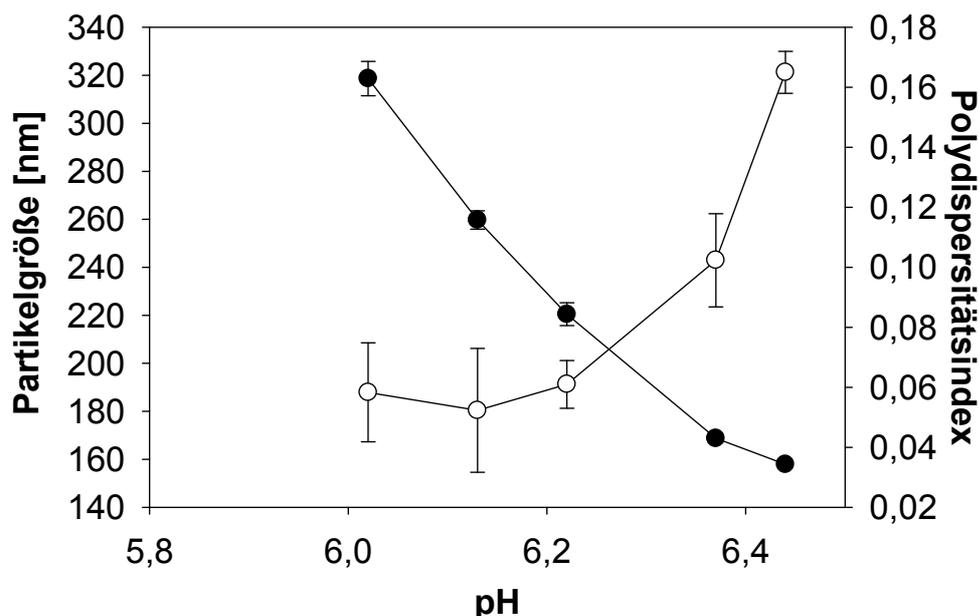


Abbildung 16: Partikelgröße (●) und Polydispersitätsindex (○) von HSA-Nanopartikeln nach Desolvatation mit Polyethylenglykol und pH-Werten zwischen 6 und 6,5.

Ein pH-Wert von 6 - 6,2 wurde als Optimum für die Fällungsreaktion ermittelt. Problematisch für diesen engen pH-Bereich ist hierbei auch die Genauigkeit der verwendeten pH-Messung in der hochkonzentrierten Proteinlösung, was sich negativ auf die Reproduzierbarkeit auswirken könnte.

3.4.3. Abhängigkeit der PEG-HSA-Desolvatation vom PEG-Volumen

In früheren Untersuchungen, wurde die Abhängigkeit der Desolvatationseffizienz vom verwendeten Volumen des Desolvatationsmittels beschrieben [13]. Nach diesem Vorbild sollte untersucht werden, welche Abhängigkeit zwischen der ermittelten Partikelgröße, Polydispersitätsindex und dem zugegebenen Volumen der PEG-Lösung besteht. Es konnte davon ausgegangen werden, dass im Fortschreiten der Untersuchungen auch die Effizienz einer möglichen Inkorporierung davon beeinflusst sein würde (siehe auch 3.3.1).

Es wurden daher verschiedene Volumina der 40%-igen PEG 4000-Lösung eingesetzt und die entstandenen Partikel nach abgeschlossener Aufreinigung auf Größe und Polydispersitätsindex untersucht (siehe Abbildung 17).

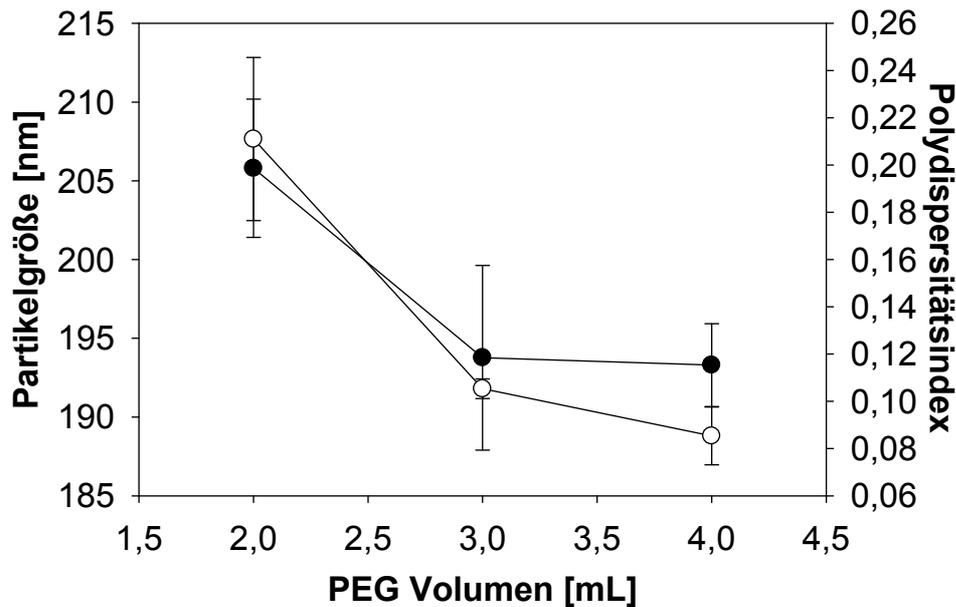


Abbildung 17: Abhängigkeit von Partikelgröße (●) und Polydispersität (○) vom eingesetzten Volumen an PEG 4000 40% [m/V] bei Desolvation von 0,9 mL einer 10%-igen HSA-Lösung (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$).

Ein höheres PEG-Volumen führt zu einer stärkeren Desolvation von humanem Serumalbumin, wie an der Intensität der Trübung nach der Zugabe deutlich erkennbar wurde. Größe und Polydispersitätsindex sind bei geringeren Volumina (bei deutlich verminderter Desolvation) erhöht, vermutlich weil Glutaraldehyd zu einer Vernetzung und Aggregation ungefällter Proteinanteile im Medium führt. Ein optimales PEG-Volumen von 4,0 mL konnte zur Durchführung der Desolvation ermittelt werden.

3.4.4. Nachweis von PEG-Rückständen im Waschüberstand

Wird Ethanol als Desolvationsreagenz verwendet, so lässt sich dieses nach 3-maliger Aufreinigung nicht mehr im Waschüberstand von HSA-Nanopartikeln nachweisen. Für Polyethylenglykol wurde aufgrund seiner hohen Viskosität und der makromolekularen Struktur ein anderes Ergebnis erwartet.

Nach Beendigung des Desolvationsprozesses wurde daher eine Bestimmung der Rückstände von Polyethylenglykol im Waschüberstand der Partikel durchgeführt, um den Endpunkt der Aufreinigung für dieses Kolloidsystem neu zu ermitteln.

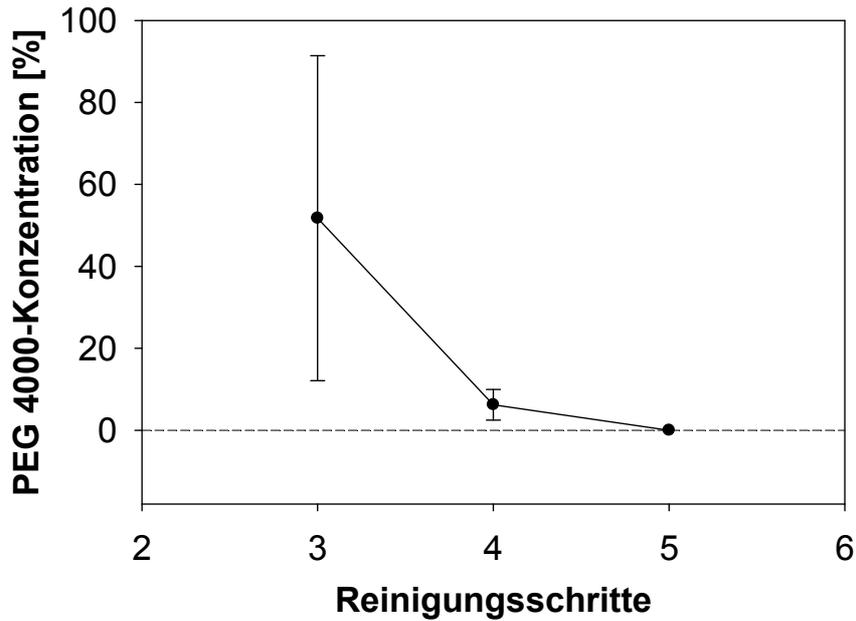


Abbildung 18: Nachweis von PEG 4000 mittels GPC in den Partikelüberständen von HSA-Nanopartikeln nach der Herstellung durch PEG-HSA-Desolvatation (Mittelwert \pm Standardabweichung.; n=3).

Nach der Desolvatation enthält das Reaktionsgefäß 5,0 mL einer Suspension mit einer PEG-Konzentration von 320 mg/mL. In Abbildung 18 ist die aus dem Überstand ermittelte prozentuale PEG-Konzentration dargestellt, wobei die errechnete Ausgangskonzentration von 320 mg/mL auf 100% gesetzt wurde. Nach 5 Waschschritten zeigt die HPLC-Analyse keinen Peak bei der Retentionszeit von PEG 4000. Die Untersuchung wurde bis zu 8 Aufreinigungsschritten ohne Detektion von PEG-Rückständen fortgesetzt.

3.4.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass HSA nach der PEG-HSA-Desolvatation in Form nicht-sphärischer Partikel mit charakteristisch kantiger Oberfläche anfällt. Es scheint, dass die Partikel eine breitere Größenverteilung aufweisen, die durch PCS nicht detektierbar war. Alle Partikel besaßen jedoch Partikeldurchmesser im nanopartikulären Bereich zwischen 150 und 300 nm (siehe Abbildung 19).

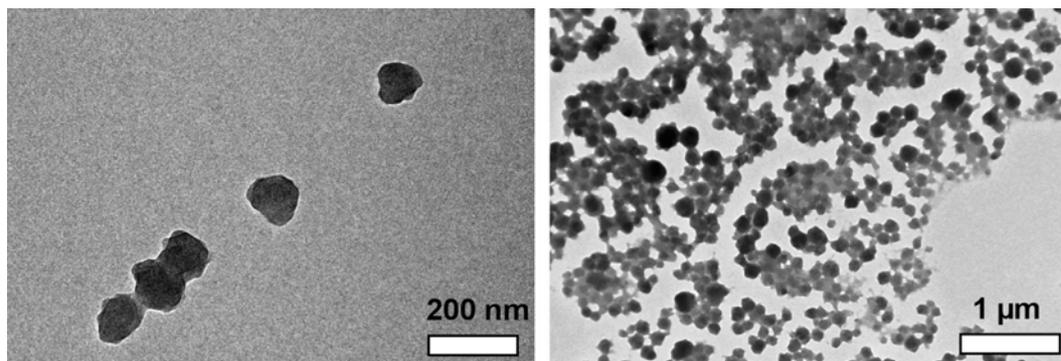


Abbildung 19: Leere PD HSA-Nanopartikel mit einem Quervernetzungsgrad von 350% und einer durch Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmten Größe von 250,7 nm und Polydispersitätsindex $< 0,1$.

Die Partikeldichte varriert hierbei deutlich, was möglicherweise auf die Einlagerung von Polyethylenglykolen in die Partikelmatrix hindeuten könnte. Es kann daher neben einer erhöhten Inkorporierung des Wirkstoffs auch auf eine Verringerung unspezifischer Zellinteraktionen der Proteinpartikel gehofft werden, wie sie bereits *in vitro* [88] und indirekt über die Zirkulationsdauer auch *in vivo* für an der Oberfläche PEGylierte Nanopartikel nachgewiesen werden konnte [52].

3.4.6. Inkorporierung mittels PEG-HSA-Desolvatation

Nachdem die Entwicklung einer stabilen nanopartikulären Trägermatrix aus humanem Serumalbumin durch PEG-HSA-Desolvatation erreicht werden konnte, sollte dieses neuartige Verfahren im nächsten Schritt zur Inkorporierung von mTHPP in das Kolloidsystem verwendet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Herstellung von HSA-Nanopartikeln durch Desolvatation mit PEG in Gegenwart von mTHPC (Mittelwert \pm Standardabweichung; n=3).

Versuchsbedingungen	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung mTHPP / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
Kein Wirkstoff	220,5 \pm 4,7	0,061 \pm 0,008	-
0,26 mg/mL mTHPC	226,9 \pm 20,1	0,060 \pm 0,008	1,00 \pm 0,26
0,52 mg/mL mTHPC	227,5 \pm 14,3	0,080 \pm 0,009	1,52 \pm 0,37
0,78 mg/mL mTHPC	237,5 \pm 8,6	0,080 \pm 0,009	2,01 \pm 0,15

Obwohl das Ausfallen des Wirkstoffs, während des Desolvatationsprozesses, ebenso wie die Eintrübung des Mediums infolge der Proteinfällung beobachtet werden konnte, kam es nicht zu einer Inkorporierung des Wirkstoffs im Trägermaterial. Die gezeigte Partikelbeladung geht wahrscheinlich auf Rückstände gefällten Wirkstoffs im Kolloidsystem zurück, welche sich durch mehrfaches Aufreinigen nicht entfernen ließen. Anhand dieser Ergebnisse war nicht davon auszugehen, dass eine Verbesserung der Inkorporierung durch eine Steigerung der Arzneistoffkonzentration herbeigeführt werden könnte.

Für die Inkorporierung des Arzneistoffs in die Trägermatrix wurden in den vorangegangenen Versuchen zwei Strategien verfolgt. Einerseits sollte durch den Einsatz von Hilfsstoffen die Einbettung in das Protein verbessert werden (siehe 2.8.4) und andererseits durch eine Verringerung der Affinität zum umgebenden Medium eine erhöhte Anlagerung an der Trägermatrix erzielt werden. Da trotz anfänglicher Erfolge (wie z.B. der Komplexierung des Wirkstoffs durch Cyclodextrine, oder der Entwicklung eines hydrophilen Desolvatationsverfahrens) keines der entwickelten Verfahren zu einer deutlich erhöhten Arzneistoffbeladung infolge der Inkorporierung führte, wurden die Versuche zur inkorporativen Bindung der Arzneistoffe an HSA-Nanopartikel abgeschlossen.

3.5. Kovalente Bindung von Photosensibilisatoren an HSA-Nanopartikel

Mit der Optimierung der adsorptiven Arzneistoffbindung an HSA-Nanopartikel konnte ein kolloidales Trägersystem für die Photodynamische Therapie etabliert werden. Dennoch wurden aus den dargestellten Ergebnissen auch die Nachteile der Formulierungen von mTHPP und mTHPC ersichtlich.

Trotz Implementierung verschiedenster, neuartiger Arbeitstechniken zur nanopartikulären Formulierung von Arzneistoffen, war keine deutliche Erhöhung der Partikelbeladung zu erreichen. Weiterhin beruht die adsorptive Bindung auf unspezifischen Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche, weshalb von einer geringen Stabilität *in vivo* auszugehen ist, worauf die Desorptionsuntersuchungen in den verschiedenen Zellkulturmedien hindeuten (siehe 3.2.10). Eine vergleichbare oder höhere Arzneistoffbeladung, ließ sich durch Inkorporierung von Photosensibilisatoren nicht erreichen, weshalb die entstandenen Trägersysteme keine Eignung für weitere Untersuchungen besaßen.

Es sollte daher die kovalente Bindung von Photosensibilisatoren an das Trägermaterial HSA untersucht werden, wofür zunächst das Porphyrinderivat mTHPP-COOH zur Verfügung stand.

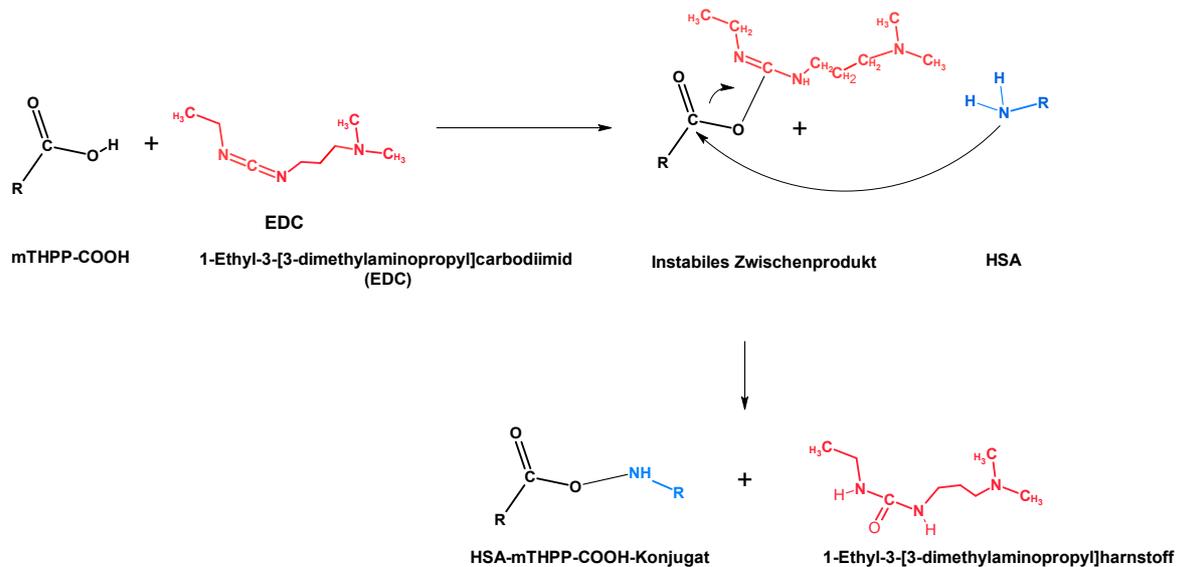


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Reaktion von EDC mit HSA und mTHPP-COOH unter Bildung einer Amidbindung

Der Crosslinker 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid (EDC) ist ein bekannter Bindungsvermittler zwischen Aminogruppen und Carboxylfunktionen unter Ausformung einer Amidstruktur (siehe Abbildung 20) [113, 114]. Eine Oberflächenmodifikation von Albuminpartikeln mittels EDC wurde in der Literatur bereits beschrieben [19, 106] und sollte für die Formulierungsentwicklung angewendet werden.

3.5.1. Voruntersuchungen zur kovalenten Bindung von mTHPP-COOH

Um die Reaktionsprodukte der Gelpermeationschromatographie zugänglich zu machen, wurde in einer Voruntersuchung die Bindung von mTHPP-COOH an gelöstes Albumin untersucht. Dies ermöglichte den Nachweis der kovalenten Bindung unter Vermittlung durch EDC.

Die Herstellung der fertigen Zubereitung von mTHPP-COOH erfolgte erst nach Fällung des Proteins und Ausformung von HSA-Nanopartikeln (siehe 2.10.2 und 2.10.3), da sich die Konjugate schlecht isolieren und desolvatisieren ließen.

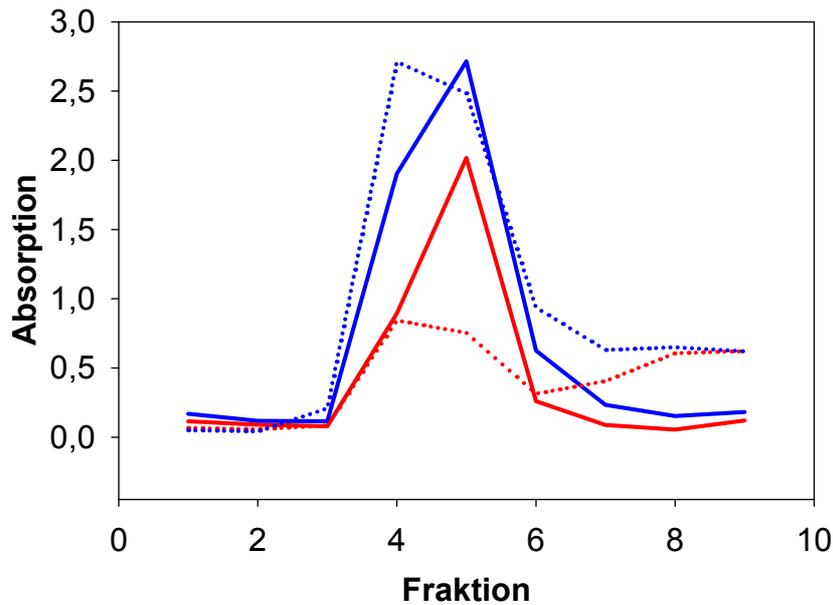


Abbildung 21: Fraktionierung von HSA-mTHPP-COOH-Konjugaten nach EDC-Reaktion. Aufgetragen sind die Extinktionen bei 512,2 nm (Porphyrinabsorption, —) und bei 280 nm (Proteinabsorption, —) mit EDC (—) und ohne EDC (•••).

Nach Inkubation des Arzneistoffes mit Albumin und EDC wurden die Reaktionsprodukte auf einer SEC D-Salt™ Dextran Desalting Column vorfraktioniert und der Gehalt der Fraktionen photometrisch ausgewertet. In Abbildung 21 ist das Ergebnis der Trennung dargestellt. Ohne Zugabe des Crosslinkers eluiert nur ein geringer Teil des Photosensibilisators, jedoch das gesamte Protein in den Fraktionen 4 - 6, während nach Zugabe des Crosslinkers verstärkt Arzneistoff in diesen Fraktionen nachzuweisen ist.

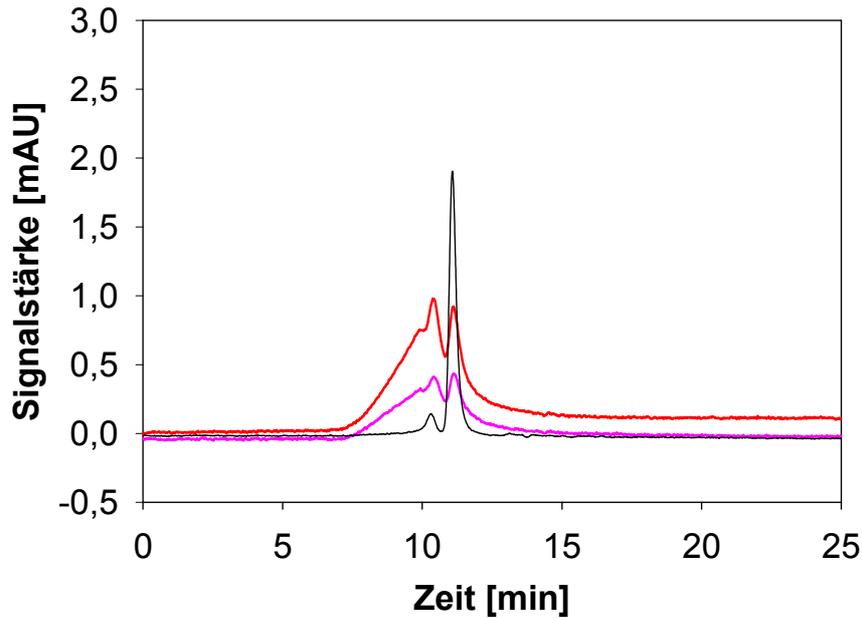


Abbildung 22: GPC-Chromatogramme der Reaktionsprodukte von freiem HSA mit mTHPP-COOH in PBS 6,6 unter Vermittlung durch Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) unter Verwendung eines 5-fachen- (—) und 10-fachen (—) molaren Überschusses EDC sowie HSA (100 µg/mL, —) als Standard. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 280 nm.

Alle gesammelten Fraktionen wurden auf einem Agilent System mittels Gelpermeationschromatographie näher untersucht. Bei 280 nm ist mit steigender EDC-Konzentration eine Verbreiterung des HSA-Peaks feststellbar. Die Verbreiterung ist wahrscheinlich auf die Bindung von Arzneistoffmolekülen und eine damit verbundene Veränderung des Molekulargewichts zurückzuführen.

Untersuchungen in einem Merck-Hitachi-GPC-System im Wellenlängenbereich von 200-600 nm (Diodenarraydetektor) ergaben, dass der Photosensibilisator an oligomere Proteinstrukturen gebunden vorlag. Der starke Proteincrosslink führt hierbei zu einer deutlichen Verkürzung der Retentionszeit und ist vermutlich ein Ergebnis der Ausbildung von Amidstrukturen zwischen Carboxyl- und Aminofunktionen des HSA-Moleküls (siehe Abbildung 20).

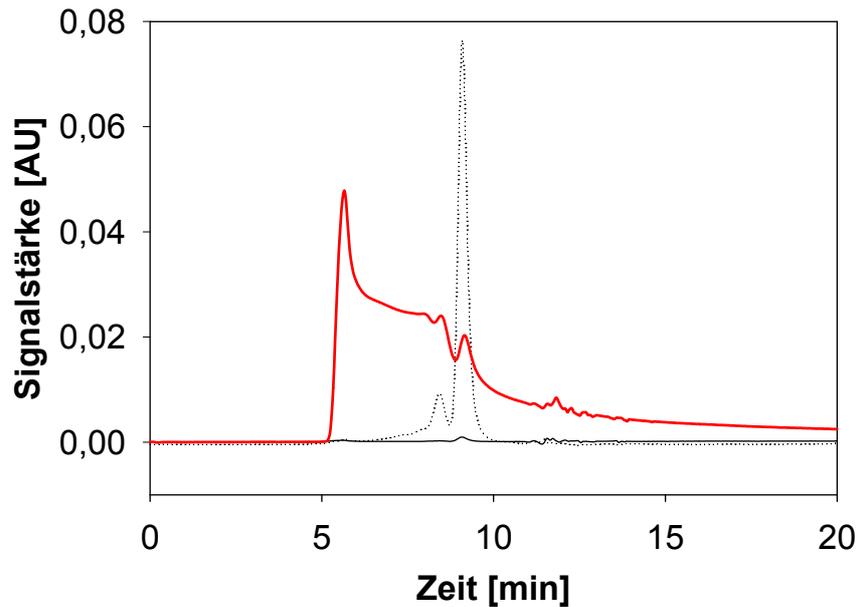


Abbildung 23: Overlay der GPC-Chromatogramme von Fraktion 4 der mTHPP-COOH-HSA-Konjugate (—) bei 420 nm (Porphyrinabsorption) und HSA bei 280 nm (•••) und 420 nm (—).

Die Reaktion zwischen Albumin und Arzneistoffmolekülen führt zu einer Vielzahl von verschiedenen Reaktionsprodukten, wie anhand des breiten Porphyrinpeaks zu erkennen ist (siehe Abbildung 23).

Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da HSA mit seinen 60 freien Aminogruppen (59 Lysinreste und 1 endständige Aminogruppe) und 99 Carboxylgruppen (36 Asparaginsäurereste, 62 Glutaminsäurereste und 1 endständige Säuregruppe) sowohl die Bindung mehrerer Arzneistoffmoleküle, als auch die Reaktion von einem oder mehreren HSA-Molekülen untereinander erlaubt.

3.5.2. Voruntersuchungen zur kovalenten Bindung von mTHPC

In den Ergebnissen der photophysikalischen Charakterisierung von mTHPP wird dargelegt (siehe unten), dass der Wirkstoff einen geringeren Extinktionskoeffizienten besitzt als das Derivat mTHPC (siehe 3.7.2). Auch die photodynamische Aktivität der Chlorine ist aufgrund der veränderten optischen Eigenschaften deutlich verbessert [115]. Das carboxylierte Porphyrinderivat mTHPP-COOH bildet hier keine Ausnahme, weshalb auch die Einbettung von mTHPC durch kovalente Modifikation von HSA-Nanopartikeln vorangetrieben werden sollte.

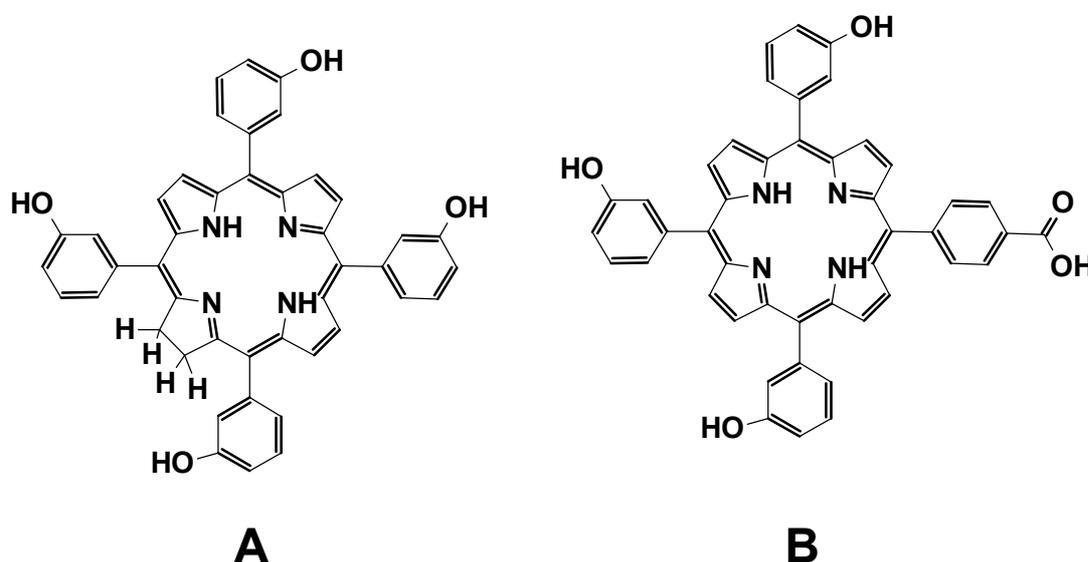


Abbildung 24: Strukturformeln der beiden Wirkstoffe mTHPC (A) und mTHPP-COOH (B)

Ein dem mTHPP-COOH vergleichbarer Ablauf der Reaktion zwischen mTHPC und HSA ist aufgrund des strukturellen Unterschieds der beiden Wirkstoffe (siehe Abbildung 24) nicht möglich. In der Literatur wurde jedoch die Vermittlung einer Esterbindung zwischen Carboxylfunktionen und Phenolen für andere Carbodiimide beschrieben [116], ebenso wie die Verwendung von EDC als Crosslinker für HSA-Nanopartikel [106]. Es stehen daher mehrere Mechanismen für die Bindung des Chlorins an das Partikelsystem zur Verfügung. Einerseits führt der Einsatz von EDC zu einer zusätzlichen Quervernetzung des Partikelkolloids, was auch das Austreten eindiffundierter Wirkstoffe erschweren sollte, und andererseits ist eine direkte kovalente Bindung des Wirkstoffes an HSA durch den Crosslinker möglich.

Für mTHPC sollte in ersten Voruntersuchungen, analog der Bindung von mTHPP-COOH an HSA, die kovalente Bindung des Arzneistoffes nachgewiesen werden. Dafür wurde mTHPC unter den gleichen Bedingungen an das Protein gebunden, aufgereinigt und die Fraktionen mittels Gelpermeationschromatographie untersucht. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der kovalenten Bindung dargestellt.

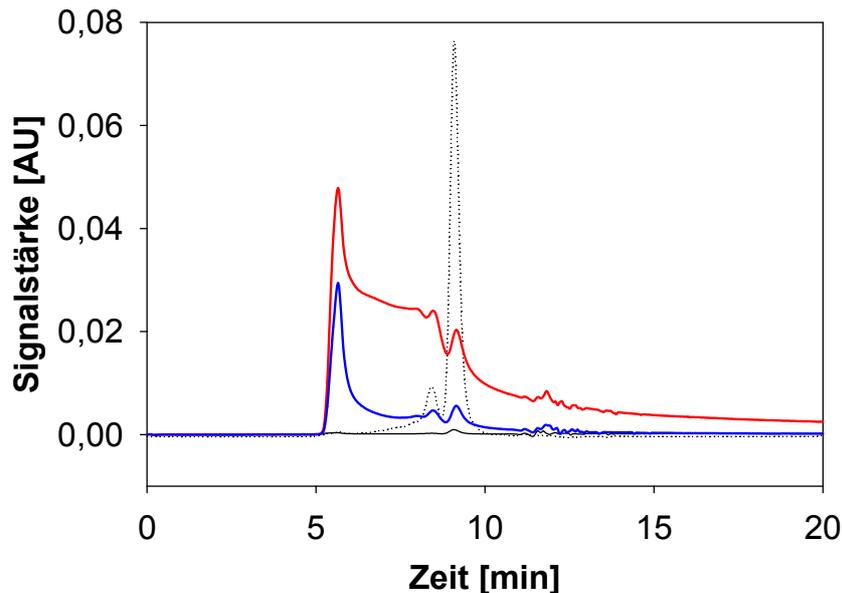


Abbildung 25: Overlay der GPC-Chromatogramme von Fraktion 4 der mTHPP-COOH-HSA-Konjugate (—) bzw. mTHPC-Konjugate (—) bei 420 nm (Porphyrinabsorption) und HSA bei 280 nm (•••) und 420 nm (—).

Auch in diesem Fall eluiert der Wirkstoff zeitgleich mit dem Protein, was darauf hindeutet, dass eine kovalente Bindung stattgefunden hat. Die Bindung fällt jedoch gemäß den Erwartungen deutlich geringer aus, als bei dem carboxylierten Derivat.

Wie bereits bei der Bindungsreaktion von mTHPP-COOH findet eine Quervernetzung des Proteins statt, welche aufgrund der geringeren Beteiligung des Wirkstoffs an den induzierten Reaktionen noch deutlich erhöht sein sollte. Die gebildeten Oligomere des Proteins zeigen dann eine deutliche Verkürzung der Retentionszeit im Chromatogramm.

Abschließend kann daher vermutet werden, dass die kovalente Bindung beider Wirkstoffe an gelöstes HSA erfolgreich verlief, auch wenn nach der

Aufreinigung keine ausreichende Menge dieser Konjugate zur Verfügung stand um die Desolvatation im Anschluss an die Konjugation durchzuführen. Die EDC-Reaktion führt zu einer Vielzahl verschiedener Reaktionsprodukte, die aufgrund der Proteinquervernetzung mitunter partikulär anfallen. Eine kontrollierbare Fällung dieser Konjugate konnte nicht erreicht werden.

Im nächsten Schritt sollte die Bindung der beiden Wirkstoffe an HSA-Nanopartikel untersucht werden.

3.5.3. Kovalente Bindung an HSA-Nanopartikel

Beginnend mit der kovalenten Bindung des Porphyrinderivates, wurden zuvor durch Desolvatation hergestellte HSA-Nanopartikel mit den beiden Photosensibilisatoren oberflächenmodifiziert.

Die eingesetzten Leerpartikel für die Umsetzung von mTHPP-COOH waren zu 100% mit Glutaraldehyd quervernetzt. Ihre Größe betrug $223,7 \pm 2,1$ nm und sie besaßen einen Polydispersitätsindex von $0,022 \pm 0,022$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$). Die Umsetzung wurde mit einer Inkubationsdauer von 60 Minuten bei 3 verschiedenen EDC-Konzentrationen (entsprechend einem 2,5-fachen, 5-fachen oder 10-fachen molaren Überschuss, bezogen auf die eingesetzte Arzneistoffkonzentration) durchgeführt.

Der Arzneistoffgehalt des Kolloidsystems wurde, wie bereits bei adsorptiv beladenen HSA-Nanopartikeln nach enzymatischem Abbau der Trägermatrix mit Pepsin bestimmt (siehe auch 2.7.5). Um auch die entstandenen Proteinkonjugate von mTHPP-COOH und mTHPC zu spalten, wurde nach erfolgtem enzymatischem Abbau eine basische Hydrolyse der entsprechenden Bindungen durchgeführt.

Die Partikelgröße, Polydispersitätsindices und erreichte Partikelbeladung sowie die Bedingungen der Umsetzung sind in Tabelle 14 dargestellt. Innerhalb der geringen Reaktionszeit konnte nur eine geringfügige Erhöhung der Beladung, verglichen mit der Umsetzung durch adsorptive Bindung erreicht werden.

Weder Partikelgröße noch Polydispersitätsindex wurden dadurch signifikant verändert.

Tabelle 14: Charakterisierung von HSA-Nanopartikeln nach Reaktion mit mTHPP-COOH unter Vermittlung von Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) nach 60 min Inkubationszeit und verschiedenen EDC-Überschüssen (2,5-facher, 5-facher oder 10-facher molarer Überschuss).

Versuchsbedingungen	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung mTHPP-COOH / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
2,5-facher EDC-Überschuss			
10 mg HSA-Nanopartikel mTHPP-COOH 1 mg/mL Ethanol 52,4% [V/V]	220,0 \pm 5,8	0,041 \pm 0,020	14,04 \pm 1,77
5-facher EDC-Überschuss			
10 mg HSA-Nanopartikel mTHPP-COOH 1 mg/mL Ethanol 52,4% [V/V]	199,4 \pm 1,5	0,026 \pm 0,014	19,83 \pm 1,66
10-facher EDC-Überschuss			
10 mg HSA-Nanopartikel mTHPP-COOH 1 mg/mL Ethanol 52,4% [V/V]	201,1 \pm 3,1	0,019 \pm 0,005	27,31 \pm 2,60

In der Literatur sind Reaktionszeiten von bis zu 24 h für eine Oberflächenmodifikation der Partikel mit Cystamin beschrieben [19]. Die Umsetzung mit dem lipophilen Arzneistoff scheint jedoch größeren Einfluss auf die Aggregationsneigung des Kolloidsystems zu besitzen (siehe 3.5.4).

Für mTHPC wurden Partikel mit einer Größe von 268,8 \pm 7,7 nm und einen Polydispersitätsindex von 0,041 \pm 0,009 (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3) verwendet.

Tabelle 15: Charakterisierung von HSA-Nanopartikeln nach Reaktion mit mTHPC unter Vermittlung von Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) nach 60 min Inkubationszeit und verschiedenen EDC-Überschüssen (2,5-facher, 5-facher oder 10-facher molarer Überschuss).

Versuchsbedingungen	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung mTHPC / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
2,5-facher EDC-Überschuss			
10 mg HSA-Nanopartikel mTHPC 1 mg/mL Ethanol 62,3% [V/V]	266,6 \pm 5,9	0,053 \pm 0,022	16,2 \pm 0,9
5-facher EDC-Überschuss			
10 mg HSA-Nanopartikel mTHPC 1 mg/mL Ethanol 62,3% [V/V]	283,3 \pm 6,3	0,032 \pm 0,011	17,2 \pm 3,7
10-facher EDC-Überschuss			
10 mg HSA-Nanopartikel mTHPC 1 mg/mL Ethanol 62,3% [V/V]	265,0 \pm 6,5	0,021 \pm 0,009	18,5 \pm 0,9

Die untersuchten Reaktionsbedingungen waren denen des Porphyrinderivates vergleichbar. Die Arzneistoffbindung fiel jedoch erwartungsgemäß geringer aus, was aufgrund der chromatographischen Untersuchung bereits vermutet wurde.

Während die Umsetzung von gelöstem HSA mit Photosensibilisatoren zu einer deutlichen Proteinquervernetzung führte, war für die verwendeten HSA-Nanopartikel bei keiner der gewählten EDC-Konzentrationen eine Veränderung der Größe bzw. des Polydispersitätsindex feststellbar. Dafür kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Bei Herstellung der Nanopartikel durch Desolvatation (siehe 2.7.1) wird der Crosslinker Glutaraldehyd für die chemische Stabilisierung des Kolloidsystems verwendet. Dies führt zu einer starken Verminderung der freien Aminogruppen auf der Partikeloberfläche, wodurch diese nicht mehr für die interpartikulären Vernetzungs- und Aggregationsreaktionen zur Verfügung stehen [19], welche durch EDC induziert würden. Gleichzeitig können freie Aminogruppen, welche sich in der Porenstruktur, unter der Oberfläche der Nanopartikel verbergen, aufgrund

sterischer Hinderung nicht an solchen Reaktionen teilnehmen. Die starre Partikelstruktur verringert dabei die Beweglichkeit der zur Verfügung stehenden Bindungspartner. Des Weiteren führen die Abstoßungskräfte zwischen den Nanopartikeln zu einer Verringerung der Reaktionswahrscheinlichkeit.

3.5.4. Zeitabhängigkeit der kovalenten Modifikation

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse (siehe 3.5.3) wurde in allen folgenden Versuchen ein 10-facher molarer Überschuss an EDC (berechnet im Bezug auf die Arzneistoffkonzentration) für die Beladung der HSA-Nanopartikel verwendet. Bei diesem Überschuss wurde die höchste Arzneistoffbindung ohne Veränderung des Polydispersitätsindex festgestellt.

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgte weiterhin durch Betrachtung der Partikelbeladung in Abhängigkeit der Reaktionszeit, wobei die Nanopartikel zwischen 60 und 300 min in Gegenwart von EDC mit Arzneistoff inkubiert wurden. Für mTHPP-COOH wurde nach 300 min eine maximale Beladung von über 40 µg pro mg HSA erreicht, wobei mit jeder Verlängerung der Inkubationsdauer auch Zuwächse in der Arzneistoffbindung zu verzeichnen waren. Für mTHPC betrug die maximale Beladung etwa 20 µg/mg. Nach 180 min trat dabei eine Sättigung des Kolloidsystems ein und durch Verlängerung der Inkubationsdauer konnte kein weiterer Zuwachs mehr in der Arzneistoffbindung verzeichnet werden (siehe Abbildung 26). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Standardprotokoll für die Arzneistoffbeladung etabliert, welches eine Inkubationszeit von 180 min als Optimum festlegte.

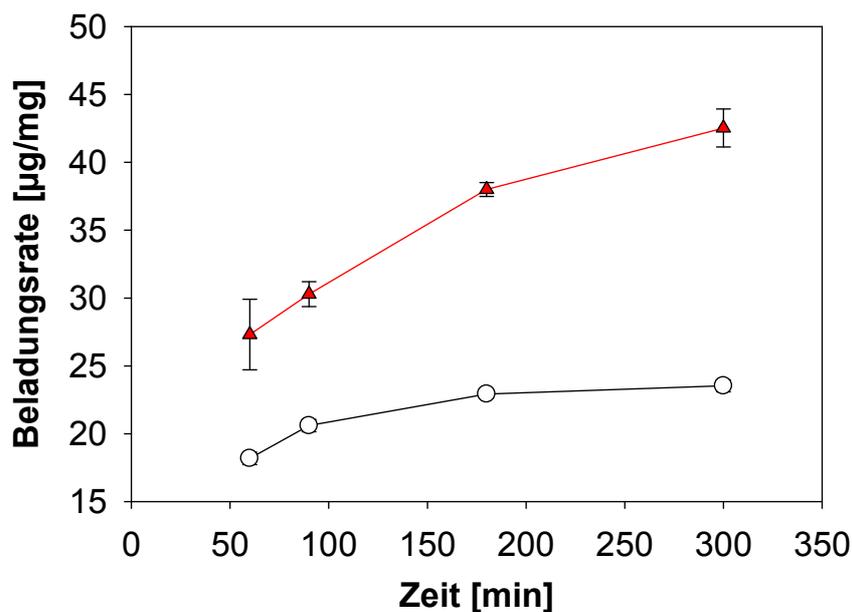


Abbildung 26: Beladungsrate von HSA-Nanopartikeln mit mTHPC (—○—) und mTHPP-COOH (—▲—), abhängig von der Inkubationszeit (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$).

Die maximale Inkubationsdauer von 300 min wurde für die Untersuchung der Beladung von HSA-Nanopartikeln nicht überschritten, da in einzelnen Messungen bei längerer Inkubation ein Anwachsen der Polydispersitätsindices über 0,1 festgestellt wurde. Es kann daher von einer Aggregation des Partikelsystems und Instabilität der entwickelten Formulierung, bei längerer Inkubationsdauer ausgegangen werden.

Obwohl das Chlorin im Vergleich schlechtere Bindungsraten zeigte als mTHPP-COOH, sollte auch die entwickelte Formulierung von mTHPC in Vorbereitung für die *in vitro*-Untersuchungen weiter charakterisiert werden, da das Chlorin einen Photosensibilisator mit deutlich höherer photodynamischer Aktivität darstellt.

3.5.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für den Nachweis eines stabilen Partikelsystems wurden die kovalent modifizierten HSA-Nanopartikel im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Abbildung 27 zeigt mTHPC-HSA-Nanopartikel, welche auch nach Umsetzung mit dem Arzneistoff keine Anzeichen der Aggregatbildung bzw. kristalliner Arzneistoffrückstände zeigten.

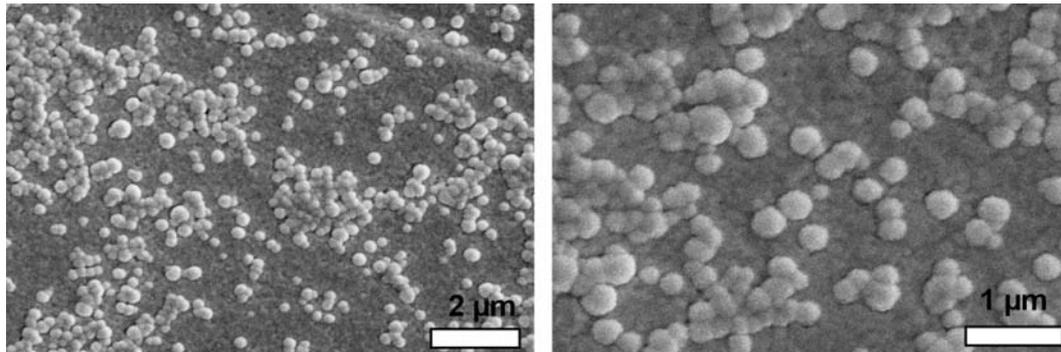


Abbildung 27: HSA-Nanopartikel nach Umsetzung mit mTHPC (180 min) (siehe 2.10.4) auf Filtermembran (Oberseite) Millipore VSWP 0,025 µm. Arbeitsabstand 10 mm, Anregungsspannung 10-20 kV, Vergrößerung 10000-fach, 50000-fach.

Dies belegt, dass das für die Partikelbeladung gewählte Protokoll keinen negativen Einfluss auf die Stabilität des kolloidalen Trägers besitzt.

3.5.6. Gefriertrocknung kovalent modifizierter HSA-Nanopartikel

Im Anschluss an die Entwicklung der kovalent modifizierten Arzneistoffträger wurden die hergestellten Partikelzubereitungen gefriergetrocknet um die Lagerfähigkeit zu erhöhen.

In wässriger Suspension besteht das Risiko der Hydrolyse eingeführter Bindungen bzw. des Austretens von Arzneistoff aus der durch EDC zusätzlich stabilisierten Partikelmatrix.

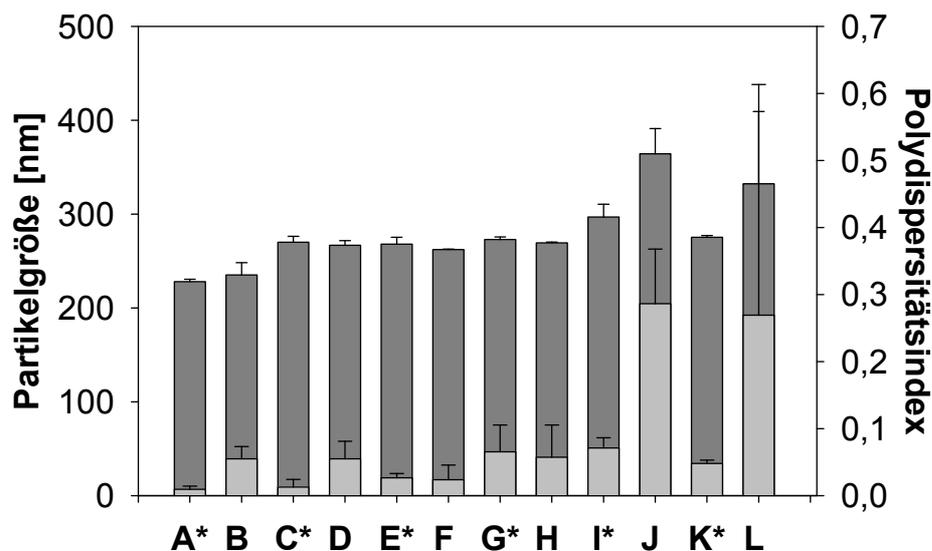


Abbildung 28: Partikelgröße (■) und Polydispersitätsindex (■) von mTHPC-HSA-Nanopartikeln bzw. mTHPP-COOH-HSA-Nanopartikeln (*) nach einer Lagerzeit von 1 Tag (A bzw. G), 3 Wochen (C bzw. I) und 6 Wochen (E bzw. K) bei 4 °C in 3%-iger wässriger Saccharoselösung sowie Zubereitungen gleicher Zusammensetzung nach Gefriertrocknung. Die gefriergetrockneten Formulierungen wurden nach einer Lagerzeit von 1 Tag (B bzw. H), 3 Wochen (D bzw. J), and 6 Wochen (F bzw. L) in gereinigtem Wasser resuspendiert. (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 3).

Die Bedingungen der Gefriertrocknung entsprachen den für die adsorptiv beladenen HSA-Nanopartikel gewählten Parametern (siehe 2.7.13).

Während mTHPC-HSA-Nanopartikel auch nach einer maximalen Lagerzeit von 6 Wochen keine Veränderung in Größe und Polydispersitätsindex aufwiesen, zeigten sich bei mTHPP-COOH-HSA-Nanopartikeln bereits nach 3 Wochen Anzeichen der Aggregation, welche sich in einer Vergrößerung der Partikel und einem erhöhten Polydispersitätsindex widerspiegeln (siehe Abbildung 28 J und L). Die Kontrollproben wurden über denselben Zeitraum in 3%-iger wässriger Saccharoselösung gelagert und zeigten keine Instabilität im beschriebenen Zeitraum. Dieser Unterschied der beiden Formulierungen ist höchstwahrscheinlich auf die deutlich höhere Arzneistoffbeladung der porphyrinbeladenen Partikel zurückzuführen, welche eine starke Lipophilisierung der Partikeloberfläche mit Verstärkung interpartikulärer Interaktionen nach sich ziehen könnte.

3.6. Cetuximab-modifizierte HSA-Nanopartikel

Mit der Gefriertrocknung von kovalent modifizierten mTHPC-HSA-Nanopartikeln wurde die Entwicklung eines kolloidalen Trägersystems mit erhöhter Stabilität und langer Lagerfähigkeit umgesetzt. Desorptionsuntersuchungen, wie sie für adsorptiv beladene HSA-Nanopartikel durchgeführt wurden, waren für die neuentwickelten Trägersysteme nicht erforderlich, da die Aufreinigungsschritte zum Teil in Ethanol durchgeführt wurden (siehe 2.10.4), ein Lösungsmittel, das die Desorption von Photosensibilisatoren begünstigt.

Die Gewebeselektivität der bislang erforschten Kolloidsysteme wird allein durch die Partikelgröße beeinflusst. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Partikel mit einem Durchmesser zwischen 150 und 300 nm im lockeren Zellverband der schnellwachsenden Tumore akkumulieren. Durch Bindung eines „*Drug Targeting*“-Liganden kann, wie bereits dargelegt (siehe auch 1.2.7), die Aufnahme eines Arzneistoffträgersystems in den Tumor weiter gesteigert werden.

Dieses bekannte Prinzip, welches bereits vielfach Anwendung fand [20, 32, 37, 88], sollte nun auf den therapeutischen EGFR-Antikörper Cetuximab übertragen werden (siehe 1.4.4).

3.6.1. Charakterisierung des thiolierten Antikörpers

Die Herstellung von Antikörper-modifizierten HSA-Nanopartikeln erfolgte durch Thiolierung des IgG-Antikörpers unter Verwendung von Traut's Reagenz (2-Iminoethanol) und anschließende Bindung an die Partikeloberfläche mittels eines heterobifunktionalen Crosslinkers (siehe Abbildung 29).

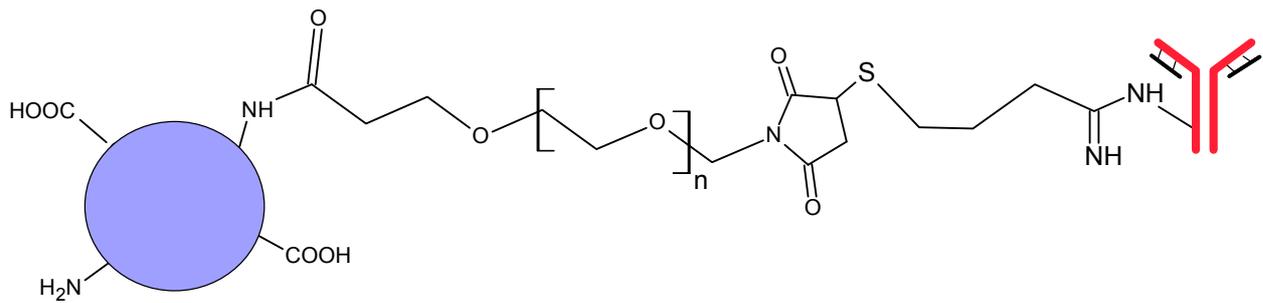


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Antikörperbindung an HSA-Nanopartikel unter Verwendung eines heterobifunktionalen Crosslinkers und Traut's Reagenz für die Thiolierung.

Vor Übertragung dieser Methode auf Cetuximab erfolgte die Untersuchung der Dimerisierung des Antikörpers unter den gewählten Thiolierungsbedingungen mittels Gelpermeationschromatographie. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bei Verlängerung der Inkubationsdauer im Thiolierungsmedium eine fortschreitende Dimerisierung, wahrscheinlich durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Antikörpermolekülen, eintritt. Die Bedingungen der Thiolierung wurden in Arbeiten von Steinhauser et al. so modifiziert, dass es zu einer maximalen Thiolierungseffizienz bei minimaler Dimerisierung des Antikörpermoleküls kommt.

Cetuximab zeigte unter den gewählten Bedingungen (2-stündige Inkubation bei 50-fachem, molarem Überschuss an Traut's Reagenz) keine verstärkte Dimerisierung, wie aus Abbildung 30 hervorgeht. Das Dimer des Antikörpers besitzt eine Retentionszeit von 7,73 Minuten und ist nach der Thiolierung (rot) nur schwach erkennbar, während das Monomer bei 8,53 Minuten eluiert.

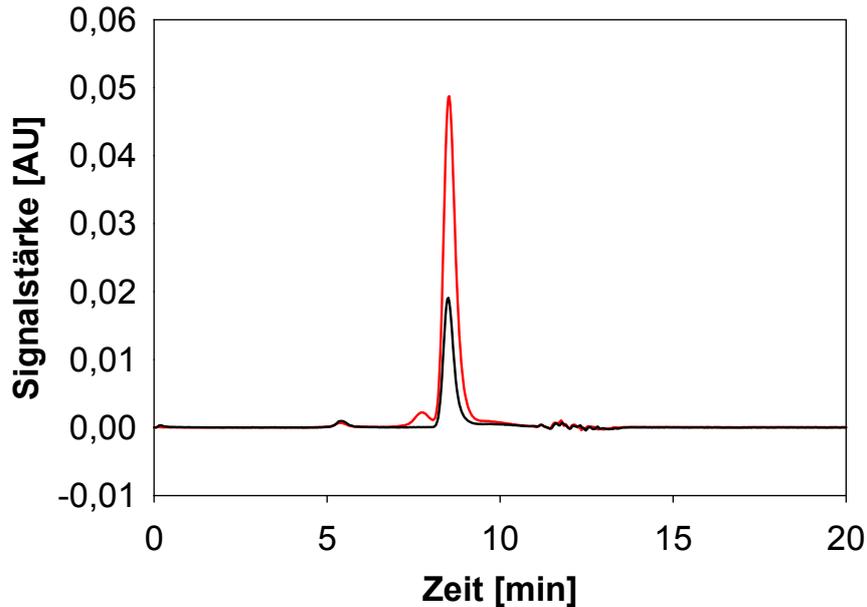


Abbildung 30: GPC-Chromatogramm des IgG-Antikörpers Cetuximab (■) und des thiolierten Antikörpers (■).

3.6.2. Herstellung von Cetuximab-beladenen HSA-Nanopartikeln

Im ersten Schritt wurden leere HSA-Nanopartikel mit Cetuximab oberflächenmodifiziert, um eine Verbesserung der gezielten Zellaufnahme durch den Antikörper zu erwirken. Anschließend erfolgte eine Modifikation von mTHPC-HSA-Nanopartikeln mit dem Antikörper, wodurch die Zellanreicherung des Arzneistoffs verbessert werden sollte. Die Kontrollzubereitungen wurden mit einem IgG-Antikörper ohne Target sowie mit einem monofunktionalen PEG-Reagenz umgesetzt. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Oberflächenmodifikation mit Polyethylenglykolen im Allgemeinen zu einer Verringerung der Zellinteraktion führt [88].

Die verwendeten Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer Größe, Polydispersität, Arzneistoff- und Antikörperbeladung charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Charakteristika von Antikörper-modifizierten HSA-Nanopartikeln. Die Partikel wurden mit Cetuximab, IgG und monofunktionalem Crosslinker umgesetzt (n=6, Mittelwert \pm Standardabweichung).

Versuchsbedingungen	Partikelgröße [nm]	Polydispersitätsindex	Beladung mTHPC / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	Beladung Antikörper / HSA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
Cetuximab-mod. HSA-Nanopartikel	241,0 \pm 15,8	0,057 \pm 0,068	-	19,21 \pm 2,41
IgG-mod. HSA-Nanopartikel	241,3 \pm 24,4	0,033 \pm 0,027	-	16,52 \pm 3,15
PEG-mod. HSA-Nanopartikel	239,7 \pm 25,7	0,021 \pm 0,011	-	-
Cetuximab-mod. mTHPC-HSA-Nanopartikel	227,0 \pm 11,7	0,048 \pm 0,001	18,7 \pm 0,6	18,38 \pm 1,45
IgG-mod. mTHPC-HSA-Nanopartikel	230,6 \pm 8,3	0,033 \pm 0,027	18,7 \pm 0,6	16,39 \pm 4,35
PEG-mod. mTHPC-HSA-Nanopartikel	219,7 \pm 10,1	0,029 \pm 0,009	18,7 \pm 0,6	-

In der Literatur ist eine Vergrößerung der HSA-Nanopartikel bei Modifikation mit einem IgG-Antikörper um etwa 20 nm beschrieben [32], eine Beobachtung, welche in der Tendenz bestätigt werden konnte, obgleich die Detektion eines solch geringen Größenunterschieds mittels Photonenkorrelations-spektroskopie nur wenig Aussagekraft besitzt.

Nach abgeschlossener Bindungsreaktion wurde der Antikörpergehalt indirekt aus dem Partikelüberstand bestimmt. Hierbei wurde eine Bindung von 100% erreicht. Im Überstand war kein Antikörper mehr nachweisbar.

3.6.3. „Labeling“ von mTHPC-HSA-Nanopartikeln mit 5-TAMRA

Aus ersten *in vitro*-Untersuchungen der gezeigten Partikelsysteme an LS174T- und DiFi-Zellen, welche am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert durchgeführt wurden, ging hervor, dass keine gesteigerte Zellinteraktion zwischen Zielzellen und Nanopartikeln durch Aufbringen des Antikörpers Cetuximab auf mTHPC-HSA-Nanopartikel erwirkt werden konnte, wohl aber für leere HSA-Nanopartikel (siehe 3.7). Es konnte daher vermutet werden, dass die der Antikörperbindung zugrunde liegende Reaktion aufgrund der durch Photosensibilisatoren veränderten Partikelstruktur nicht, oder nur unvollständig abläuft. Obwohl im Überstand der Partikel nach Inkubation mit dem thiolierten Antikörper keine Rückstände von Cetuximab mehr nachweisbar waren, sollte daher die Reaktion durch Bindung des Farblabels 5-TAMRA in Form seines NHS-Esters an das mTHPC-modifizierte Trägersystem untersucht werden. Die zugrunde liegende Reaktion entspricht der Bindungsreaktion des PEG-Crosslinkers an HSA-Nanopartikel. Die 5-TAMRA-modifizierten Partikel besaßen eine Größe von $230,3 \pm 4,1$ nm und einen Polydispersitätsindex von $0,023 \pm 0,006$. Es wurde keine signifikante Veränderung der Partikelgröße oder des Polydispersitätsindex durch die Konjugation festgestellt. Im Laufe der Reaktion wurden $2,56 \pm 1,21$ µg 5-TAMRA pro mg Partikelmasse gebunden.

Nach erfolgter Aufreinigung des Partikelsystems in Aceton und gereinigtem Wasser konnte von einer vollständigen Desorption nicht kovalent gebundener Anteile des Farblabels ausgegangen werden.

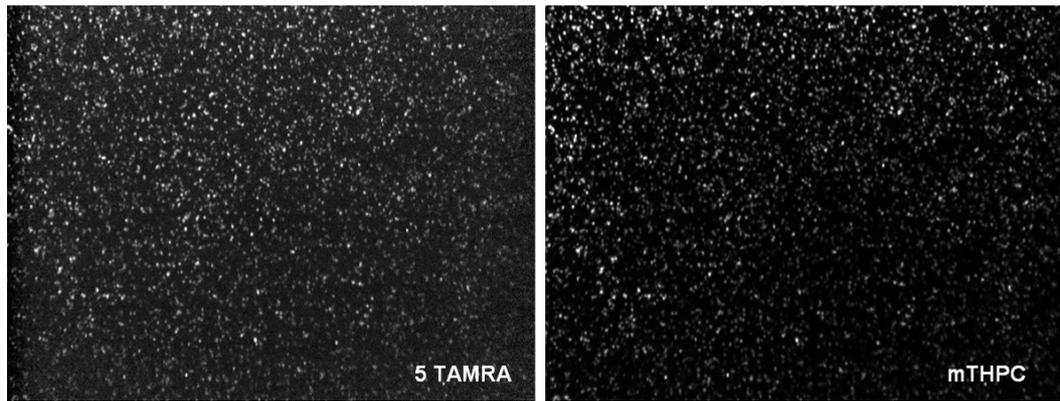


Abbildung 31: Aufnahmen von 5-TAMRA-gelabelten mTHPC-HSA-Nanopartikeln mit einem Opera-Fluoreszenzmikroskop bei einer Partikelkonzentration von 3,9 μg pro mL. Anregungswellenlänge 532 nm, Detektionswellenlänge für 5-TAMRA 585 nm / mTHPC 690 nm, 40-fache Vergrößerung. Die Untersuchungen wurden von Francoise Halley unter Anleitung von Dr. Philip Gribbon bei Screeningport GmbH (Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Im Fluoreszenzmikroskop (siehe Abbildung 31) konnten mTHPC und Farblabel nebeneinander detektiert werden, womit die Verfügbarkeit von Aminogruppen auf der Partikeloberfläche und ihre Reaktivität im Hinblick auf eine NHS-Ester-Reaktion nachgewiesen wäre.

3.7. *In vitro*-Charakterisierung

Die photophysikalische Charakterisierung der entwickelten Formulierungen und Teile der Zellkultur-Untersuchungen (in Jurkat-Zellen) wurden von Herrn Kuan Chen und Frau Annegret Preuss unter der Anleitung von Frau Prof. Beate Röder (Humboldt-Universität, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Alle übrigen Ergebnisse zur Charakterisierung der Zubereitungen *in vitro* entstanden am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (St. Ingbert, Deutschland) in Arbeiten von Frau Karin Löw unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hagen von Briesen.

3.7.1. Adsorptiv beladene Trägersysteme

Zur Beurteilung der photodynamischen Aktivität und ihrer Aufnahme in humane Zellen, wurden erste Untersuchungen an adsorptiv beladenen Trägersystemen durchgeführt. Die Arzneistoffbindung an HSA-Nanopartikel erfolgte in Gegenwart von 1,5% HSA für mTHPP und 2,0% HSA für mTHPC (siehe 3.2.3).

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die photophysikalischen Eigenschaften von Photosensibilisatoren, wie Fluoreszenz und die Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu generieren, sehr wesentlich von der Mikroumgebung des Chromophors abhängig sind [83]. Kommt es zur Einschränkung der Beweglichkeit des Moleküls, so führt dies meist zu einer deutlichen Veränderung der photophysikalischen Eigenschaften. Für bovines Serumalbumin (BSA) wurde gezeigt, dass es die Monomerenform von mTHPC zu stabilisieren vermag, was sich vermutlich positiv auf die Effektivität der Photodynamischen Therapie auswirkt.

3.7.2. Photophysikalische Charakterisierung

Wie aus dem UV-VIS-Spektrum ersichtlich (siehe Abbildung 32), zeigt mTHPP eine starke Absorption im blauen Wellenlängenbereich zwischen 380 und 430 nm. Neben dieser Soret-Bande sind 4 schwächere Q-Banden im roten Wellenlängenbereich erkennbar.

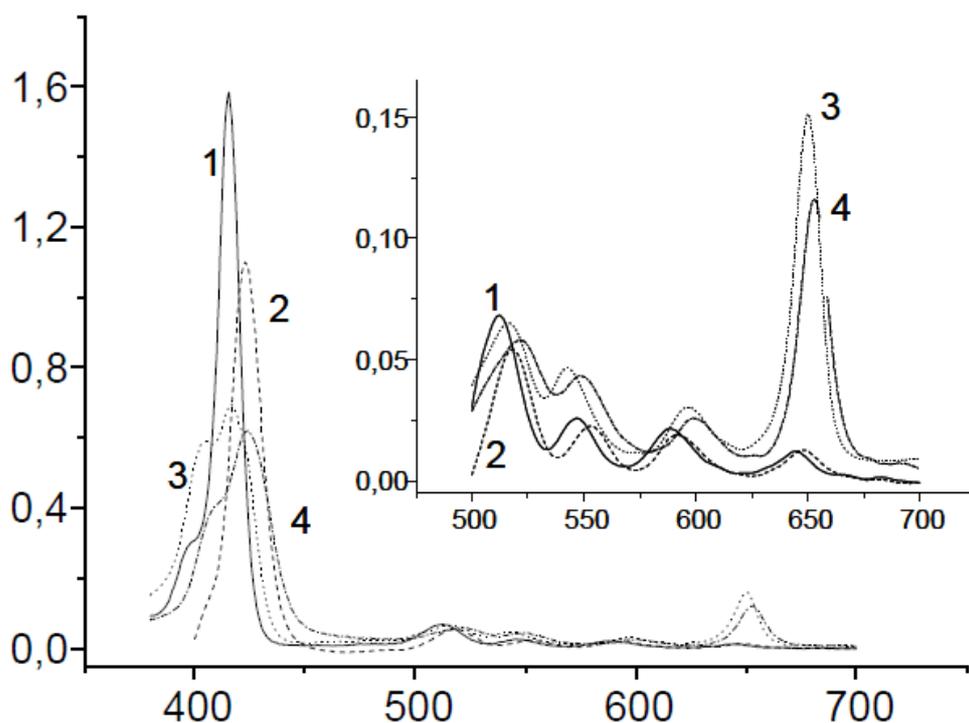


Abbildung 32: Absorptionsspektren von mTHPP (1, —) und mTHPC (2, •••) in Ethanol sowie von mTHPP- (3, - - -) und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln (4, • - •-) in Wasser mit Unterteilung in den gesamten UV-VIS-Bereich (große Abbildung) und den Q-Banden (kleine Abbildung, rechts oben). Lichtstreuung wurde berücksichtigt und korrigiert. Die Abbildung stammt aus [82].

Das Maximum der Soret-Bande von mTHPP liegt bei 415 nm und es zeigt sich für das Kolloidsystem eine bathochrome Verschiebung zu 423 nm. Die Maxima der 4 Q-Banden zeigen ebenfalls eine solche Verschiebung. Es kann daher vermutet werden, dass es im Verlauf der Adsorption ebenfalls zu einer Beeinflussung des Chromophors durch den kolloidalen Träger kommt.

Für andere Farbstoffe wurde bereits gezeigt, dass deren Bindung an komplexe Strukturen, wie z.B. Dendrimere mit einer bathochromen Verschiebung der Q-Banden einhergeht, deren Höhe von der Komplexität der gebildeten Struktur

abhängig ist. Gleichzeitig kommt es oftmals zur Verbreiterung der Soret-Bande [83].

Die nanopartikuläre Formulierung von mTHPP zeigte unter Berücksichtigung der Lichtstreuung eine Verringerung der Extinktion auf etwa 70%, verglichen mit freiem mTHPP. Die Extinktionen der Q-Banden waren dem freien Wirkstoff vergleichbar. Die Absorptionsspektren des Chlorins mTHPC und der mTHPC-beladenen Nanopartikel spiegelten hingegen das typische Verhalten metallfreier Porphyrine wider.

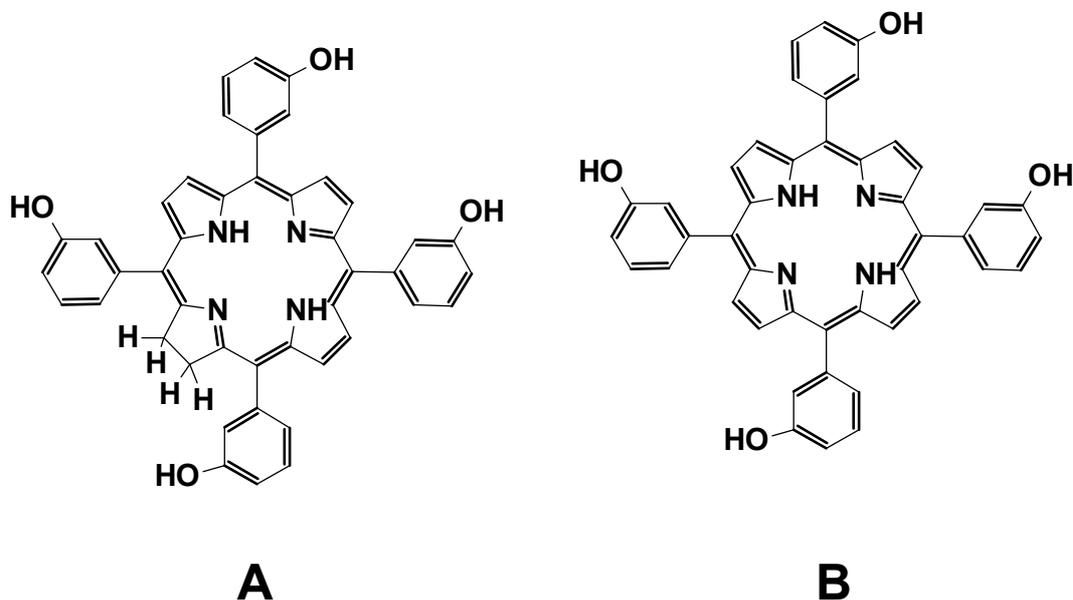


Abbildung 33: Strukturformeln der beiden Wirkstoffe mTHPC (A) und mTHPP (B)

Dies belegt, dass es während der Albumin-vermittelten Arzneistoffbeladung der Nanopartikel nicht zu einer nennenswerten Aggregation der Photosensibilisatoren kommt, welche die Extinktion negativ beeinflussen würde. Im Vergleich zeigt das Chlorin aufgrund der reduzierten Doppelbindung (siehe Abbildung 33) eine 12-fach stärkere Absorption bei 650 nm.

Die Fluoreszenzspektren von mTHPP und mTHPP-beladenen HSA-Nanopartikeln zeigten große Ähnlichkeit (siehe Abbildung 34). Die Maxima bei 650 nm bzw. 713 nm (freier Wirkstoff) verschoben sich auf 653 nm bzw. 716 nm bei der nanopartikulären Formulierung.

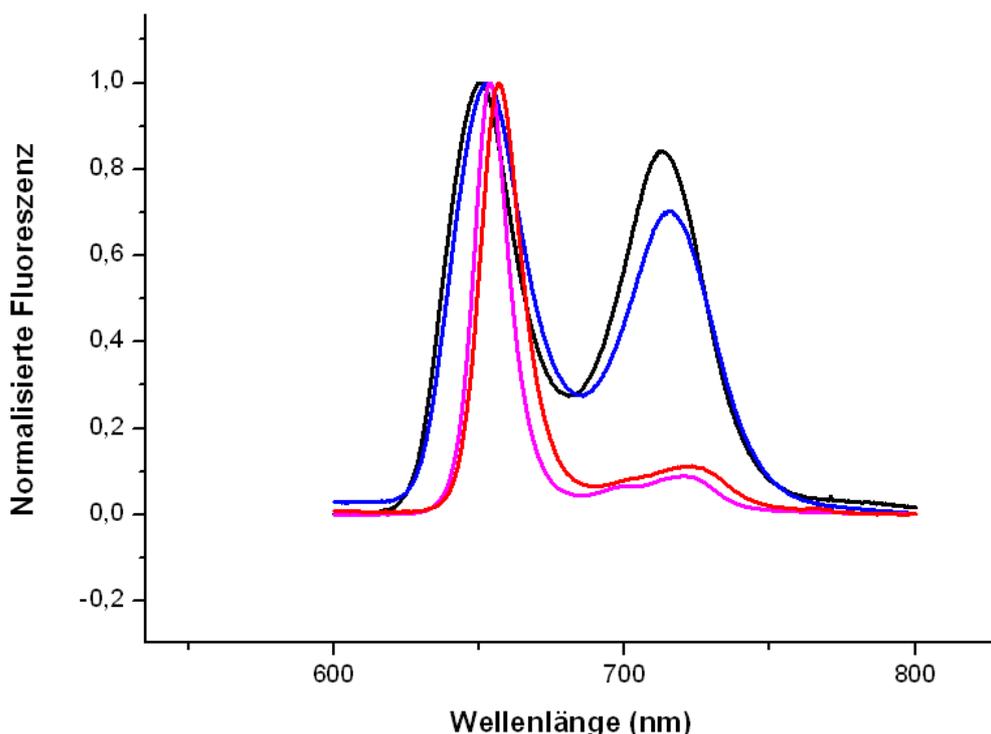


Abbildung 34: Fluoreszenzspektren von mTHPP (—) und mTHPC (—) sowie mTHPP- (—) und mTHPC-HSA-Nanopartikeln (—). Die Abbildung stammt aus [82].

Das Verhältnis der Intensitäten der beiden Fluoreszenzpeaks verringerte sich von 0,84 (freies mTHPP) auf 0,69 (mTHPP-HSA-Nanopartikel). Für mTHPC verschob sich eines der Fluoreszenzmaxima von 654 nm auf 657 nm. Die Quantenausbeute der mTHPC-beladenen Partikel sank in wässriger Suspension gegenüber dem freien Arzneistoff in Ethanol auf 30%.

Die Fluoreszenz-Lebensdauer-Kurven von mTHPP- und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln zeigten im Wesentlichen drei verschiedene Lebenszeiten (siehe Tabelle 17).

Die längste Fluoreszenz-Lebensdauer der nanopartikulären Formulierung von mTHPP betrug 8,2 ns, was in etwa der des Monomers entspricht. Bei mTHPC war diese lange Fluoreszenzlebensdauer nicht detektierbar, was dafür spricht, dass der Wirkstoff mTHPC nicht in Monomerenform vorliegt.

Tabelle 17: Fluoreszenz-Lebensdauer τ von mTHPP und mTHPC in Ethanol sowie mTHPP- und mTHPC-HSA-Nanopartikeln in wässriger Suspension. Prozentualer Anteil der Fluoreszenz an der Gesamtintensität in Klammern.

	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	τ_3 [ns]	τ_4 [ns]
	$\pm 0,2$ / [%]	$\pm 0,1$ / [%]	$\pm 0,1$ / [%]	$\pm 0,05$ / [%]
mTHPP	9,6 [100]	-	-	-
mTHPP-HSA-Nanopartikel	8,2 [41,6]	2,3 [25,5]	-	0,35 [32,9]
mTHPC	8,6 [100]	-	-	-
mTHPC-HSA-Nanopartikel	-	2,2 [10,5]	0,7 [29,1]	0,12 [60,4]

Eine Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit wurde für Photosensibilisatoren beschrieben, die in gebundener Form vorlagen, was sich durch die limitierende molekulare Mikroumgebung des Chromophors erklären lässt [83, 117, 118].

Die Fluoreszenz-Quantenausbeute von mTHPP entsprach in etwa der des zugehörigen Kolloidsystems, während die von mTHPC-beladenen Nanopartikeln im Vergleich zum freien Wirkstoff stark abfiel.

Zusammenfassend belegen die gezeigten Ergebnisse eine Interaktion der beiden Arzneistoffe mit dem Kolloidsystem, wobei insbesondere für mTHPC-HSA-Nanopartikel eine stärkere Interaktion mit der Partikeloberfläche, durch die deutliche Verringerung sowohl der Fluoreszenzlebensdauer, wie auch der Fluoreszenz-Quantenausbeute gezeigt werden konnte.

Gleichzeitig konnte jedoch eine Aggregation der Photosensibilisatoren aufgrund der nur geringfügig veränderten Extinktionen ausgeschlossen werden.

3.7.3. Singulett-Sauerstoff-Messungen

Weitere Charakterisierungsschritte hinsichtlich der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff, dem eigentlichen zytotoxischen Agens der Photodynamischen Therapie schlossen sich an. Hierbei können sowohl die Lebensdauer des Triplett-Zustandes τ_T und des radikalischen Sauerstoffmoleküls τ_Δ als auch die zugehörige Quantenausbeute Φ_Δ des Singulett-Sauerstoffs aus dessen Lumineszenzkurve bestimmt werden [84]. Als Referenz diente der Farbstoff Rose Bengal in D_2O [119].

Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt. Die Triplettzustand-Lebensdauer τ_T des wasserlöslichen Photosensibilisators Rose Bengal entsprach, ebenso wie die Lebensdauer des generierten Singulett-Sauerstoffs τ_Δ den aus der Literatur bekannten Werten.

Tabelle 18: Singulett-Sauerstoff Generierung und Triplett-Parameter von Rose Bengal, mTHPP, mTHPC sowie mTHPP- und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in Suspension und in Jurkat-Zellen. Singulett-Sauerstoff wurde einerseits in D_2O (a) und andererseits in Ethanol (b) bestimmt. Alle Messungen in Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 5 h durchgeführt.

	τ_T [μs] (D_2O)	τ_Δ [μs] (D_2O)	$\Phi_\Delta \pm 0,03$ (D_2O)	τ_T [μs] (Jurkat-Zellen)	τ_Δ [μs] (Jurkat-Zellen)
Rose Bengal^a	$3,3 \pm 0,1$	64 ± 3	0,75	-	-
mTHPP^b	$0,31 \pm 0,05$	$15,2 \pm 0,5$	0,63	$3,5 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,05$
mTHPP-HSA-Nanopartikel^a	25 ± 1	65 ± 3	0,03	$4,5 \pm 0,1$	$1,10 \pm 0,05$
mTHPC^b	$0,23 \pm 0,05$	$14,4 \pm 0,3$	0,65	$3,7 \pm 0,1$	$0,80 \pm 0,05$
mTHPC-HSA-Nanopartikel^a	20 ± 1	66 ± 4	0,03	$4,0 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,05$

Im Vergleich wiesen die nanopartikulären Formulierungen eine deutlich verlängerte Lebensdauer des Triplett-Zustandes gegenüber den freien Wirkstoffen auf, bei gleichzeitiger Verringerung der Singulett-Sauerstoff-

Quantenausbeute. Dies spricht für eine Anregung des Farbstoffmoleküls in hypoxischer Mikroumgebung, ebenso wie für eine erhöhte strahlungslose Desaktivierung infolge von Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche [82, 83].

Die Messung der Generierung von Singulett-Sauerstoff in Jurkat-Zellen sollte Veränderungen der photodynamischen Aktivität in einer humanen Zelllinie aufzeigen. Da Jurkat-Zellen in Suspension kultivierbar sind, lassen sie eine Vielzahl optischer Messmethoden zu. Nach einer Inkubationsdauer von 5 h mit mTHPP und mTHPC sowie ihren nanopartikulären Formulierungen wurden die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz-Kurven in Jurkat-Zellen gemessen (siehe Abbildung 35).

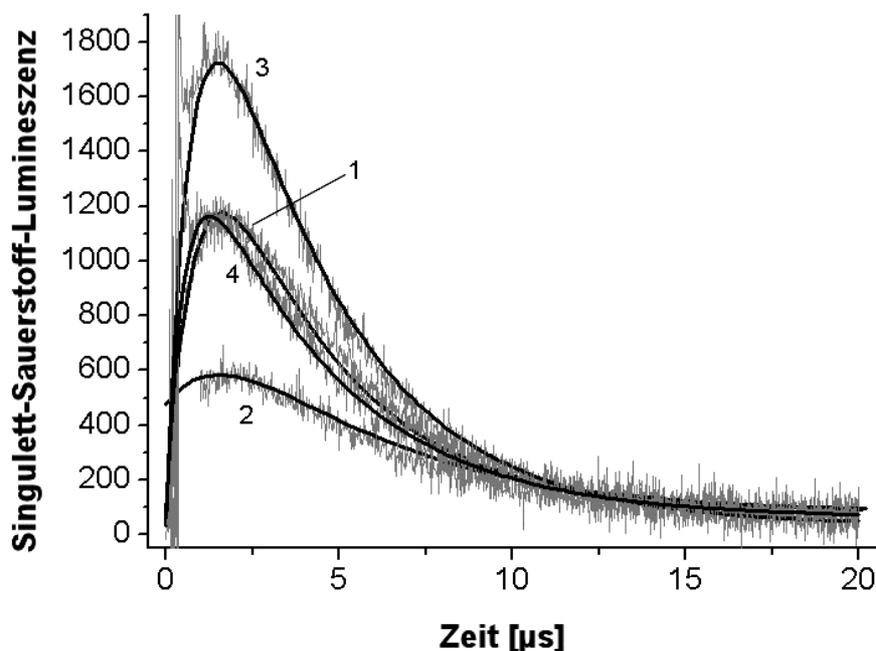


Abbildung 35: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz-Abklingkurve in Jurkat-Zellen nach 5-stündiger Inkubation mit mTHPP (1), mTHPC (3) sowie mTHPP- (2) und mTHPC-HSA-Nanopartikeln (4). Die Bestrahlungswellenlänge lag bei 532 nm für mTHPP bzw. mTHPP-HSA-Nanopartikel und bei 650 nm für mTHPC bzw. mTHPC-HSA-Nanopartikel. Die Strahlungs-dosis betrug 500 μ W. Die Abbildung stammt aus [82].

Auf diese Weise wurde die Lebensdauer des von den Photosensibilisatoren generierten Singulett-Sauerstoffs τ_{Δ} sowie die Lebensdauer des Triplett-Zustandes τ_T in Jurkat-Zellen ermittelt (siehe Tabelle 18). Die Lebensdauer des von mTHPC und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln generierten Singulett-Sauerstoffs fiel insgesamt kürzer aus, als die der Untersuchung am

Porphyrinfarbstoff mTHPP, was für eine stärkere Interaktion mit der Partikeloberfläche spricht.

Gleichzeitig zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen der Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer von freiem Wirkstoff und Partikelsystem. Es kann daher angenommen werden, dass nach der Zellaufnahme und Abbau des Partikelsystems eine Reaktivierung der photodynamischen Aktivität des Photosensibilisators infolge einer langsamen Arzneistofffreisetzung eintritt. Daher wurde die Freisetzung mittels Konfokalmikroskopie und „*Fluorescence Life Time Imaging*“ untersucht.

3.7.4. Arzneistofffreisetzung und intrazelluläre Verteilung

Erste Hinweise auf den Aufnahmemechanismus des Partikelsystems in die Zelle lieferte die Darstellung der Fluoreszenzlokalisierung im Konfokalmikroskop, welche nach 1, 3, 5 und 24 h von Preuss et al. untersucht wurde (siehe Abbildung 36).

Durch die Co-Lokalisation von Photosensibilisator und dem Lysosomen-Marker Lyso-Sensor Green[®] konnte für mTHPP ein endozytotischer Aufnahmeweg mit anschließendem Abbau des Partikelsystems in den Lysosomen bestätigt werden. Das Porphyrin ist membrangängig und reichert sich im Zytoplasma an, während die nanopartikuläre Formulierung nach 1, 3 und 5 h vorwiegend in den Lysosomen zu finden ist (siehe Abbildung 36). Nach 24 h ist bereits ein Teil des Arzneistoffs im Zytoplasma nachweisbar, was für einen Abbau des Partikelsystems und eine Freisetzung des Wirkstoffs spricht.

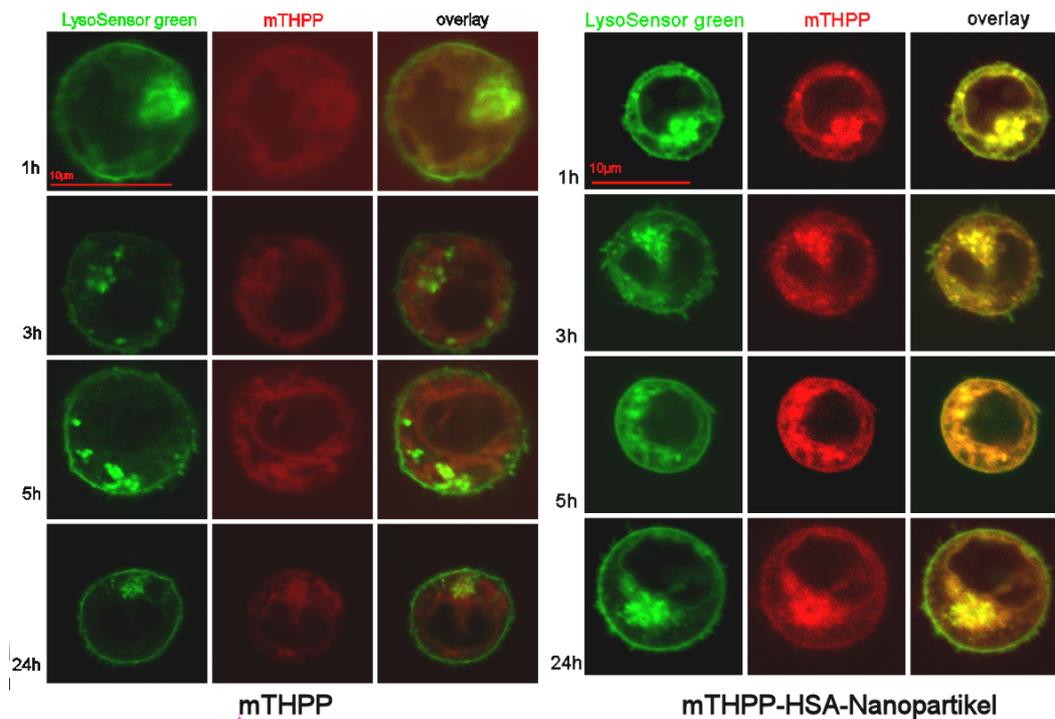


Abbildung 36: Photosensibilisator-Lokalisation in den Lysosomen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Lysosomen-Marker LysoSensor Green[®] (■), Photosensibilisator (■) und dem Overlay (■). Die Zellen wurden mTHPP und mTHPP-HSA-Nanopartikeln inkubiert. Die Abbildung stammt aus [120].

Weitere Informationen über die Freisetzung des Arzneistoffes können durch Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauer im Konfokalmikroskop gewonnen werden. Wie bereits dargelegt verändert sich die Fluoreszenzlebensdauer mit der Mikroumgebung des Fluorophors, welches die Strahlung emittiert. Aus der Literatur ist eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer für Photosensibilisatoren bekannt, welche in gebundener oder aggregierter Form vorliegen [83, 117, 118] (siehe auch 3.7.2). Bestätigt wurde dies bereits im Rahmen der photophysikalischen Charakterisierung für die vorliegenden Trägersysteme (siehe 3.7.3).

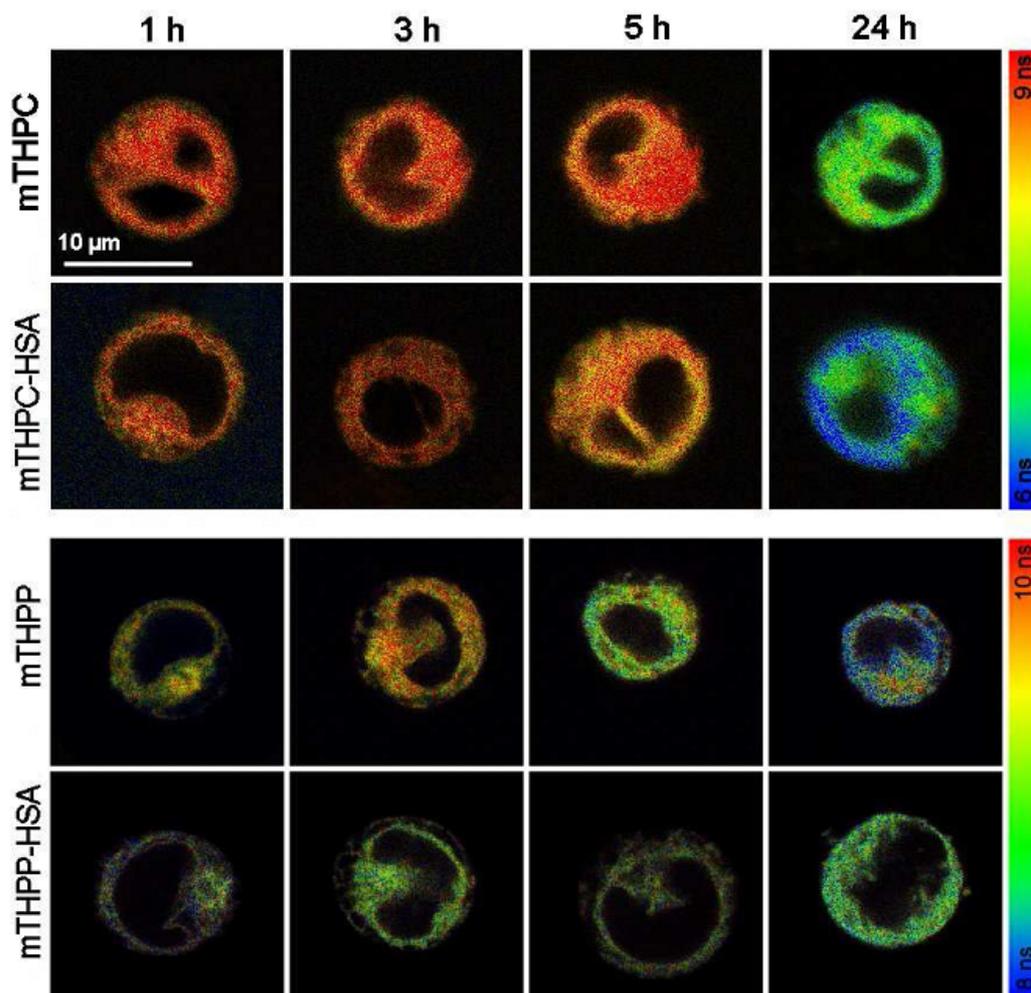


Abbildung 37: FLIM-Bilder der Photosensibilisator-Verteilung in Jurkat-Zellen nach 1, 3, 5 und 24 h. Die Zellen wurden mit mTHPP, mTHPC sowie mit mTHPC- und mTHPP-HSA-Nanopartikeln inkubiert. Die Fluoreszenzlebensdauer ist durch Farbverschiebung von Rot nach Blau dargestellt. Die Abbildung stammt aus [121]

Abbildung 37 zeigt die Fluoreszenzlebensdauer von mTHPP und mTHPC sowie ihrer nanopartikulären Formulierungen in Jurkat-Zellen nach verschiedenen Zeitabständen. Die Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer, wie sie bei einer Einschränkung der molekularen Beweglichkeit auftritt, ist als Farbverschiebung von Rot nach Blau dargestellt.

Für freies mTHPP wurde im Verlauf des Experiments eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer von 9,0 auf 8,1 ns gezeigt, welche sich durch die zunehmende Anreicherung des Arzneistoffes im Zellinneren erklären lässt. Die nanopartikuläre Formulierung des Porphyrins zeigte eine geringere Aufnahme, und es kam zu keiner Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer.

Für mTHPC und mTHPC-HSA-Nanopartikel konnten identische Aufnahmegeschwindigkeiten nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch für das arzneistoffbeladene Kolloidsystem nach 24 h eine stärkere Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer, was für eine erhöhte Freisetzung des Arzneistoffs aus dem Trägersystem und Interaktion mit Zellbestandteilen spricht. Diese Ergebnisse belegen ebenso wie die gezeigten CLSM-Bilder die schnellere Akkumulation des Chlorins innerhalb von 24 h (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37), welche durch die nanopartikuläre Formulierung noch beschleunigt wird.

3.7.5. Trägersysteme mit EGFR-„Targeting“

Für die Untersuchung der Antikörper-vermittelten Endozytose infolge der Konjugation mit dem EGFR-Antikörper wurden leere HSA-Nanopartikel entweder mit einem IgG-Kontrollantikörper ohne Target, mit Cetuximab oder mit einem monofunktionalen PEGylierungsreagenz modifiziert. Hierbei wurden Bindungsraten von etwa 20 µg des Antikörpers pro mg HSA erreicht. Die Partikel besaßen eine Größe zwischen 150 und 300 nm und einen Polydispersitätsindex < 0,1.

3.7.6. Antikörper-vermittelte Endozytose

Die verstärkte Aufnahme von HSA-Nanopartikeln in Zellen durch Ankopplung des EGFR-Antikörpers Cetuximab wurde nach Entwicklung des Trägersystems von Löw et al. mittels Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie untersucht. Hierbei wurden zwei Zelllinien aus Humanem Kolonkarzinom verwendet, DiFi- und LS174T-Zellen, für die zuvor die Expression des EGFR-Rezeptors durch Immunostaining nachgewiesen wurde. Zwar wird Foscan[®] ausschließlich zur Therapie von Tumoren an Kopf und Nacken eingesetzt, jedoch besitzen andere Photosensibilisatoren bereits die Zulassung für den Einsatz im Gastrointestinal-Trakt [57].

Abbildung 38 zeigt eine Anreicherung des Partikelsystems in DiFi- und LS174T-Zellen infolge der Konjugation mit Cetuximab. Für die Kontrollproben war hingegen keine deutliche Anreicherung zu verzeichnen.

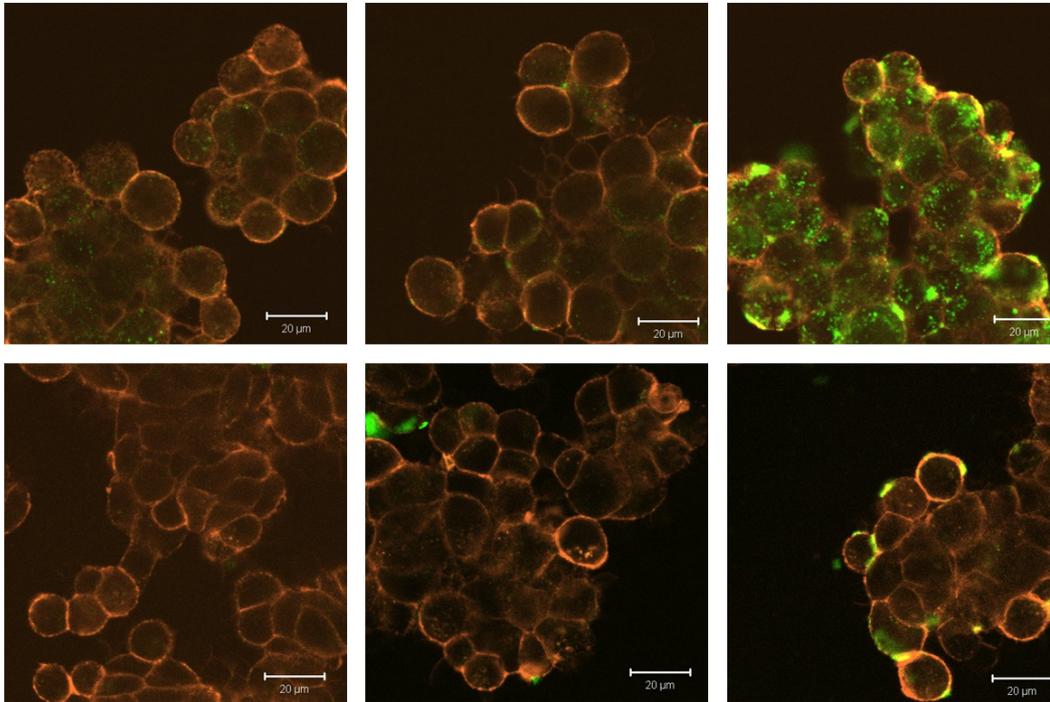


Abbildung 38: Anreicherung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln in DiFi-(oben) und LS174T-Zellen (unten) nach Inkubation mit IgG- (links), PEG-(Mitte) und Cetuximab-HSA-Nanopartikeln (rechts). Die Membranfärbung erfolgte mit Concanavalin A AlexaFluor Tetramethylrhodamin (■), HSA-Nanopartikel (■). Die Abbildung stammt aus [122].

Diese Ergebnisse belegen die erwartete, erhöhte Selektivität des Cetuximab-modifizierten Trägersystems. Sie entsprachen im Wesentlichen den Erwartungen, da ähnliche Resultate auch schon für andere Trägersysteme mit aktivem Antikörper-Targeting gezeigt werden konnten [32, 88].

In weiteren Untersuchungen soll das Prinzip des aktiven „*Drug Targetings*“ mit Arzneistoff-beladenen, nanopartikulären Trägersystemen fortgeführt werden.

Fokus der Arbeit wird der Nachweis der aktiven Aufnahme von Photosensibilisatoren, durch Verwendung rezeptorselektiv bindender HSA-Nanopartikel sein. Erste Versuchsreihen wurden am Fraunhofer-Institut in St. Ingbert durchgeführt. Es zeigte sich, dass es im Vergleich zu den Kontrollzubereitungen ohne EGFR-Targeting (PEGylierte, kovalent Arzneistoff-beladene HSA-Nanopartikel) zu keiner verbesserten Interaktion mit den Zielzellen kam. Weitere Untersuchungen an Zellen mit stärkerer EGFR-

Expression sollen nach Optimierung der Inkubationsbedingungen die Überlegenheit des Cetuximab-modifizierten Trägersystems aufzeigen.

4. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Stoffe als Photosensibilisatoren evaluiert, deren photodynamische Aktivität gegenüber den Pioniersubstanzen deutlich verbessert werden konnte [58]. Vielen dieser Moleküle blieb jedoch aufgrund ihrer ungünstigen physikochemischen Eigenschaften oder der auftretenden Toxizität die Marktreife versagt. Nanopartikuläre Trägersysteme sind geeignet, Verträglichkeit und Effektivität der Photodynamischen Therapie zu verbessern sowie die Selektivität bei der Behandlung bestimmter Tumorspezies deutlich zu erhöhen. Um dieses Prinzip auf verschiedene Photosensibilisatoren anwenden zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA) durch Desolvation hergestellt und die adsorptive, die inkorporative sowie die kovalente Bindung an das Trägersystem untersucht.

Die verwendeten Arzneistoffe weisen aufgrund ihrer unpolaren Struktur nur geringe Affinität zum Protein auf. Zwar ist die Bindung von mTHPC an gelöstes Albumin aus der Literatur bekannt, doch scheint diese von einer polaren Umgebung einerseits und andererseits auch von der intakten und unveränderten Struktur des Proteins abhängig zu sein. Betrachtet man die adsorptive Bindung von Photosensibilisatoren an HSA-Nanopartikel als einen Umverteilungsprozess zwischen der Solvathülle des Arzneistoffs und der Trägermatrix, so stellt zudem die Vermeidung von Wirkstoffpräzipitaten eine zusätzliche Herausforderung dar.

Während die inkorporative und die kovalente Arzneistoffbindung eine Aufreinigung des Kolloidsystems in organischen Lösungsmitteln zur Entfernung ungelöster Bestandteile ermöglichen, bedeutet dies bei adsorptiv beladenen Systemen eine Störung des empfindlichen Verteilungsprozesses, welcher die Arzneistoffbindung erst ermöglicht.

Als Ergebnis ausführlicher Stabilitätsuntersuchungen gelang die Entwicklung eines adsorptiv beladenen Trägersystems durch Bildung von Arzneistoff-Albumin-Komplexen, welche das lipophile Arzneistoffmolekül auch in der

polaren Umgebung eines hydrophilen Lösungsmittels stabilisieren. Für das Adsorptionsmedium konnte in Abwesenheit der Nanopartikel auch nach einer Inkubationsdauer von 24 h und zweistündiger Zentrifugation eine molekular-disperse Verteilung des Photosensibilisators festgestellt werden. Nach Zugabe der HSA-Nanopartikel wurde jedoch eine nahezu vollständige Entfärbung des Partikelüberstandes (nach Abzentrifugieren des Kolloidsystems), vermutlich infolge der eintretenden Adsorption, beobachtet.

Trotz einer vergleichsweise geringen Arzneistoffbeladung von 20 µg mTHPP bzw. 25 µg mTHPC pro mg HSA, wurde so ein äußerst effizientes Verfahren etabliert, da nach der Umsetzung etwa 80-90% des eingesetzten Arzneistoffs an das Partikelsystem gebunden wurden.

Die Nanopartikel zeigten dabei keine deutliche Veränderung hinsichtlich ihrer Partikelgröße, des Polydispersitätsindex, des Zetapotentials oder der optischen Erscheinung im Elektronenmikroskop. Um für spätere *in vitro*-Untersuchungen eine lagerstabile Formulierung zur Verfügung stellen zu können, wurde des Weiteren eine Methode zur Gefriertrocknung des Kolloidsystems etabliert. Die Schädigung der Partikelsuspension infolge der Trocknung, konnte durch Verwendung des Kryoprotektors Saccharose in einer Konzentration von 3% vermieden werden.

Ein Problem für die Anwendung adsorptiv beladener HSA-Nanopartikel in Zellkultur wie auch *in vivo* stellt die auftretende Desorption dar. Der gebildete Photosensibilisator-Protein-Komplex unterliegt dabei einem Umverteilungsprozess und löst sich vom Partikelsystem, wodurch keine gemeinsame Aufnahme von Partikel und Arzneistoff stattfinden kann. Die Inkubation mit verschiedenen Zellkulturmedien ergab, dass je nach Zusammensetzung des Mediums nach 24 h ein großer Teil des eingesetzten Photosensibilisators im Überstand der Partikel nachweisbar war.

Nach der Gefriertrocknung liegt das Kolloidsystem als trockener Kuchen, eingebettet in die amorphe Trägersubstanz Saccharose vor, wodurch eine Desorption während der Lagerung verhindert werden kann.

Erste Untersuchungen der Zellaufnahme adsorptiv beladener Trägersysteme zeigten, dass bereits nach 1 h eine Anreicherung des Porphyrinderivates mTHPP in den Lysosomen stattfindet. Innerhalb dieser kurzen Zeitspanne ist vermutlich mit deutlich geringerer Desorption zu rechnen und die beobachtete Ko-Lokalisation des Photosensibilisators mit dem Lysosomenmarker LysoSensor Green[®] spricht für eine Aufnahme des mTHPP-beladenen, nanopartikulären Trägersystems.

Einen weiteren Nachteil der etablierten Formulierungen stellt die geringe Beladung des Kolloidsystems dar. Zwar kann eine Reduktion der erforderlichen therapeutischen Arzneistoffdosis infolge der erhöhten Tumorselektivität des Arzneistoffträgers vermutet werden, dennoch sollte die Inkorporierung von Photosensibilisatoren in HSA-Nanopartikel untersucht und damit auch die Partikelbeladung erhöht werden.

Diese Einbettung in die Partikelmatrix wurde bereits für andere Arzneistoffe durchgeführt [32, 88] und basiert auf zwei Grundprinzipien: der Adsorption des Arzneistoffs an das gelöste Polymer mit anschließender Fällung, sowie der Kopräzipitation beider Bestandteile. Nach Abschluss des Prozesses soll der Photosensibilisator dann entweder molekulardispers oder aber in Form kristalliner Depots eingebettet in desolvatisiertem Albumin vorliegen. Bei der ethanolischen Desolvatation wird HSA durch Zugabe von Ethanol nanopartikulär ausgefällt. In dieser lipophilen Umgebung kam es weder zu einer nennenswerten Adsorption des Arzneistoffs an das gelöste Polymer, noch zu einer Unterschreitung seines Löslichkeitsproduktes. Es wurde daher versucht das Protein auch bei Zugabe geringerer Ethanolvolumina zu desolvatisieren und dadurch die Effizienz der Einbettung zu erhöhen. Dieser Ansatz, ebenso wie der Versuch die Beladung durch Veränderung des pH zu optimieren, blieben ohne Erfolg. Es konnte zwar eine deutliche Steigerung der Beladung verzeichnet werden, diese war jedoch aufgrund der Verschlechterung der Partikelausbeute nicht weiter zu steigern.

Die Bindung von mTHPC an humanes Serumalbumin blieb nach Desolvatation und chemischer Modifikation des Proteins nicht bestehen, weshalb von einer

spezifischen Interaktion ausgegangen werden musste. Um den Arzneistoff besser an die Peptidstruktur adsorbieren zu können und sein Molekularvolumen zu erhöhen, sollte die Inkorporierung in Gegenwart verschiedener Cyclodextrine durchgeführt werden, welche als Komplexbildner geeignet erschienen [109]. Es wurden unspezifische hydrophile Wechselwirkungen zwischen Protein- und Zuckermolekülen erwartet, welche auch nach Zerstörung der Tertiärstruktur von Albumin erhalten bleiben sollten. Auch das erhöhte Molekularvolumen sollte die Einbettung in die Porenstruktur des quervernetzten Trägers erhöhen.

Die Desolvatation ist von einer Reihe verschiedener Faktoren abhängig, wie dem Ethanolvolumen, der HSA-Konzentration, dem pH und der Ionenstärke. Cyclodextrine schienen hingegen keine Veränderung der entstehenden HSA-Nanopartikel zu bewirken, vermutlich da sie die Ladungseigenschaften von Albumin in geringerem Maße beeinflussen als Puffersalze oder die Protonenkonzentration [13].

Es entstanden Partikel in erwarteter Größe und mit einem Polydispersitätsindex $< 0,1$. Doch führte auch in Gegenwart von Cyclodextrinen die ethanolische Desolvatation von HSA und mTHPC nicht zu einer wesentlichen Verbesserung der Einbettungseffizienz. Es sind dafür zwei verschiedene Erklärungen denkbar: einerseits lagen unter den gewählten Bedingungen keine ausreichenden Belege für eine erfolgreiche Komplexierung des Photosensibilisators vor und andererseits war eine unzureichende Affinität des Cyclodextrins zum Protein möglich.

Der Arzneistoff wurde daher vor Durchführung der Desolvatation durch gemeinsame Gefriertrocknung mit Cyclodextrinen komplexiert und die Effizienz der Komplexierung photometrisch quantifiziert. In der Natur sind zahlreiche Metallkomplexe von Chlorinen bekannt [112]. Ein Zinkkomplex des Porphyrins sollte daher formuliert werden. Es wurden durch Komplexierung mit Zink nur etwa 3%, in Gegenwart zweier verschiedener Cyclodextrine jedoch 74% (Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin) bzw. 91% (β -Methylcyclodextrin) des eingesetzten Temoporfins in Lösung gehalten. Diese grundlegende und

höchst erfreuliche Veränderung der Stoffeigenschaften sollte anschließend zur nanopartikulären Formulierung des Arzneistoffs genutzt werden. Die entstandenen mTHPC-Cyclodextrin-Lösungen wurden mit HSA versetzt und anschließend desolvatisiert. Es konnte leider keine verbesserte Inkorporierung festgestellt werden, weshalb alternative Strategien zur Verbesserung der Einbettungseffizienz erwogen wurden.

Die ethanolische Desolvatation ist hinsichtlich der Inkorporierung lipophiler Arzneistoffe äußerst problematisch, da mit steigendem Ethanolvolumen eine zunehmende Lipophilisierung des umgebenden Mediums eintritt. Die adsorptive Bindung des Arzneistoffs an die Albuminmoleküle tritt dann zunehmend in Konkurrenz mit der Ausbildung einer Solvathülle aus dem umgebenden Medium und führt schließlich zur Desorption des Photosensibilisators von der Trägermatrix. Um dies zu verhindern, wurde das Verfahren der PEG-HSA-Desolvatation entwickelt. Polyethylenglykole gelten als Ausschlussreagenzien, welche aufgrund ihres großen Volumens zu einer starken Konzentrierung von Proteinen in ihrer Lösung („*Crowding*“) mit anschließendem Entzug der Hydrathülle führen. Bereits früher wurden sie zur Fällung und Aufreinigung von humanem Serumalbumin eingesetzt [47], jedoch niemals zur Entwicklung eines nanopartikulären Trägersystems. Nach Zusatz von 30-40% Polyethylenglykol zu einer wässrigen Lösung stand ein hydrophiles Desolvatationsreagenz zur Verfügung, welches die gleichzeitige Fällung von Photosensibilisator und Albumin bewirken und dadurch die Einbettung verbessern sollte.

Für eine nanopartikuläre Fällung von HSA war eine Optimierung der Desolvatationsbedingungen erforderlich. In einem engen pH-Bereich und nach Optimierung des zugesetzten PEG-Volumens wurden Nanopartikel von geeigneter Größe und mit einem Polydispersitätsindex $< 0,1$ hergestellt. Auch die Aufreinigung der Partikel wurde mittels HPLC untersucht. Nach 5-maliger Zentrifugation und Resuspendieren des Partikelpellets in Wasser waren keine messbaren Rückstände von Polyethylenglykol mehr im Überstand der HSA-Nanopartikel detektierbar. Im Elektronenmikroskop ließ sich eine veränderte

Oberflächenstruktur der Kolloide infolge des veränderten Herstellungsverfahrens erkennen. Während HSA-Nanopartikel, welche durch ethanolische Desolvation hergestellt wurden ein sphärisches Erscheinungsbild besitzen, zeigten „*PEG desolvated HSA nanoparticles*“ eine kantige Struktur.

Der Versuch einer Inkorporierung des Arzneistoffs durch Fällung von Albumin in Gegenwart von mTHPC mittels Polyethylenglykol führte hingegen nicht zum Erfolg. Das Protein wurde zwar nanopartikulär gefällt, und es waren auch Wirkstoffpräzipitate im Gefäß optisch erkennbar, jedoch konnte nach Aufreinigung der Partikel keine nennenswerte Inkorporierung des Chlorins in das Partikelsystem festgestellt werden.

Um trotz der geringen Affinität der Porphyrin- und Chlorinfarbstoffe zu kolloidalem humanem Serumalbumin eine stabile Formulierung der Photosensibilisatoren zu entwickeln, wurde die kovalente Bindung der Arzneistoffe mTHPP-COOH und mTHPC an HSA-Nanopartikel untersucht. Als Bindungsvermittler diente das Carbodiimid EDC, welches durch Stabilisierung eines Zwischenzustandes die Ausbildung einer Amidbindung zwischen Säure- und Aminogruppe zu vermitteln vermag [113].

In den Voruntersuchungen wurden beide Arzneistoffe an gelöstes HSA gebunden und die Konjugate anschließend mittels Gelpermeationschromatographie untersucht. Die Bindungsvermittlung war in beiden Fällen erfolgreich, obwohl mTHPC keine Säuregruppe für die Reaktion zur Verfügung stellt. Dennoch eluierte der Chlorinfarbstoff zusammen mit Oligomeren von HSA, welche sich vermutlich infolge der auftretenden Quervernetzung des Proteins bilden. In der Literatur sind einige Hinweise auf Carbodiimidvermittelte Reaktionen zwischen Phenol und Carbonsäure unter Ausbildung einer Esterbindung zu finden [116], jedoch erscheint auch die beginnende Einbettung des Photosensibilisators zwischen zwei oder mehreren Proteinmolekülen möglich. Für die Entwicklung eines Trägersystems waren zwei verschiedene Strategien denkbar: die Desolvation von Arzneistoff-HSA-Konjugaten oder die Konjugation von vorgeformten HSA-Nanopartikeln mit Arzneistoff. Da die eintretende, EDC-vermittelte Quervernetzung des Proteins

zu Verlusten an Photosensibilisator-modifiziertem Albumin während der Aufreinigung führte, wurden HSA-Nanopartikel mit Arzneistoff oberflächenmodifiziert.

Es konnten Bindungsraten von 40 µg mTHPP-COOH bzw. 20 µg mTHPC pro mg HSA-Nanopartikel erreicht werden. Die Partikel zeigten keine Veränderung hinsichtlich ihrer Größe, ihres Polydispersitätsindex oder ihrer morphologischen Erscheinung im Elektronenmikroskop. Da beide Formulierungen in ethanolischer Lösung von Arzneistoffrückständen gereinigt wurden, konnte von erhöhter Stabilität hinsichtlich der Desorption des Photosensibilisators ausgegangen werden.

Durch Gefriertrocknung sollte die Lagerstabilität der entwickelten Kolloidsysteme erhöht werden, da langfristig auch hier mit einer Zersetzung des Trägermaterials und Hydrolyse der Amidbindung zu rechnen ist.

Während Partikelgröße und Polydispersitätsindex von mTHPP-COOH-HSA-Nanopartikeln bereits nach einer Lagerung über 3 Wochen deutlich anstiegen, waren mTHPC-HSA-Nanopartikel über den gesamten Zeitraum stabil.

Die Entwicklung nanopartikulärer Trägersysteme für Photosensibilisatoren brachte im Wesentlichen vier verschiedene Formulierungen hervor: adsorptiv beladene HSA-Nanopartikel der Arzneistoffe mTHPP und mTHPC, sowie die kovalent oberflächenmodifizierten Trägersysteme von mTHPP-COOH und mTHPC. Um ein passives „*Tumor targeting*“ zu ermöglichen, wurde die Partikelgröße beider Systeme im Bereich zwischen 150 und 300 nm gewählt. Wie bereits dargelegt akkumulieren Kolloide dieser Größe aufgrund des sogenannten EPR-Effektes in Tumorgewebe und sind daher besonders gut für den Einsatz in der Onkologie geeignet. Foscan[®] wurde bislang ausschließlich für die „*second line*“ Therapie von Kopf- und Nackentumoren zugelassen, die Photodynamische Therapie ist jedoch auch bei Darmkrebs mithilfe endoskopischer Bestrahlungssysteme möglich. Durch Aufbringen des „*Drug targeting*“-Liganden Cetuximab sollte eine gezielte Anreicherung der gebundenen Arzneistoffe in EGFR-positive Tumorzellen erreicht werden. Der

Antikörper Cetuximab, welcher im Arzneimittel Erbitux[®] enthalten ist, besitzt die Zulassung für die Therapie von Darmkrebs.

Aufgrund der erhöhten photodynamischen Aktivität des Chlorins gegenüber den Porphyrinen sowie der hohen Stabilität des Partikelsystems im Hinblick auf mögliche Desorption wurden kovalent mTHPC-modifizierte Nanopartikel für die Umsetzung mit dem „*Targeting*“-Liganden ausgewählt.

Das der Antikörperkonjugation zugrunde liegende optimierte Protokoll von Steinhauser et al. [32] wurde auf den neuen IgG-Antikörper übertragen. Die Kopplung mittels eines heterobifunktionalen, einseitig aminoreaktiven Crosslinkers verlief erfolgreich. In einem weiteren Versuch wurde der Fluoreszenzfarbstoff 5-TAMRA erfolgreich auf der Partikeloberfläche gebunden. Die zugrunde liegende Reaktion ist der Reaktion der Antikörperbindung identisch, wodurch das Vorhandensein einer ausreichenden Zahl freier Aminogruppen auf der Partikeloberfläche belegt werden konnte.

In ersten *in vitro*-Untersuchungen der adsorptiv beladenen Partikelsysteme konnten Unterschiede in den Extinktions- und Fluoreszenzeigenschaften verglichen mit dem freien Photosensibilisator festgestellt werden. Diese Veränderungen stellen Indizien für eine eingeschränkte Mikroumgebung des Chromo- bzw. des Fluorophors dar, wie sie durch Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche auftreten würden. Weiterhin wurde durch Lumineszenzmessungen in D₂O und in Jurkat-Zellen der Triplett-Zustand des Photosensibilisators quantifiziert sowie auch der generierte Singulett-Sauerstoff. Es konnte gezeigt werden, dass die Lebensdauer von Triplett-Zustand und Singulett-Sauerstoff in Nanopartikel-Suspension gegenüber dem freien Wirkstoff ansteigt, gleichzeitig jedoch eine deutliche Verringerung der Quantenausbeute eintritt. Dies spricht für eine effiziente Aktivierung des Photosensibilisators bei der Bestrahlung in hypoxischer Umgebung, wie sie z.B. in der Nähe der Partikeloberfläche aufgrund der eingeschränkten Diffusion besteht. In Jurkat-Zellen nähern sich dann die Eigenschaften von Partikelsystem und freiem Photosensibilisator deutlich an. Eine rasche

Freisetzung des Wirkstoffs durch Interaktion mit der Zelle und Abbau des Partikelsystems kann vermutet werden.

Eine Untersuchung mittels Konfokalmikroskopie (mit FLIM-Erweiterung) zeigte Unterschiede im Freisetzungsverhalten von mTHPP und mTHPC aus den nanopartikulären Formulierungen in Jurkat-Zellen auf. Für mTHPC konnte eine deutlich schnellere Freisetzung mit starker Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer (evtl. infolge von intrazellulärer Aggregation oder Interaktion mit Zellbestandteilen) gezeigt werden.

Erste Ergebnisse bestehen auch zur Zellaufnahme von Cetuximab-modifizierten leeren HSA-Nanopartikeln, welche an DiFi- und LS174T-Zellen durchgeführt wurden. Eine starke intrazelluläre Akkumulation infolge des EGFR-Targetings konnte im Konfokalmikroskop bestätigt werden.

Nach Vorliegen der gezeigten Ergebnisse ist festzuhalten, dass das Ziel der Arbeit, die Entwicklung von nanopartikulären, albuminbasierten Trägersystemen für Photosensibilisatoren erreicht werden konnte.

Je nach Art der Arzneistoffbindung weisen die entwickelten Formulierungen höchst unterschiedliche Charakteristika auf, welche Vor- und Nachteile in der Therapie bedeuten können. Während adsorptiv beladene HSA-Nanopartikel aufgrund des eintretenden „*Burst Release*“ bereits nach kurzer Zeit zur Bildung zytotoxischen Singulett-Sauerstoffs in der Lage sind, ist für die kovalent modifizierten Systeme eine Freisetzung erst nach enzymatischer Degradation des Partikelsystems möglich. Die Arzneistoffbeladung fiel zwar in beiden Fällen äußerst gering aus, es ließen sich jedoch infolge der Formulierung als kolloidales Trägersystem Mechanismen für ein passives und aktives Tumor-Targeting etablieren. Diese sind geeignet, eine unselektive Körperverteilung der eingesetzten Arzneistoffdosis zu verhindern, wodurch sie infolge der erhöhten Selektivität zu einer zielgerichteten, effizienten und nebenwirkungsarmen Therapie mit Photosensibilisatoren beitragen können.

5. Ausblick

Nach Abschluss der Entwicklung albuminbasierter Trägersysteme für die Photodynamische Therapie stehen mehrere lagerstabile und photodynamisch aktive Formulierungen der Photosensibilisatoren mTHPP, mTHPP-COOH und mTHPC zur Verfügung. In zukünftigen Arbeiten sollten Aufnahme und Freisetzung der beschriebenen Partikelsysteme näher behandelt werden. Erste Ergebnisse in Jurkat-Zellen, welche grundlegende Wechselwirkungen mit einer zellulären Umgebung aufzeigen konnten, müssen mit geeigneten Zelllinien des Darmepithels vertieft werden. Die intrazelluläre Akkumulation und Zytotoxizität sollte durch geeignete, präklinische Testmodelle belegt werden, bevor die Anwendung *in vivo* erwogen werden kann.

In weitergehenden Untersuchungen könnte auch durch Evaluierung neuer Hilfsstoffe zur Komplexierung der Porphyrinsysteme eine weitere Optimierung der Inkorporierung von Photosensibilisatoren in das Trägersystem erarbeitet werden.

Körperverträgliche Metallionen wie Zink oder Magnesium könnten dazu beitragen, dass sich die Ladungseigenschaften der verwendeten Arzneistoffe verändern, wodurch die Einbettung in hydrophile Polymere möglicherweise zu erhöhen wäre. Auch die Modifikation von humanem Serumalbumin durch Kopräzipitation mit anderen, lipophilen Polymeren wäre möglich.

Durch Etablierung eines Verfahrens zur hydrophilen Desolvatation von Albumin ist auch eine Optimierung der Einbettung anderer Arzneistoffe denkbar. Polyethylenglykole gelten als vielseitige Hilfsstoffe, welche auch für die Formulierungsentwicklung anderer Arzneimittel geeignet erscheinen.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

5-TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
DLI	Drug Light Interval
EDC	Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency
EPR effect	Enhanced Permeability and Retention Effect
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
GPC	Gelpermeationschromatographie
HER	Human epidermal growth factor receptor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
mTHPC	meso-Tetra(3-hydroxyphenyl)chlorin
mTHPP	meso-Tetra(3-hydroxyphenyl)porphin
mTHPP-COOH	5-(4-Carboxyphenyl)-meso-tris(3-hydroxyphenyl)-porphyrin
PBS	Phosphate buffered saline

PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PD-HSA nanoparticles	PEG-desolvated HSA nanoparticles
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglykol
PhS	Photosensibilisator / Photosensitizer
PLA	Poly Lactic Acid / Polymilchsäure
PLGA	Poly Lactic Co Glycol Acid Poly(milch-co-glykol)säure
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SEC	Size Exclusion Chromatography
TCMPC	Time-Correlated Multi Photon Counting
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

6.2. Literaturverzeichnis

1. Pridgen, E.M., R. Langer, and O.C. Farokhzad, *Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy*. Nanomedicine (London), 2007. **2**(5): p. 669-680.
2. Bertz, J., et al., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland*. 2010: Robert Koch-Institut.
3. Husmann, G., et al., *Krebs in Deutschland 2005/2006*. 2010: Robert Koch-Institut.
4. D'Cruz, A.K., M.H. Robinson, and M.A. Biel, *mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients*. Head Neck, 2004. **26**(3): p. 232-240.
5. Cramers, P., et al., *Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy*. Br. J. Cancer, 2003. **88**(2): p. 283-290.
6. Caldorera-Moore, M., et al., *Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers*. Expert Opin. Drug. Deliv., 2010. **7**(4): p. 479-495.
7. Harashima, H., et al., *Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes*. Pharm. Res., 1994. **11**(3): p. 402-406.
8. Labhasetwar, V., *Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery*. Curr. Opin. Biotechnol., 2005. **16**(6): p. 674-680.
9. LaVan, D.A., T. McGuire, and R. Langer, *Small-scale systems for in vivo drug delivery*. Nat. Biotechnol., 2003. **21**(10): p. 1184-1191.
10. Karatas, H., et al., *A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection*. J. Neurosci., 2009. **29**(44): p. 13761-13769.
11. Bale, S.S., et al., *Nanoparticle-mediated cytoplasmic delivery of proteins to target cellular machinery*. ACS Nano, 2010. **4**(3): p. 1493-1500.
12. Steinhauser, I.M., et al., *Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation*. Biomaterials, 2008. **29**(29): p. 4022-4028.
13. Langer, K., et al., *Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles*. Int. J. Pharm., 2003. **257**(1-2): p. 169-180.
14. Langer, K., et al., *Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation*. Int. J. Pharm., 2008. **347**(1-2): p. 109-117.
15. Vargas, A., et al., *Toward the understanding of the photodynamic activity of m-THPP encapsulated in PLGA nanoparticles: correlation between nanoparticle properties and in vivo activity*. J. Drug Target., 2009. **17**(8): p. 599-609.

16. Zeisser-Labouebe, M., et al., *Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer*. Int. J. Pharm., 2006. **326**(1-2): p. 174-181.
17. Holzer, M., et al., *Physico-chemical characterisation of PLGA-nanoparticles after freeze-drying and storage*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **72**(2): p. 428-437.
18. Coester, C.J., et al., *Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake*. J. Microencapsul., 2000. **17**(2): p. 187-193.
19. Weber, C., J. Kreuter, and K. Langer, *Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles*. Int. J. Pharm., 2000. **196**(2): p. 197-200.
20. Zensi, A., et al., *Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones*. J. Control. Release, 2009. **137**(1): p. 78-86.
21. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Nanomedicine: current status and future prospects*. FASEB J., 2005. **19**(3): p. 311-330.
22. Mansour, H.M., Y.S. Rhee, and X. Wu, *Nanomedicine in pulmonary delivery*. Int. J. Nanomedicine, 2009. **4**: p. 299-319.
23. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. J. Control. Release, 2008. **132**(3): p. 171-183.
24. Peters, T., Jr., *Serum albumin*. Adv. Protein Chem., 1985. **37**: p. 161-245.
25. Carter, D.C. and J.X. Ho, *Structure of serum albumin*. Adv. Protein. Chem., 1994. **45**: p. 153-203.
26. Murray, J.C., et al., *Molecular genetics of human serum albumin: restriction enzyme fragment length polymorphisms and analbuminemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983. **80**(19): p. 5951-5955.
27. Bosse, D., et al., *Phase I comparability of recombinant human albumin and human serum albumin*. J. Clin. Pharmacol., 2005. **45**(1): p. 57-67.
28. Fasano, M., et al., *The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin*. IUBMB Life, 2005. **57**(12): p. 787-796.
29. Bertucci, C. and E. Domenici, *Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance*. Curr. Med. Chem., 2002. **9**(15): p. 1463-1481.
30. Carter, D.C., et al., *Three-dimensional structure of human serum albumin*. Science, 1989. **244**(4909): p. 1195-1198.
31. Kreuter, J., *Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use*. Pharm. Acta Helv., 1983. **58**(9-10): p. 242-250.
32. Steinhauser, I., et al., *Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells*. Biomaterials, 2006. **27**(28): p. 4975-4983.

33. Kufleitner, J., et al., *Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: Drug loading, particle size and drug release*. J. Microencapsul., 2010.
34. Ruthven, D.M., *Principles of adsorption and adsorption processes*. 1984: Wiley-Interscience.
35. Wunder, A., et al., *Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis*. J. Immunol., 2003. **170**(9): p. 4793-4801.
36. Kratz, F., et al., *Probing the cysteine-34 position of endogenous serum albumin with thiol-binding doxorubicin derivatives. Improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative with specific albumin-binding properties compared to that of the parent compound*. J. Med. Chem., 2002. **45**(25): p. 5523-5233.
37. Wartlick, H., et al., *Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells*. J. Drug Target., 2004. **12**(7): p. 461-471.
38. Stinchcombe, T.E., *Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel Cremphor-EL-free formulation of paclitaxel*. Nanomedicine (Lond), 2007. **2**(4): p. 415-423.
39. Gelperina, S., et al., *Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **74**(2): p. 157-163.
40. Lovrien, R.E. and D. Matulis, *Selective precipitation of proteins*. Curr. Protoc. Protein Sci., 2001. **Chapter 4**: p. Unit 4 5.
41. Rothstein, F., *Differential precipitation of proteins. Science and technology*. Bioprocess Technol., 1994. **18**: p. 115-208.
42. Cohn, E.J., W.L. Hughes, Jr., and J.H. Weare, *Preparation and properties of serum and plasma proteins; crystallization of serum albumins from ethanol water mixtures*. J. Am. Chem. Soc., 1947. **69**(7): p. 1753-1761.
43. Marty, J.J., R.C. Oppenheim, and P. Speiser, *Nanoparticles - a new colloidal drug delivery system*. Pharm. Acta Helv., 1978. **53**(1): p. 17-23.
44. Gurd, F.R. and P.E. Wilcox, *Complex formation between metallic cations and proteins, peptides and amino acids*. Adv. Protein Chem., 1956. **11**: p. 311-427.
45. Ohyoshi, E., et al., *The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry*. J. Inorg. Biochem., 1999. **75**(3): p. 213-218.
46. Han, J. and J. Herzfeld, *Macromolecular diffusion in crowded solutions*. Biophys. J., 1993. **65**(3): p. 1155-1161.
47. Atha, D.H. and K.C. Ingham, *Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume*. J. Biol. Chem., 1981. **256**(23): p. 12108-12117.
48. Langer, R., *Drug delivery and targeting*. Nature, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 5-10.
49. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J. Control. Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-284.

50. Maeda, H., *Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects*. Bioconjug. Chem., 2010.
51. Torchilin, V.P., *Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging*. AAPS J., 2007. **9**(2): p. E128-147.
52. Kaul, G. and M. Amiji, *Biodistribution and targeting potential of poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model*. J. Drug Target., 2004. **12**(9-10): p. 585-591.
53. Nasongkla, N., et al., *Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems*. Nano Lett., 2006. **6**(11): p. 2427-2430.
54. Yu, W., N. Zhang, and C. Li, *Saccharide modified pharmaceutical nanocarriers for targeted drug and gene delivery*. Curr. Pharm. Des., 2009. **15**(32): p. 3826-2836.
55. Heuking, S., et al., *Stimulation of human macrophages (THP-1) using Toll-like receptor-2 (TLR-2) agonist decorated nanocarriers*. J. Drug Target., 2009. **17**(8): p. 662-670.
56. Michaelis, K., et al., *Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2006. **317**(3): p. 1246-1253.
57. Dolmans, D.E., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Photodynamic therapy for cancer*. Nat. Rev. Cancer, 2003. **3**(5): p. 380-287.
58. Detty, M.R., S.L. Gibson, and S.J. Wagner, *Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy*. J. Med. Chem., 2004. **47**(16): p. 3897-3915.
59. Hirth, A., U. Michelsen, and D. Wöhrle, *Photodynamische Tumorthherapie*. Chemie in unserer Zeit, 1999. **2**: p. 84-94.
60. MacCormack, M.A., *Photodynamic therapy*. Adv. Dermatol., 2006. **22**: p. 219-258.
61. Henderson, B.W. and T.J. Dougherty, *How does photodynamic therapy work?* Photochem. Photobiol., 1992. **55**(1): p. 145-157.
62. Pushpan, S.K., et al., *Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers*. Curr. Med. Chem. Anticancer Agents, 2002. **2**(2): p. 187-207.
63. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy*. J. Natl. Cancer Inst., 1998. **90**(12): p. 889-905.
64. van Geel, I.P., et al., *Mechanisms for optimising photodynamic therapy: second-generation photosensitisers in combination with mitomycin C*. Br. J. Cancer, 1995. **72**(2): p. 344-350.
65. Andrejevic-Blant, S., et al., *Photodynamic therapy of early squamous cell carcinoma with tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin: optimal drug-light interval*. Br. J. Cancer, 1997. **76**(8): p. 1021-1028.
66. Ris, H.B., et al., *Effect of drug-light interval on photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin in malignant mesothelioma*. Int. J. Cancer, 1993. **53**(1): p. 141-146.

67. Maugain, E., et al., *Foscan-based photodynamic treatment in vivo: correlation between efficacy and Foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes*. *Oncol. Rep.*, 2004. **12**(3): p. 639-645.
68. Triesscheijn, M., et al., *Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response*. *Photochem. Photobiol.*, 2005. **81**(5): p. 1161-1167.
69. Triesscheijn, M., et al., *The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin in mice and men*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2007. **60**(1): p. 113-122.
70. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. *Mol. Syst. Biol.*, 2005. **1**: p. Art. No 2005.0010.
71. Ferguson, K.M., *Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation*. *Annu. Rev. Biophys.*, 2008. **37**: p. 353-373.
72. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 211-225.
73. Citri, A. and Y. Yarden, *EGF-ERBB signalling: towards the systems level*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006. **7**(7): p. 505-516.
74. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001. **2**(2): p. 127-137.
75. Lurje, G. and H.J. Lenz, *EGFR signaling and drug discovery*. *Oncology*, 2009. **77**(6): p. 400-410.
76. Li, S., et al., *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 301-311.
77. Ortega, J., C.E. Vigil, and C. Chodkiewicz, *Current progress in targeted therapy for colorectal cancer*. *Cancer Control*, 2010. **17**(1): p. 7-15.
78. Nordberg, E., et al., *Cellular studies of binding, internalization and retention of a radiolabeled EGFR-binding affibody molecule*. *Nucl. Med. Biol.*, 2007. **34**(6): p. 609-618.
79. Starling, N. and D. Cunningham, *Cetuximab in previously treated colorectal cancer*. *Clin. Colorectal Cancer*, 2005. **5 Suppl 1**: p. 28-33.
80. Ng, M. and D. Cunningham, *Cetuximab (Erbix) - an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor-expressing tumours*. *Int. J. Clin. Pract.*, 2004. **58**(10): p. 970-976.
81. Spankuch, B., et al., *Downregulation of Plk1 expression by receptor-mediated uptake of antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles*. *Neoplasia*, 2008. **10**(3): p. 223-234.
82. Wacker, M., et al., *Photosensitizer loaded HSA nanoparticles I: Preparation and photophysical properties*. *Int. J. Pharm.*, 2010. **393**(1-2): p. 253-263.

83. Hackbarth, S., E. Ermilov, and B. Röder, *Interaction of Pheophorbide a molecules covalently linked to DAB dendrimers*. Opt. Commun., 2005. **248**: p. 295-306.
84. Schlothauer, J., S. Hackbarth, and B. Röder, *A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence – revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination* Laser Phys. Lett., 2008: p. 1-6.
85. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. Int. J. Cancer, 1977. **19**(5): p. 621-626.
86. Olive, M., et al., *Characterization of the DiFi rectal carcinoma cell line derived from a familial adenomatous polyposis patient*. In Vitro Cell Dev. Biol., 1993. **29A**(3 Pt 1): p. 239-248.
87. Tom, B.H., et al., *Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line*. In Vitro, 1976. **12**(3): p. 180-191.
88. Anhorn, M.G., et al., *Specific targeting of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin-loaded trastuzumab-modified human serum albumin nanoparticles*. Bioconjug. Chem., 2008. **19**(12): p. 2321-2331.
89. Redmond, R.W. and J.N. Gamlin, *A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules*. Photochem. Photobiol., 1999. **70**(4): p. 391-475.
90. Rancan, F., et al., *Fullerene-pyropheophorbide a complexes as sensitizer for photodynamic therapy: uptake and photo-induced cytotoxicity on Jurkat cells*. J. Photochem. Photobiol. B, 2005. **80**(1): p. 1-7.
91. Rabinow, B.E., *Nanosuspensions in drug delivery*. Nat. Rev. Drug. Discov., 2004. **3**(9): p. 785-796.
92. Couvreur, P. and C. Vauthier, *Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease*. Pharm. Res., 2006. **23**(7): p. 1417-1450.
93. Kingsley, J.D., et al., *Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system*. J. Neuroimmune Pharmacol., 2006. **1**(3): p. 340-350.
94. Dreis, S., et al., *Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles*. Int. J. Pharm., 2007. **341**(1-2): p. 207-214.
95. Hekmatara, T., et al., *Encapsulation of water-insoluble drugs in poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2009. **9**(8): p. 5091-5098.
96. Kreuter, J., *Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2004. **4**(5): p. 484-488.
97. Bonnett, R., B.D. Djelal, and Nguyen, *Physical and chemical studies related to the development of m-THPC (FOSCAN (R)) for the photodynamic therapy (PDT) of tumours*. J. Porph. Phthalocyan., 2001. **5**: p. 652-661.
98. Sasnouski, S., et al., *Redistribution of Foscan from plasma proteins to model membranes*. Photochem. Photobiol. Sci., 2006. **5**(8): p. 770-777.

99. Sasnouski, S., et al., *Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells*. Radiat. Res., 2007. **168**(2): p. 209-217.
100. Sasnouski, S., et al., *Investigation of Foscan interactions with plasma proteins*. Biochim. Biophys. Acta, 2005. **1725**(3): p. 394-402.
101. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res., 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-6392.
102. Aggarwal, P., et al., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2009. **61**(6): p. 428-437.
103. Cunderlikova, B., et al., *pH-dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers*. Photochem. Photobiol., 2004. **79**(3): p. 242-247.
104. Brown, S.B., E.A. Brown, and I. Walker, *The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment*. Lancet Oncol., 2004. **5**(8): p. 497-508.
105. Anhorn, M.G., H.C. Mahler, and K. Langer, *Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients*. Int. J. Pharm., 2008. **363**(1-2): p. 162-169.
106. Rhaese, S., et al., *Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery*. J. Control. Release, 2003. **92**(1-2): p. 199-208.
107. Dentuto, P.L., et al., *Photophysical and electrochemical properties of chlorophyll a-cyclodextrins complexes*. Bioelectrochemistry, 2004. **63**(1-2): p. 117-120.
108. Dentuto, P.L., et al., *Cyclodextrin/chlorophyll a complexes as supramolecular photosensitizers*. Bioelectrochemistry, 2007. **70**(1): p. 39-43.
109. Desroches, M.C., et al., *A direct sensitized fluorimetric determination of 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin [m-THPC (Foscan)] in human plasma using a cyclodextrin inclusion complex*. Analyst, 2001. **126**(6): p. 923-927.
110. Phillip Lee, Y.H., et al., *Gefitinib-cyclodextrin inclusion complexes: physico-chemical characterization and dissolution studies*. Drug. Dev. Ind. Pharm., 2009. **35**(9): p. 1113-1120.
111. Davis, M.E. and M.E. Brewster, *Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*. Nat. Rev. Drug Discov., 2004. **3**(12): p. 1023-1035.
112. Huber, V., et al., *Reversible self-organization of semisynthetic zinc chlorins into well-defined rod antennae*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2005. **44**(20): p. 3147-3151.
113. Grabarek, Z. and J. Gergely, *Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters*. Anal. Biochem., 1990. **185**(1): p. 131-135.
114. Timkovich, R., *Polymerization side reactions during protein modifications with carbodiimide*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977. **74**(4): p. 1463-1468.

115. Nyman, E.S. and P.H. Hynninen, *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy*. J. Photochem. Photobiol. B, 2004. **73**(1-2): p. 1-28.
116. Zhang, M., et al., *High-load, soluble oligomeric carbodiimide: synthesis and application in coupling reactions*. J. Org. Chem., 2004. **69**(24): p. 8340-8344.
117. Ambroz, M., et al., *Time-resolved fluorescence spectroscopy and intracellular imaging of disulphonated aluminium phthalocyanine*. J. Photochem. Photobiol. B, 1994. **22**(2): p. 105-117.
118. Pfister, A., et al., *Boron polylactide nanoparticles exhibiting fluorescence and phosphorescence in aqueous medium*. ACS Nano, 2008. **2**(6): p. 1252-1258.
119. Ogilby, P.R. and C.S. Foote, *Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen*. J. Am. Chem. Soc., 1983. **105**: p. 3423-3430.
120. Preuß, A., et al. *Comprehensive in vitro investigations on biodegradable photosensitizer-nanoparticle delivery systems in 7th Internations Symposium of Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice*. 2008. Brixen.
121. Wacker, M., et al., *Photosensitizer loaded HSA nanoparticles - Optimization of preparation process and uptake into Jurkat cells*, in *AAPS Annual Meeting 2010*. 2010: New Orleans.
122. Löw, K., et al. *Accumulation of targeted HSA-nanoparticles in different colon carcinoma cell lines using EGFR-expression*. in *7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*. 2010. Malta.

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kristallstruktur von Humanem Serum Albumin	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der verbesserten Anreicherung von nanopartikulären Trägersystemen	22
Abbildung 3: Löslichkeit von mTHPP und mTHPC in Ethanol 34,4% [V/V] unter Zusatz von 0,0 - 2,0% HSA	70
Abbildung 4: HPLC-Chromatogramme von mTHPP, mTHPC und mTHPP-COOH nach 24 h Inkubation mit Glutaraldehyd bei den pH-Werten 6, 7 und 9	71
Abbildung 5: Schematische Darstellung der verwendeten Flügelrührer	74
Abbildung 6: Partikelgröße und Polydispersität bei Herstellung von HSA-Nanopartikeln nach Desolvatation	75
Abbildung 7: Freundlich-Isotherme zur Adsorption von mTHPP an HSA-Nanopartikel	76
Abbildung 8: Adsorption von mTHPC und mTHPP an HSA-Nanopartikel bei steigenden HSA-Konzentrationen	79
Abbildung 9: Zetapotential und Partikelgröße von leeren sowie mTHPC- und mTHPP-beladenen HSA-Nanopartikeln	80
Abbildung 10: REM-Aufnahmen von mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln und einer leeren Membranfiltereinheit	82
Abbildung 11: TEM-Aufnahmen von mTHPP-beladenen HSA-Nanopartikeln	82
Abbildung 12: GPC-Chromatogramme des Überstandes von mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln	84
Abbildung 13: Vergleich der Adsorption von mTHPC und mTHPP in Abhängigkeit des pH-Wertes	85
Abbildung 14: Partikelgröße und Polydispersitätsindex von adsorptiv mit mTHPC beladenen HSA-Nanopartikeln nach Gefriertrocknung	91
Abbildung 15: Löslichkeitsverbesserung von mTHPC mit 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, β -Methylcyclodextrin und Zinkchlorid durch Gefriertrocknung	98
Abbildung 16: Partikelgröße und Polydispersitätsindex von HSA-Nanopartikeln nach Desolvatation mit Polyethylenglykol und pH-Werten zwischen 6 und 6,5	103
Abbildung 17: Abhängigkeit von Partikelgröße und Polydispersitätsindex vom eingesetzten Volumen an PEG 4000 40%	104
Abbildung 18: Nachweis von PEG 4000 mittels GPC in den Partikelüberständen von HSA-Nanopartikeln nach der Herstellung durch PEG-HSA-Desolvatation	105
Abbildung 19: TEM-Aufnahmen leerer PD HSA-Nanopartikel mit einem Quervernetzungsgrad von 350%	106
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Reaktion von EDC mit HSA und mTHPP-COOH unter Bildung einer Amidbindung	109
Abbildung 21: Fraktionierung von HSA-mTHPP-COOH-Konjugaten nach EDC-Reaktion	110
Abbildung 22: GPC-Chromatogramme der Reaktionsprodukte von freiem HSA mit mTHPP-COOH	111
Abbildung 23: Overlay der GPC-Chromatogramme von mTHPP-COOH-HSA-Konjugaten	112
Abbildung 24: Strukturformeln der beiden Wirkstoffe mTHPC und mTHPP-COOH	113
Abbildung 25: Overlay der GPC-Chromatogramme von Fraktion 4 der mTHPP-COOH-HSA-Konjugaten bzw. mTHPC-Konjugaten	114
Abbildung 26: Beladungsrate von HSA-Nanopartikeln mit mTHPC und mTHPP-COOH abhängig von der Inkubationszeit	120
Abbildung 27: REM-Aufnahmen von HSA-Nanopartikeln nach Umsetzung mit mTHPC	121
Abbildung 28: Partikelgröße und Polydispersitätsindex von mTHPC- HSA-Nanopartikeln bzw. mTHPP-COOH-HSA-Nanopartikeln nach Gefriertrocknung	121

Abbildung 29: Schematische Darstellung der Antikörperbindung an HSA-Nanopartikel unter Verwendung eines heterobifunktionalen Crosslinkers und Traut's Reagenz für die Thiolierung	123
Abbildung 30: GPC-Chromatogramm des IgG-Antikörpers Cetuximab und des thiolierten Antikörpers	124
Abbildung 31: Aufnahmen von 5-TAMRA-gelabelten mTHPC-HSA-Nanopartikeln mit einem Opera-Fluoreszenzmikroskop	127
Abbildung 32: Absorptionsspektren von mTHPP und mTHPC in Ethanol sowie von mTHPP- und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in Wasser	129
Abbildung 33: Strukturformeln der beiden Wirkstoffe mTHPC und mTHPP	130
Abbildung 34: Fluoreszenzspektren von mTHPP und mTHPC sowie mTHPP- und mTHPC-HSA-Nanopartikeln	131
Abbildung 35: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz Abklingkurve in Jurkat-Zellen nach 5-stündiger Inkubation mit mTHPP, mTHPC sowie mTHPP- und mTHPC-HSA-Nanopartikeln	134
Abbildung 36: Photosensibilisator-Lokalisation in den Lysosomen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Lysosomen-Marker LysoSensor Green®, Photosensibilisator und dem Overlay	136
Abbildung 37: FLIM-Bilder der Photosensibilisator-Verteilung in Jurkat-Zellen nach 1, 3, 5 und 24 h	137
Abbildung 38: Anreicherung von Cetuximab-modifizierten HSA-Nanopartikeln in DiFi- und LS174T-Zellen nach Inkubation mit IgG-, PEG- und Cetuximab-HSA-Nanopartikeln	139

6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentualer Gehalt verschiedener Photosensibilisatoren nach Filtration	68
Tabelle 2: Löslichkeit verschiedener Photosensibilisatoren in Ethanol 55,0% und Ethanol 62,3%	69
Tabelle 3: Beladung von HSA-Nanopartikeln bei verschiedenen HSA-Konzentrationen	78
Tabelle 4: Beladung von HSA-Nanopartikeln bei verschiedenen HSA-Konzentrationen	78
Tabelle 5: Adsorption von mTHPC und mTHPP an HSA-Nanopartikel bei unterschiedlichen Inkubationszeiten	86
Tabelle 6: Adsorption von mTHPP bei unterschiedlichem Quervernetzungsgrad	87
Tabelle 7: Desorption von mTHPP von mTHPP-HSA-Nanopartikeln in Zellkulturmedien	89
Tabelle 8: Wiederfindung von mTHPP in Zellkulturmedien	89
Tabelle 9: Desolvatation von mTHPP- und mTHPC-haltigen HSA-Lösungen mit unterschiedlichen Ethanol-Volumina	93
Tabelle 10: pH-Abhängigkeit der Desolvatation HSA in Gegenwart von mTHPC	94
Tabelle 11: Einflüsse verschiedener Cyclodextrin-Konzentrationen auf die ethanolische Desolvatation	95
Tabelle 12: Inkorporierung durch Desolvatation von mTHPP in Anwesenheit von Cavasol W7 HP® Pharma	96
Tabelle 13: Herstellung von HSA-Nanopartikeln durch Desolvatation mit PEG in Gegenwart von mTHPC	107
Tabelle 14: Charakterisierung von HSA-Nanopartikeln nach Reaktion mit mTHPP-COOH unter Vermittlung von EDC	116
Tabelle 15: Charakterisierung von HSA-Nanopartikeln nach Reaktion mit mTHPC unter Vermittlung von EDC	117
Tabelle 16: Charakteristika von Antikörper-modifizierten HSA-Nanopartikeln	125
Tabelle 17: Fluoreszenz-Lebensdauer von mTHPP und mTHPC in Ethanol sowie mTHPP- und mTHPC-HSA-Nanopartikeln in wässriger Suspension	132

Tabelle 18: Singulett-Sauerstoff Generierung und Triplett-Parameter von Rose Bengal, 133 mTHPP, mTHPC sowie mTHPP- und mTHPC-beladenen HSA-Nanopartikeln in Suspension und in Jurkat-Zellen

6.5. Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Matthias Gerhard Wacker
Geburtsdatum: 08.05.1980
Geburtsort: Hanau am Main
Nationalität: Deutsch

Schulischer Werdegang

1986 – 1990 Kurt-Schuhmacher Grundschule in Nidderau
1990 – 1999 Hohe Landesschule Hanau in Hanau am Main
06/1999 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst

08/1999 – 06/2000 Zivildienst beim Sozialamt der Stadt Nidderau
Betreuung von Kindergärten

Studium

2000 – 2005 Studium der Pharmazie an der Johann-Wolfgang-
Goethe Universität in Frankfurt am Main
03/2003 Erstes Staatsexamen der Pharmazie
11/2005 Zweites Staatsexamen der Pharmazie
12/2006 Drittes Staatsexamen der Pharmazie
12/2006 Approbation als Apotheker

Berufspraxis

11/2005 – 04/2006 Praktikum bei Merck Selbstmedikation GmbH in
Darmstadt (Galenische Entwicklung)
05/2006 – 11/2006 Praktikum in der Westend-Apotheke in
Frankfurt am Main

Promotion

01/2007 – 07/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität
in Frankfurt am Main
01/2007 – 07/2010 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Langer
an der Goethe-Universität Frankfurt am Main

6.6. Veröffentlichungen und Patente

12/2009	Chen K., Preuss A., Hackbarth S., Wacker M., Langer K., Roeder B.: Novel photosensitizer-protein nanoparticles for photodynamic therapy: photophysical characterization and in vitro investigations, J. Photochem. Photobiol. B (96) 66-74.
04/2010	Wacker M., Chen K., Preuss A., Possemeyer K., Roeder B., Langer K.: Photosensitizer loaded HSA nanoparticles I: Preparation and photophysical properties, Int. J. Pharm.(393) 253-263
06/2010	Shun-zhen Z., Löw K., Wacker M., Wiehe A., Wagner S., Langer K., von Briesen H., Sheng-quan Z.: Interaction and cytotoxicity of mTHPC and mTHPC complexes in Jurkat cell, Chin. J. Exp. Surg. (27) 84-87
Eingereicht	Chen K., Wacker M., Hackbarth S., Ludwig C, Langer K., Roeder B.: Photophysical evaluation of mTHPC-loaded HSA nanoparticles as novel PDT delivery systems, J. Photochem. Photobiol. B
Eingereicht	Preuß A., Chen K., Hackbarth S., Wacker M., Langer K., Roeder B.: Photosensitizer loaded HSA nanoparticles II: In vitro investigations, Int. J. Pharm.
In Bearbeitung	Patent BJA485A „Nanoparticle Carrier Systems based on Human Serum Albumin for Photodynamic Therapy” (Provisorial Application)