

Dipl.-Ing. (FH) Regina Bleul

**Herstellung, Charakterisierung und
Funktionalisierung polymerer Nanopartikel
und Untersuchung der Wechselwirkungen
mit biologischen Systemen**

Die vorliegende Arbeit entstand an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Impressum

**Herstellung, Charakterisierung und
Funktionalisierung polymerer Nanopartikel
und Untersuchung der Wechselwirkungen
mit biologischen Systemen**

2015

Herausgeber:

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Unter den Eichen 87

12205 Berlin

Telefon: +49 30 8104-0

Telefax: +49 30 8112029

E-Mail: info@bam.de

Internet: www.bam.de

Copyright © 2015 by

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Layout: BAM-Referat Z.8

ISSN 1613-4249

ISBN 978-3-9817149-4-4

Herstellung, Charakterisierung und Funktionalisierung polymerer Nanopartikel und Untersuchung der Wechselwirkungen mit biologischen Systemen

Dissertation

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

eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

REGINA BLEUL
aus Selters/Taunus

2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael Maskos

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag

Tag der Disputation: 3. September 2014

„I learned then what science was about: it was patience“

RICHARD P. FEYNMAN (1918 – 1988)

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen, die mich während meines Studiums und der Promotionszeit unterstützt und zum Durchhalten motiviert haben und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Maskos dafür, dass ich ein spannendes Thema in großer Freiheit bearbeiten konnte, für seinen ausdauernden Optimismus sowie das entgegengebrachte Vertrauen und die vielfältige Unterstützung – vor allem auch bei der Organisation meines Auslandsaufenthaltes.

Bei Prof. Dr. Rainer Haag bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundene Möglichkeit, meine Promotion an der FU Berlin durchzuführen sowie für die Unterstützung bei der Beantragung des DAAD-Stipendiums.

Mein herzlicher Dank geht an die vielen freundlichen und hilfsbereiten Menschen, denen ich an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung begegnet bin. Im Einzelnen danke ich Frau Otten-Walther und Herrn Saling sowie Frau Schirmer und Frau Haske für die vielseitige, tatkräftige Unterstützung in Organisations- und Verwaltungsfragen, der ehemaligen BAM 6.3.6 für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders bedanke ich mich bei Raphael Thiermann für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und die vielen Kryo-TEM-Aufnahmen. Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Ulrike Braun, PD Dr. Andreas Thünemann, Dr. Annabelle Bertin und die gesamte BAM 6.5.

Für die Einladung in sein Labor und die tolle und erfolgreiche Zeit in Vancouver bedanke ich mich bei Assoc./Prof. Dr. Urs O. Häfeli, beim DAAD für die finanzielle Unterstützung dieses Auslandsaufenthaltes und bei allen lieben Kollegen an der UBC. Ganz besonderer Dank geht an Veronika Schmitt für die herzliche Aufnahme im Labor wie auch in der WG und die Einblicke in die faszinierende Welt des Kletterns, Backcountry...u.v.m.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Diana Bachran (AG Fuchs, Charité Berlin), Norbert Löwa, Christian Knopke und Dr. Dietmar Eberbeck (PTB 8.21, Berlin), Dr. Norbert Jakubowski (BAM 1.1, Berlin), Assoc./Prof. Dr. Michael J. House und Prof. Dr. Tim G. St. Pierre (UWA, Perth, Australien) danke ich für die tolle Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden für die tatkräftige und liebevolle Unterstützung, für die Hilfe bei der Erstellung einiger Graphiken, die ausdauernde Korrekturleserei, die große Anteilnahme und das Mitfeiern.

Kurzfassung

Die Nanomedizin beschäftigt sich unter anderen mit der Frage, wie sich die Behandlung gefährlicher Krankheiten effizienter und sicherer gestalten lässt, deren konventionelle Therapie oftmals mit schweren Nebenwirkungen einhergeht. Die Vision ist, ein theranostisches Wirkstoffträgersystem zu schaffen, das seinen therapeutischen Cargo sicher an den Wirkort transportiert, dort freisetzt und gleichzeitig in Echtzeit verfolgt werden kann, um die Therapie individuell anzupassen. Die Grundlage für die erfolgreiche Entwicklung eines Wirkstoffträgersystems bilden Untersuchungen zum Verhalten von nanopartikulären Substanzen in physiologischer Umgebung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden polymere Nanopartikel unterschiedlicher Morphologie durch die kontrollierte Selbstorganisation amphiphiler Blockcopolymere hergestellt, charakterisiert und auf ihre Wechselwirkungen mit menschlichen Zellen und Serumproteinen untersucht. Dazu wurde eine Studie zur Geometrie- und Größenabhängigkeit der Zytotoxizität von nanoskaligen Kugel- und Zylindermizellen sowie Vesikelstrukturen durchgeführt. Des Weiteren wurde das Agglomerationsverhalten von verschiedenen polymeren Nanopartikeln in Anwesenheit von Serumproteinen untersucht. Mit Hilfe eines Mikromischer-basierenden Verfahrens gelang es, kontinuierlich sehr einheitliche Polymervesikel herzustellen und diese *in situ* mit unterschiedlichen Komponenten zu beladen - unter anderem mit dem Wirkstoff Camptothecin sowie einer hohen Dichte an hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikeln. Diese wirkstoffbeladenen Hybridvesikel zeigten *in vitro* im Vergleich zum freien Wirkstoff eine erhöhte zytotoxische Wirksamkeit gegen die Krebszelllinie PC-3. Nach einer Funktionalisierung mit einem krebszellspezifischen Targeting-Peptid und einer zusätzlichen Fluoreszenzmarkierung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie und konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie eine rezeptorspezifische Zellaufnahme in PC-3-Krebszellen demonstriert. Messungen zur magnetischen Charakterisierung bestätigten zudem die potenzielle Anwendung magnetischer Polymervesikel als MRT-Kontrastmittel wie auch als Tracer für das Magnetic Particle Imaging (MPI). Kontinuierlich hergestellte, wirkstoffbeladene, magnetische Polymervesikel erfüllen somit viele Grundvoraussetzungen für ein theranostisches Wirkstoffträgersystem und bieten weitere Entwicklungsmöglichkeiten im Hinblick auf Magnetfluid-Hyperthermie, magnetisches Targeting oder eine durch ein Magnetfeld induzierte Wirkstofffreisetzung.

Abstract

One of the main goals of nanomedicine is to improve the treatment of hazardous diseases whose conventional therapy often has serious side effects. The vision is to create a theranostic drug delivery system which is capable of safely transporting therapeutic cargo through the body to a targeted site of disease at which point the drug is released. Furthermore, it is desirable to track the carrier in real time which would allow for a personal adjustment of the therapy. Studies on the behavior of nanoparticulate substances in a physiological environment form the basis for the possibility to successfully develop a drug carrier system. In the present work, polymeric nanoparticles with different morphologies were prepared by the controlled self-assembly of amphiphilic block copolymers. The nanoparticles were subsequently characterized and their interactions with human cells and serum proteins investigated. A cytotoxicity study with spherical and cylindrical micelles as well as vesicular structures was carried out and showed a dependency of cytotoxic effects on the geometry and size of the nanoparticles. The agglomeration behavior of various polymeric nanoparticles in the presence of serum proteins was also studied.

Highly uniform polymeric vesicles were continuously manufactured in a micromixer based device and *in situ* loading with different components was performed. In this way, dual loaded vesicles with the anticancer drug camptothecin and a high amount of hydrophobic iron oxide nanoparticles were produced. When tested *in vitro*, these drug-loaded vesicles showed an increased cytotoxic activity against the cancer cell line PC-3 when compared to the free drug. Specific cellular uptake in PC-3 cancer cells was demonstrated with flow cytometry and confocal laser scanning microscopy after functionalization with a cancer cell specific targeting peptide and an additional fluorescent label. Magnetic characterization of the iron oxide-loaded vesicles also confirmed the potential application as MRI contrast agents and as tracers for magnetic particle imaging (MPI). Continuously manufactured, drug-loaded, magnetic polymeric vesicles thus fulfill many prerequisites for a theranostic drug carrier system and provide opportunities for further developments in the field of magnetic fluid hyperthermia, magnetic targeting or magnetic drug release.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	IX
Abstract	XI
Inhaltsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Nanotechnologie	1
1.2 Nanopartikel für Anwendungen in der Medizin	4
1.2.1 Problematik niedermolekularer Wirkstoffe	4
1.2.2 Rationales Design von Wirkstoffträgersystemen	6
1.2.3 Die Rolle der Filtrationsorgane bei der Biodistribution	7
1.2.4 Wechselwirkung von Nanopartikeln mit Serumproteinen	9
1.2.5 Nanotransporter in der klinischen Anwendung	13
1.3 Zielsetzung.....	23
2 Theoretischer Hintergrund	25
2.1 Amphiphile Blockcopolymere	25
2.2 Selbstorganisation von Amphiphilen.....	25
2.2.1 Kinetik der Selbstorganisation.....	30
2.3 Polymersome	32
2.3.1 Herstellungsmethoden für Polymersome.....	32
2.3.2 Kontinuierliche Herstellung von Polymersomen im Mikromischer.....	35
2.3.3 Das Polymer Polybutadien- <i>block</i> -Polyethylenoxid	42
2.3.4 Das Polymer Pluronic® L121	46
2.3.5 Der Wirkstoff Camptothecin	50
2.3.6 Bombesin als Targeting-Ligand	51
2.4 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel	53
2.4.1 Synthese	53
2.4.2 Physikalische Eigenschaften von Eisenoxid-Nanopartikeln	56
2.4.3 Hyperthermie	60
2.4.4 Magnetresonanztomographie (MRT)	63
2.4.5 Magnetic Particle Imaging (MPI)	66
3 Charakterisierungsmethoden	71
3.1 Lichtstreuung	71
3.1.1 Statische Lichtstreuung.....	72
3.1.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	76
3.1.3 Das ρ -Verhältnis	80
3.1.4 Lichtstreuung an Multikomponentensystemen.....	80

3.2	Zeta-Potenzial.....	82
3.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	84
3.4	Zytoxizitätstests	86
3.5	Durchflusszytometrie.....	86
3.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	87
4	Ergebnisse und Diskussion.....	89
4.1	Grundlegende Untersuchungen von Nanostrukturen aus Poly(1,2-butadien)- <i>block</i> -poly(ethylenoxid).....	89
4.1.1	Kontrollierte Selbstorganisation von PB- <i>b</i> -PEO-Polymeren	89
4.1.2	<i>In-Situ</i> -Beladung vesikulärer PB- <i>b</i> -PEO-Nanostrukturen.....	108
4.1.3	Zytoxizität verschiedener PB- <i>b</i> -PEO-Nanostrukturen	120
4.1.4	Polymere Nanopartikel in Wechselwirkung mit Serumproteinen	127
4.1.5	Polymersom-Zell-Interaktion	131
4.2	Polymer-Vesikel aus Poly(ethylenoxid)- <i>block</i> -Poly(propylenoxid)- <i>block</i> - Poly(ethylenoxid)	135
4.2.1	Herstellung und Beladung von Pluronic®-Polymersomen	138
4.2.2	Stabilität der non-equilibrium L121-Vesikel in Abhängigkeit der Beladung ...	151
4.2.3	Freisetzungsmodell Phloxin B	160
4.2.4	Pluronic®-Polymersome als theranostisches Wirkstoffträgersystem.....	162
4.2.5	Magnetische Charakterisierung Eisenoxid-beladener Polymersome	170
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	175
6	Experimenteller Teil.....	181
6.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	181
6.2	Herstellung und Beladung von polymeren Nanostrukturen	182
6.2.1	Kontinuierliche Herstellung im Mikromischer.....	182
6.2.2	Filmrehydratation	183
6.2.3	Co-Lösemittel-Methode.....	183
6.3	Charakterisierungsmethoden	183
6.3.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	183
6.3.2	Lichtstreuung- und Zeta-Potenzial-Messungen.....	184
6.3.3	Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration und Aggregationstemperatur	184
6.4	Proteinadsorption.....	185
6.4.1	DLS-Multikomponenten-Analyse	185
6.4.2	Bestimmung der Beladungseffizienz.....	185
6.4.3	<i>In-Vitro</i> -Freisetzungsstudien	186
6.4.4	Zellviabilitäts-Assay	186
6.4.5	Durchflusszytometrie (FACS)	187
6.5	Funktionalisierung	188

6.5.1	Carboxylierung von Pluronic® L121	188
6.5.2	Farbstoffmarkierung und Biokonjugation	188
6.5.3	Quantifizierung des Peptids auf der Polymersom-Oberfläche	189
6.5.4	<i>In-Vitro</i> -Zellbindung- und Zellaufnahme-Studie	190
6.6	Magnetische Charakterisierung	191
6.6.1	Relaxometrie-Messungen	191
6.6.2	Magnetic Particle Spectroscopy (MPS).....	191
7	Literaturverzeichnis	193
8	Verzeichnis erfolgter Publikationen	211
9	Anhang	213
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	213
9.2	Zusätzliche Daten und Abbildungen	218

1 Einleitung

1.1 Nanotechnologie

Die Nanotechnologie ist nicht nur Forschungsschwerpunkt vieler internationaler Forschergruppen, sondern auf Grund ihrer stetig steigenden Präsenz im Alltag auch oftmals Gegenstand öffentlicher Diskussionen. Sie ist jedoch keineswegs eine Erfindung des letzten Jahrzehnts, sondern übt ihre Faszination schon über ein halbes Jahrhundert auf viele Wissenschaftler aus. Der Nobelpreisträger Richard P. Feynman zählt zu den Begründern der Nanotechnologie. In einem seiner berühmten Vorträge „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ (dt.: Es gibt noch eine Menge Spielraum nach unten) sagte der Physiker bereits 1959 den Trend der Miniaturisierung voraus. Definiert wurde der Terminus *Nanotechnologie* erstmals 1974 von Professor Norio Taniguchi: *Nanotechnology mainly consists of the processing of separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or one molecule.*¹

Heutzutage ist die Definition der Nanotechnologie im allgemeinen Verständnis etwas breiter gefasst und beinhaltet alle Materialien und Strukturen im Größenbereich zwischen 1 und 100 nm und deren Untersuchung und Entwicklung für verschiedenste Anwendungen. So lautet beispielsweise die Definition der US National Nanotechnology Initiative (NNI):

“Nanotechnology is the understanding and control of matter at dimensions between approximately 1 and 100 nanometers, where unique phenomena enable novel applications. Encompassing nanoscale science, engineering, and technology, nanotechnology involves imaging, measuring, modeling, and manipulating matter at this length scale.”

Das Präfix *Nano* des Terminus *Nanotechnologie* hat griechische Wurzeln und bedeutet übersetzt *Zwerg*. Im internationalen Einheitensystem steht das Präfix *Nano* für einen Faktor von 10^{-9} , damit entspricht 1 nm also $1 \cdot 10^{-9}$ m als SI-Einheit (International System of Units). Die Nanoskala liegt damit zwischen der Größenordnung eines einzelnen Atoms ($1 \text{ \AA} = 10^{-10}$ m) und bekannten mikroskopischen Strukturen wie beispielsweise bakteriellen oder menschlichen Zellen (Abb. 1.1).

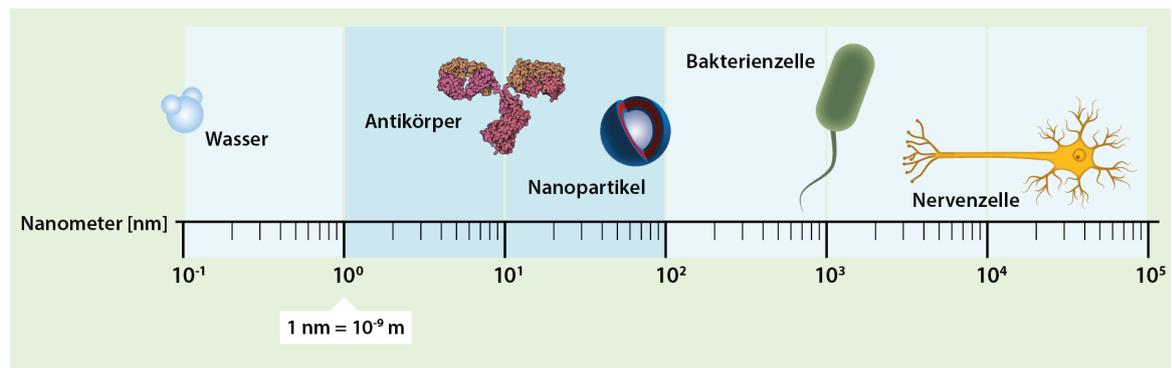


Abb. 1.1: Nanoskala. Die Nanotechnologie bezieht sich auf den Größenbereich zwischen 1 und 100 Nanometer und liegt damit zwischen der Größe eines einzelnen Atoms und mehreren Mikrometer großer menschlicher Zellen.

Nanoskalige Materialien zeichnen sich durch besondere Eigenschaften aus, die nicht allein dem Stoff, sondern vielmehr ihrer geringen Größe zuzuordnen sind. Viele Phänomene lassen sich mit dem extremen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis erklären, was zu einer Dominanz von Oberflächenenergie verglichen mit dem Bulkmaterial führt. Die Nanotechnologie kombiniert wissenschaftliche Inhalte aus der Physik, der Chemie und der Biologie, wobei die Biologie als Lebenswissenschaft mit ihren vielen faszinierenden Nano-Maschinerien gerade in der medizinischen Nanotechnologie die Kern-Disziplin darstellt. Die Faszination der Komplexität zellulärer Bestandteile wie Zellmembranen, Mitochondrien oder Chloroplasten als auch nanostrukturierter Oberflächen führte Wissenschaftler in das Feld der Nanobiotechnologie. Nach dem Vorbild der Oberfläche von Lotusblättern wurden beispielsweise superhydrophobe, schmutzabweisende Materialien entwickelt.² Schmetterlingsflügel mit ihren besonderen Photon-Resonanz-Effekten, welche ebenfalls auf Nanostrukturierung basieren, dienten bereits als Modell für Sensorentwicklungen.³ Auch die Fähigkeit von Geckos, mit ihren Füßen an glatten Oberflächen Halt zu finden, beruht auf besonderen Nanostrukturen, welche schon für biomimetische Materialien nachgebildet wurden.⁴ Weitere Beispiele für organisierte Nanostrukturen sind Faserproteine wie Kollagene, das Wechselspiel von Aktin und Cadherinen für die Zelladhäsion, Zellmaschinerien wie Protonenpumpen, Transmembran-Transport-Mechanismen und rezeptorvermittelte Prozesse. All dies sind nanoskalige Strukturen und Mechanismen, die nicht nur für das Verständnis und die Behandlung von Krankheiten eine große Rolle spielen, sondern auch für industrielle Anwendungen biomimetische Vorbilder darstellen. Ein ganz besonders faszinierendes Beispiel eines „Nanoroboters“ ist der Bakteriophage T4 (Abb. 1.2). Dieser Virus dockt

mit den Schwanzfasern an Porinproteine der äußeren Membran an die Bakterienzelle an, setzt mit dem Stachel Lysozym frei, um ein Loch in die Zellwand zu lösen, und injiziert dann durch den Stachel hindurch die Phagen-DNA in die Gastzelle. So wird die zelluläre Maschinerie genutzt, um virale DNA und damit auch virale Proteine wie beispielsweise Bestandteile der Phagenhülle zu produzieren. Schließlich wird die Zelle durch die Freisetzung von Lysozym vollständig zerstört und die neuproduzierten Phagen werden freigesetzt. Die weitgehende Untersuchung dieses Bakteriophagen konnte viel zur Aufklärung von viralen Infektionsverläufen beitragen. Der Bakteriophage T4 gilt jedoch auch als wichtiges Vorbild zum Design künstlicher Vehikel für die Gentherapie. Die Methoden der Nanotechnologie ermöglichen es heutzutage, in ähnlichem Maßstab wie die Natur zu arbeiten und viele Mechanismen besser zu verstehen. Das Ziel besteht darin, die Effizienz, Nachhaltigkeit und die beeindruckende Leistungsfähigkeit biologischer Systeme zu erreichen und bei Dysfunktion gezielt eingreifen zu können.

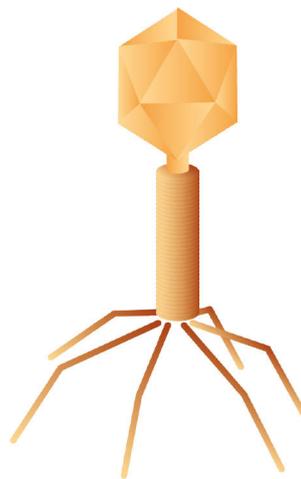


Abb. 1.2: Bakteriophage T4

1.2 Nanopartikel für Anwendungen in der Medizin

Nanopartikel für verschiedenste Anwendungen in der Medizin sind Gegenstand aktueller Forschung. Sicherlich steht bei der Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen eine sichere, effiziente und auch im höheren Maße personalisierte Medikation bei schweren Krankheiten im Vordergrund. Doch auch für bildgebende Verfahren in der Medizin wie beispielsweise für die Magnetresonanztomographie (MRT) stellen nanopartikuläre Systeme ein sehr wichtiges Forschungsgebiet dar. Aktuell orientiert sich die Nanomedizin deutlich in Richtung multifunktionaler Systeme, die Wirkstofftransport und Bildgebung vereinen. Für diesen neuen Forschungszweig wurde sogar ein neuer Terminus geschaffen, welcher sich aus den Begriffen Therapie und Diagnostik zusammensetzt, die sogenannte *Theranostik*. Ziel ist es, Nanotransporter zu erschaffen, welche gleichzeitig diagnostische und therapeutische Funktionen ausüben können und so die Detektion einer Krankheit direkt mit der Behandlung kombinieren. Ein erster Schritt in Richtung Theranostik ist die Einbindung von Kontrastmitteln oder *Tracern* in ein Wirkstoffträgersystem. Dadurch kann der Nanotransporter im Körper verfolgt und es können wichtige Informationen zur Biodistribution erhalten werden. Gleichzeitig wird das Studium therapeutischer Mechanismen erleichtert. Diese Erkenntnisse können schließlich zur Weiterentwicklung von Behandlungsstrategien genutzt werden, um eine individuell optimierte Therapie zu gestalten.

Die Motivation zur Erschaffung multifunktionaler Nanotransporter entspringt also dem Wunsch, die Möglichkeiten der Therapie insbesondere bei sehr schweren Krankheiten zu verbessern.

1.2.1 Problematik niedermolekularer Wirkstoffe

Bei Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen werden viele Probleme thematisiert, die sich für niedermolekulare Wirkstoffe ergeben. So gibt es beispielsweise einige Wirkstoffe, die eine so geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, dass sie ohne Lösungsvermittler nicht eingesetzt werden können. Bisher werden solche Substanzen häufig als Formulierung z.B. mit polyethoxyliertem Kastoröl (Handelsname Cremophor®) appliziert. Dieses führt jedoch häufig zu schwerwiegenden allergischen Reaktionen, sodass zusätzlich ein Anti-Allergen verabreicht werden muss.⁵ Pharmakokinetik und Biodistribution stellen weitere Probleme dar. So haben niedermolekulare Wirkstoffe generell eine sehr geringe Blutzirkulationszeit und werden

schnell aus dem Körper eliminiert, weshalb eine hohe Dosis notwendig wird. Dies führt wiederum zu einer Verstärkung der Nebenwirkungen, da die Wirksubstanzen meist keine Selektivität für den Wirkort haben und auf Grund ihrer geringen Größe weit in gesunde Gewebe diffundieren können. Für Behandlungen, bei denen ein konstanter Spiegel der Wirkkomponente erforderlich ist, sind ständig erneute Verabreichungen notwendig, welches eine starke Belastung für den Patienten bedeuten kann, da das therapeutische Fenster oft nur sehr klein ist (Abb. 1.3). Auch die Stabilität der Wirkstoffe kann problematisch werden - so sind z.B. gerade neuere Krebstherapeutika basierend auf siRNA (*short interfering ribonucleic acid*) oder Peptiden empfindlich gegenüber pH-Veränderungen oder werden sehr schnell durch Enzyme abgebaut, noch bevor sie ihren Wirkort erreicht haben.

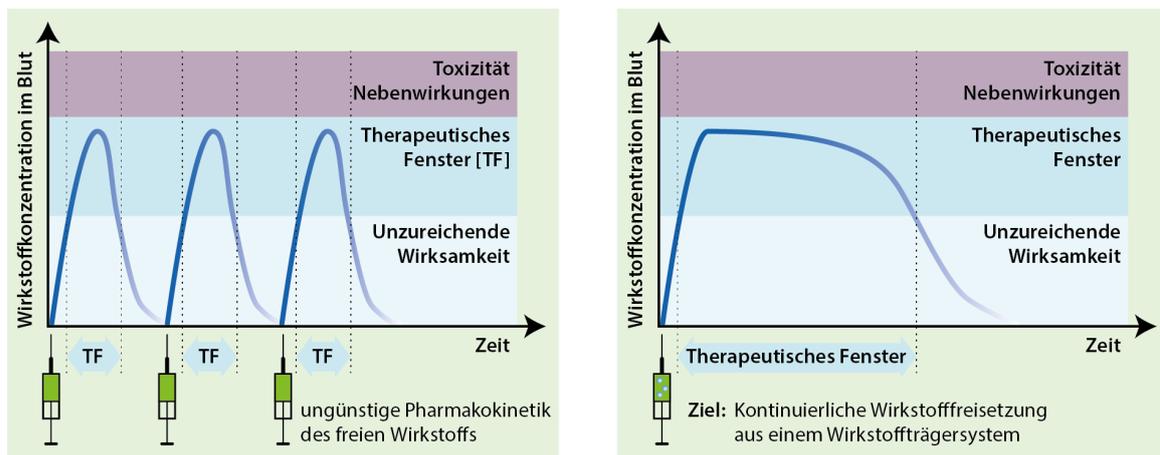


Abb. 1.3: Therapeutisches Fenster. Nach Wirkstoffverabreichung kommt es zu einem schnellen Anstieg der Wirkstoffkonzentration. Für eine begrenzte Zeit befindet sich der Wirkstoffspiegel innerhalb des therapeutischen Fensters, danach fällt er wieder in zu geringe Konzentrationen ab, weshalb eine erneute Wirkstoffgabe notwendig wird (linkes Bild). Wird die Wirkstoffdosis zu hoch gewählt, gelangt man in den toxischen Bereich der Wirkstoffkonzentration und es treten vermehrte, z.T. schwere oder gar lebensbedrohliche Nebenwirkungen auf. Die Entwicklung eines Wirkstoffträgersystems soll die Zeit im therapeutischen Fenster beispielsweise durch eine kontinuierliche Wirkstofffreigabe verlängern (rechtes Bild).

1.2.2 Rationales Design von Wirkstoffträgersystemen

Die Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen verlangt ein sorgfältiges Design, bei dem es eine Vielzahl von Aspekten zu beachten gilt (Abb. 1.4).

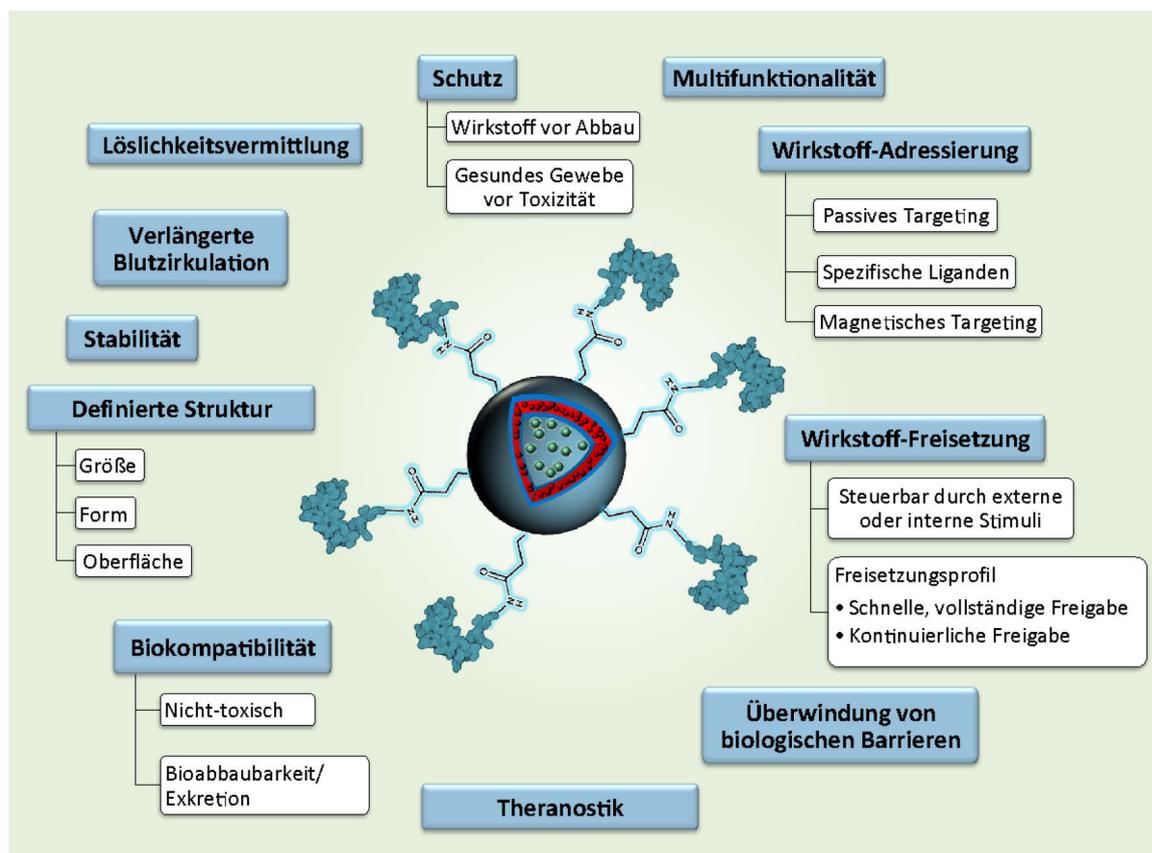


Abb. 1.4: Rationales Design eines Wirkstoffträgersystems

Multifunktionelle Nanopartikel für den Einsatz als Wirkstoffträger müssen aus bioverträglichem, nicht-toxischem, möglichst nicht-allergenem Material bestehen, das entweder vollständig bioabbaubar ist oder nach einem Teilabbau aus dem Körper ausgeschieden werden kann. Die Partikel sollten in Größe und Form möglichst einheitlich sein, um ihren Verbleib im Körper besser voraussagen und beeinflussen zu können. Zusätzlich sollten sie gegenüber Scherkräften im Blutstrom intakt bleiben und auch bei Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen und Proteinen ihre Dispersionsstabilität behalten. Außerdem sollte eine verlängerte Blutzirkulationszeit erreicht werden, welche eine Akkumulation der Partikel am Wirkort ermöglicht.

Die multifunktionalen Nanopartikel sollten schwer wasserlösliche Wirkstoffe transportieren und biologisch verfügbar machen, instabile Therapeutika wie beispielsweise siRNA oder Peptide vor frühzeitigem Abbau schützen und gleichzeitig Schutz für das gesunde Gewebe vor den hochtoxischen Wirkstoffen bieten, welche oftmals z.B. in der Krebstherapie eingesetzt werden. Molekulare Erkennung sollte eine Wirkstoffadressierung ermöglichen, die eine gezielte Zerstörung der erkrankten Zellen induziert, jedoch die gesunden Zellen weitgehend verschont und so unerwünschte Nebenwirkungen minimiert. Eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Wirkstoffen kann zudem wünschenswert sein, um durch die Ausnutzung synergetischer Effekte eine erhöhte Wirksamkeit zu erreichen. Die Wirkstofffreigabe sollte steuerbar sein und je nach Indikation kontinuierlich über eine längere Zeitperiode oder sehr schnell und vollständig erfolgen, sobald der Zielort erreicht ist. Das Wirkstoffträgersystem sollte zudem in der Lage sein, biologische Barrieren zu überwinden - wie die wichtigste Barriere, die Blut-Hirn-Schranke - um Krankheiten des zentralen Nervensystems oder Hirntumoren behandeln zu können. Schließlich sollte das multifunktionelle Trägersystem auch in Echtzeit verfolgbar sein, d.h. die genaue Position des Trägersystems innerhalb des Körpers soll durch erhöhten Kontrast bei bildgebenden Verfahren ermittelbar sein. Möglicherweise kann auf diese Weise direkt auch der Therapieverlauf verfolgt werden.

1.2.3 Die Rolle der Filtrationsorgane bei der Biodistribution

Es gibt unterschiedliche Wege, wie Nanopartikel in den Körper gelangen können - die Hauptwege sind durch die Haut (transdermal), durch Inhalation, oral oder intravenös. Die folgende Betrachtung wird auf die intravenöse Injektion beschränkt, welche in der Chemotherapie vorwiegend eingesetzt wird. Wie bereits erwähnt, ist eine ausreichende Blutzirkulationszeit wichtig, damit der Wirkstofftransporter in genügender Menge am Wirkort akkumulieren kann, bevor eine Eliminierung aus dem Blutstrom durch die phagozytierenden Zellen des *Retikuloendothelial-Systems* (RES) (auch MPS - *Mononukleäre Phagozytensystem* - genannt) erfolgt. Abgesehen von den phagozytierenden Zellen spielen auch verschiedene Organe eine entscheidende Rolle bei der Biodistribution (Abb. 1.5).

Nach der Injektion leitet der Blutstrom die Partikel über die Venen direkt zum Herzen. Von dort aus gelangt das Blut mit den darin befindlichen Substanzen zunächst in die pulmonale Zirkulation. Die Lungenkapillaren sind die kleinsten Blutgefäße im

menschlichen Körper mit Durchmessern zwischen 2 – 13 μm .⁶ Große Partikel im unteren Mikrometerbereich oder auch kleinere Nanopartikel, die im Blut aggregieren, können daher in den Lungenkapillaren stecken bleiben. Es gibt Ansätze, diesen Größenausschluss der Lunge zur passiven Wirkstoffadressierung auszunutzen. Dabei spielt die Gefahr schwerwiegender Nebenwirkungen (Lungenembolie) jedoch eine erhebliche Rolle.^{7, 8}

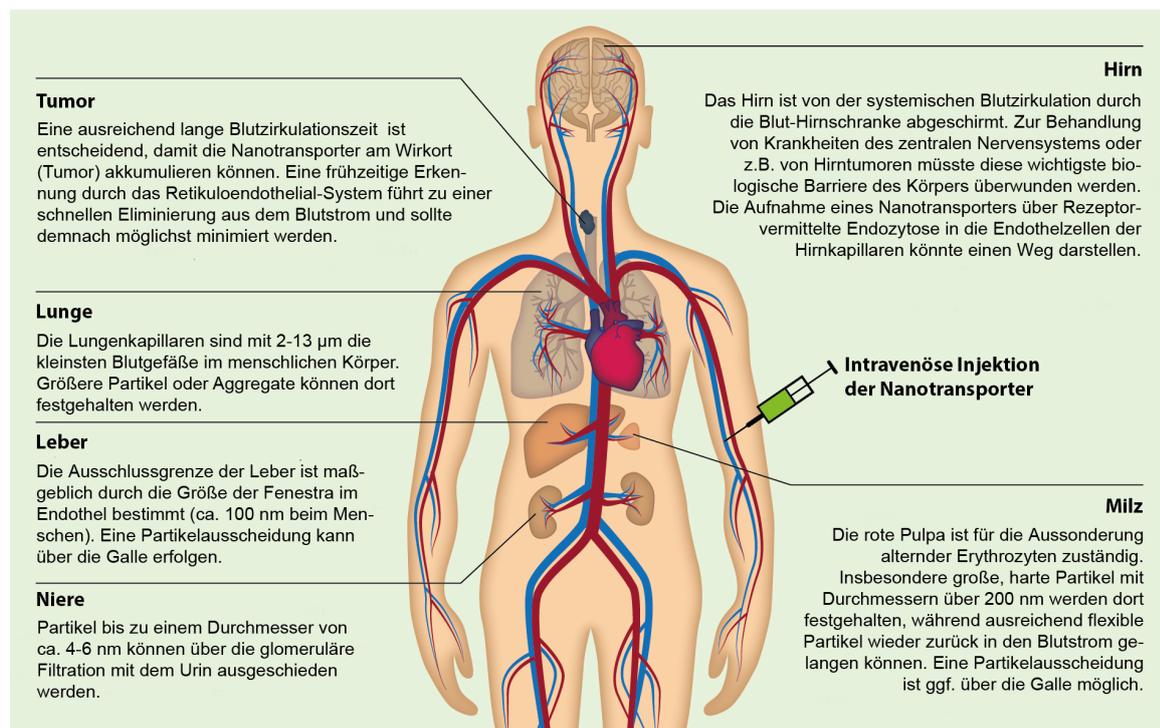


Abb. 1.5: Die Rolle verschiedener Organe bei der Biodistribution von nanopartikulären Wirkstoffträgern

Kleinere Partikel, welche die Lungenkapillaren passieren können, kehren in die linke Herzkammer zurück und gelangen in die systemische Zirkulation. In der Niere können Partikel, die im Durchmesser kleiner als 4 – 6 nm sind, ausgefiltert und über den Urin ausgeschieden werden. Die Ausschlussgrenze der Leber wird maßgeblich durch die Größe der Fenestra im Endothel bestimmt, die im Bereich von 100 bis 150 nm abhängig von der Spezies liegen.⁹ Eine Partikelausscheidung über die Galle wurde für Partikel im Größenbereich bis zu 70 nm bei Ratten beobachtet, wobei die Kinetik maßgeblich von der Oberflächenladung der Partikel abhängig war.^{10, 11} Die Milz gehört zum lymphatischen System und ist neben der Vermehrung von Lymphozyten (zu den weißen Blutkörperchen gehörend) unter anderem auch für den Abbau geschädigter Blutzellen

zuständig. Dort werden ebenfalls Antikörper-beladene Pathogene und jegliche Immunkomplexe phagozytiert und abgebaut. Auch Partikel mit einem Durchmesser größer als 200 nm landen meist früher oder später in der Milz und akkumulieren dort, sofern sie nicht abbaubar sind.¹² Genaue Vorhersagen über die Biodistribution bestimmter Partikel zu machen, ist äußerst schwierig, zumal diese nicht ausschließlich von der Partikelgröße abhängig ist und die meisten *In-Vivo*-Daten auf Rattenversuchen basieren, was die Übertragbarkeit auf den Menschen zusätzlich erschwert.

1.2.4 Wechselwirkung von Nanopartikeln mit Serumproteinen

Das Schicksal eines Nanopartikels wird neben der Primärgröße maßgeblich von der Interaktion des Partikels mit den Komponenten des Blutes bestimmt. Blut besteht aus Blutzellen und einer Lösung mit Proteinen und niedermolekularen Stoffen, dem Blutplasma. Die Blutzellen sind zum größten Teil rote Blutkörperchen (Erythrozyten) (45 – 55% des Blutvolumens), Blutplättchen (Thrombozyten) und weiße Blutkörperchen (Leukozyten) ergeben zusammen ca. 1 % des Volumens.

Erythrozyten und Thrombozyten sind nicht-phagozytierende Zellen. Leukozyten sind die Hauptakteure des Immunsystems und u.a. für die Abwehr und Vernichtung von Pathogenen verantwortlich.

Sobald ein Nanopartikel in den Blutkreislauf gelangt, erfolgt auf Grund der extrem hohen Proteinkonzentration (65 – 80 g/L im Serum) sofort eine Wechselwirkung der Proteine mit der Oberfläche der Partikel (Abb. 1.6).^{13, 14} Das komplette Plasma-Proteom wird auf ca. 3700 Proteine geschätzt.¹⁵ Für die Biodistribution oder, genauer, die Eliminierung von Nanopartikeln aus dem Blutkreislauf, spielen zwei unterschiedliche Proteingruppen eine Rolle, die sogenannten Opsonine und die Dysopsonine. Erstere dienen als „Marker“ für das RES, helfen Fremdkörper oder Pathogene zu erkennen und zu eliminieren. Letztere schützen die Partikel vor direkter Erkennung und Elimination durch das RES, wodurch die Zirkulationszeit verlängert wird.

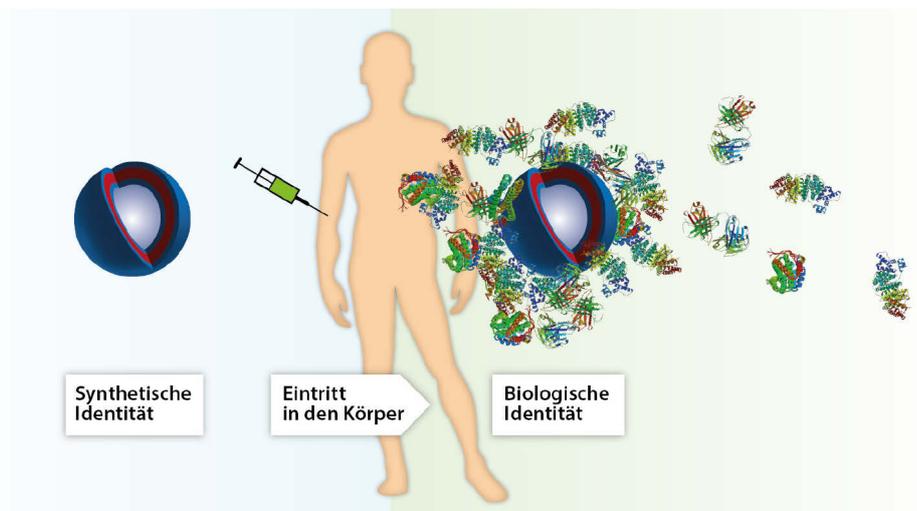


Abb. 1.6: Bio-Nano-Interaktion. Sobald ein Nanopartikel in die Blutbahn eintritt, wird er einer physiologischen Umgebung ausgesetzt, die unter anderem durch das Plasma-Proteom mit über 3700 Proteinen gestaltet wird. Nahezu augenblicklich bildet sich eine Protein-Korona um den Partikel aus. Die synthetische Identität mit ursprünglichen Charakteristika des Partikels wie Größe und Oberflächenbeschaffenheit und Ladung wandelt sich in eine biologische Identität. Dies ist ein dynamischer Prozess, bei welchem auch nachfolgend noch ein Austausch verschiedener Proteine erfolgen kann. Nicht ausschließlich die synthetische, sondern vielmehr die biologische Identität entscheidet letztendlich über das Schicksal eines Partikels im Körper. Sie hat Einfluss auf eine mögliche Immunantwort und die Biodistribution, genauso auf mögliche toxische Effekte, die beispielsweise durch Konformationsänderungen von adsorbierten Proteinen und dem damit verbundenen Aktivitätsverlust herrühren können.

Albumin

Das 67 kDa Protein Albumin stellt mit ca. 30 – 45 g/L den größten Anteil im Blutserum dar. Albumin gehört zu der Gruppe der Dysopsonine. Die Bindung von Albumin an Nanopartikel ist meist unspezifisch und wird durch ionische und hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt. Diese Proteinbedeckung hat zunächst einen schützenden Effekt, jedoch kann ein Austausch mit Proteinen stattfinden, die zwar eine geringere Plasmakonzentration, aber eine höhere Affinität zur Partikeloberfläche aufweisen, der sogenannte *Vroman-Effekt*. Physikalisch adsorbiertes Albumin an der Partikeloberfläche kann dennoch die Erkennung durch das RES verzögern und die Blut-Zirkulationszeit verlängern.¹⁶ Albumin selbst hat eine Halbwertszeit von ca. 19 – 22 Tagen im Plasma. Auf dem Markt befindet sich bereits ein Produkt, das Albumin gezielt zum Wirkstofftransport einsetzt. Es handelt sich dabei um Albumin-gebundenes Paclitaxel für die Behandlung von metastasiertem Brustkrebs, der Handelsname ist Abraxane®.¹⁷ Das Albumin ist in der Lage, Paclitaxel zu lösen, ohne dass ein weiteres Lösungsmittel erforderlich ist. Somit können hypersensitive allergische Reaktionen auf ein solches Lösungsmittel vermieden werden. Gleichzeitig wird der Albumin-vermittelte

Wirkstofftransport durch das Endothel des Blutgefäßes erleichtert. Zusätzlich wird die Tumor-Selektivität erhöht, welche auf der Albumin-Bindung an Osteonectin (engl. SPARC *Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine*) basiert. Osteonectin ist ein Glykoprotein, das häufig von Geweben mit erhöhtem Wachstum sezerniert wird und somit auch in der Region um Brusttumoren in erhöhter Konzentration präsent ist.

Lipoproteine

Lipoproteine sind Aggregate aus Lipiden und Proteinen, die zusammen mit anderen Komponenten wie Triacylglyceriden und Cholesterolester Mizellen-ähnliche Partikel bilden. Diese sind unter anderem für den Lipid-Transport im Blutstrom zuständig und weisen einen Durchmesser von 3,5 nm bis > 75 nm auf.¹⁸ Insbesondere mit hydrophoben Wirkstoffen und Partikeln können Lipoproteine interagieren. So kann es z.B. zu einer Destabilisierung von assemblierten Wirkstoffträgern (z.B. Liposomen) kommen, was eine verfrühte Freisetzung des Wirkstoffs zur Folge haben kann.¹⁹

Die Adsorption von Apolipoproteinen an die Nanopartikel-Oberfläche kann ebenfalls eine Verdrängung von Albumin oder anderen Proteinen auf der Partikeloberfläche induzieren. Die Nutzung von Apolipoproteinen als mögliche Targeting-Strategie, etwa durch *Ex-Vivo*-Dekorierung von Nanopartikeln, wurde bereits zur Wirkstoff-Addressierung an Hepatozyten (ApoE) und auch an das zentrale Nervensystem durch die Überwindung der Bluthirnschranke (Apo A-1, Apo B-100) untersucht.²⁰⁻²³

Proteine des Komplementsystems

Das Komplementsystem spielt eine Schlüsselrolle in der Immunantwort und agiert sowohl im Rahmen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Gelangt ein Fremdkörper oder Pathogen in den Blutkreislauf, so kommt es zur Komplementaktivierung, welche die Markierung, die sogenannte *Opsonierung* des Fremdkörpers, zur Folge hat. Oberflächengebundene Komplexe des Komplementsystems leiten eine Kettenreaktion zur Selbst-Amplifikation ein, die in der schnelleren Erkennung durch das RES resultiert und Phagozytose induziert. Gleichzeitig werden pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet, die eine systemische Reaktion des Immunsystems stimulieren.

Die Aktivierung des Komplementsystems durch Nanotransporter hängt von verschiedenen Faktoren ab. So werden Komplement-Proteine beispielsweise an stark geladene Partikel oder sehr hydrophobe Partikel mit unregelmäßigen, rauen Oberflächen verstärkt adsorbiert.^{11, 24, 25}

Flexible hydrophile Polymere können die Adhäsion von Proteinen verringern und damit die Komplementaktivierung hemmen, was in einer verlängerten Blutzirkulationszeit resultiert. Polyethylenglycol (PEG, auch PEO Polyethylenoxid) ist das bekannteste Beispiel eines solchen hydrophilen Polymers und gilt immer noch als Goldstandard, um Partikel vor der Opsonierung zu schützen.²⁶ Allerdings wurden auch pseudo-allergische Reaktionen auf PEGylierte Liposome in der klinischen Anwendung beobachtet, welche auf eine Komplementaktivierung durch PEG hinweisen.²⁷ Möglicherweise könnte gerade diese Komplementaktivierung für den Einsatz von PEGylierten Nanopartikeln im Impfbereich von Interesse sein. Beispielsweise wurde gezeigt, dass mit Hilfe hydrophiler Polymerketten auf der Nanopartikel-Oberfläche ein gezielter Transport zu den Lymphknoten erreicht werden konnte.²⁸

Auch Immunoglobuline, ebenfalls wichtige Bestandteile des Immunsystems, können mit Nanopartikeln im Blutkreislauf interagieren. Durch kooperative Effekte mit dem Komplement kann dies zu einer beschleunigten Eliminierung aus dem Blutkreislauf führen. Wie auch bei der Interaktion mit Lipoproteinen kann die Wechselwirkung von assemblierten Nanotransportern mit Immunoglobulinen zu einer Destabilisierung und verfrühten Freisetzung führen. Dies wurde z.B. bei Polymer-Mizellen aus PEG-poly(D,L-lactid), die mit hydrophoben Agenzien beladen waren, innerhalb weniger Minuten in der Blutzirkulation beobachtet.^{29, 30}

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der Betrachtung von Nanopartikeln in physiologischer Umgebung, z.B. im Blut, nicht nur das Nanopartikel selbst und seine Primäreigenschaften wie Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit die entscheidende Rolle spielen, sondern vielmehr das Nanopartikel mit seiner Proteinkorona als biologische Identität gesehen werden muss. Die Primäreigenschaften mögen zwar einen Einfluss auf die Immun-Antwort und die Biodistribution haben, insbesondere weil dies Faktoren sind, welche die Proteinadsorption beeinflussen, dennoch ist es eher das biologisch relevante Aggregat, welche das Nanopartikel in seiner Umgebung beschreibt und den größeren Einfluss auf das Schicksal des Partikels innerhalb des Körpers ausübt. Nanomedizinische als auch nanotoxische Effekte sind Antworten auf die biologisch

relevante Identität des Partikels und weniger auf die synthetische Identität der hergestellten Nanotransporter.

1.2.5 Nanotransporter in der klinischen Anwendung

Eines der Hauptprobleme bei dem Einsatz niedermolekularer Wirkstoffe ist, wie bereits erwähnt, das vergleichsweise große Verteilungsvolumen (engl. *Volume of Distribution* V_d). Der Wirkstoff wird also nicht spezifisch an den Wirkort transportiert, sondern diffus im ganzen Körper verteilt. Für die Krebstherapie beispielsweise bedeutet dies, dass die Medikamente in hohen Dosen eingesetzt werden müssen, um eine ausreichende Verfügbarkeit im Tumor zu erzielen. Dies führt zu schwerwiegenden und sehr belastenden Nebenwirkungen auch für das gesunde Körpergewebe. In besonderem Maße sind dabei Zellen mit hohen Zellteilungsraten wie z.B. die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes oder auch die Haarwurzelzellen betroffen.

Im Gegensatz zu kleinen Wirkstoffmolekülen können Nanotransporter von dem sogenannten *Enhanced Permeability and Retention Effect* (EPR-Effekt), erstmals von Maeda et al. beschrieben, profitieren (Abb. 1.7).³¹ Krebsgewebe unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von gesundem Gewebe. Die Blutgefäße des schnell wachsenden Tumors weisen im Vergleich zu intakten Blutgefäßen in gesunden Geweben deutlich größere Lücken (200 nm bis zu 1,2 μm , Tumor-abhängig) zwischen den Endothelzellen auf, was die Zugänglichkeit (*Permeability*) von Tumoren für Nanopartikel erhöht.³² Außerdem ist der Abtransport durch lymphatische Drainage im Tumorgewebe reduziert, was zu einer Akkumulation und verlängerten Verweildauer (*Retention*) des Wirkstoffträgers führt.

Der EPR-Effekt ist Grundlage für eine Verbesserung der Biodistribution durch eine Verringerung des Verteilungsvolumen (V_d) und wird oftmals auch als *passives Targeting* bezeichnet. Auch in Entzündungsherden wurde eine höhere Permeabilität der Blutgefäße beobachtet, weshalb die Anwendung von Nanotransportern nicht auf die Krebstherapie beschränkt ist, sondern auch für die Behandlung von Infektionen großes Potenzial hat.³³

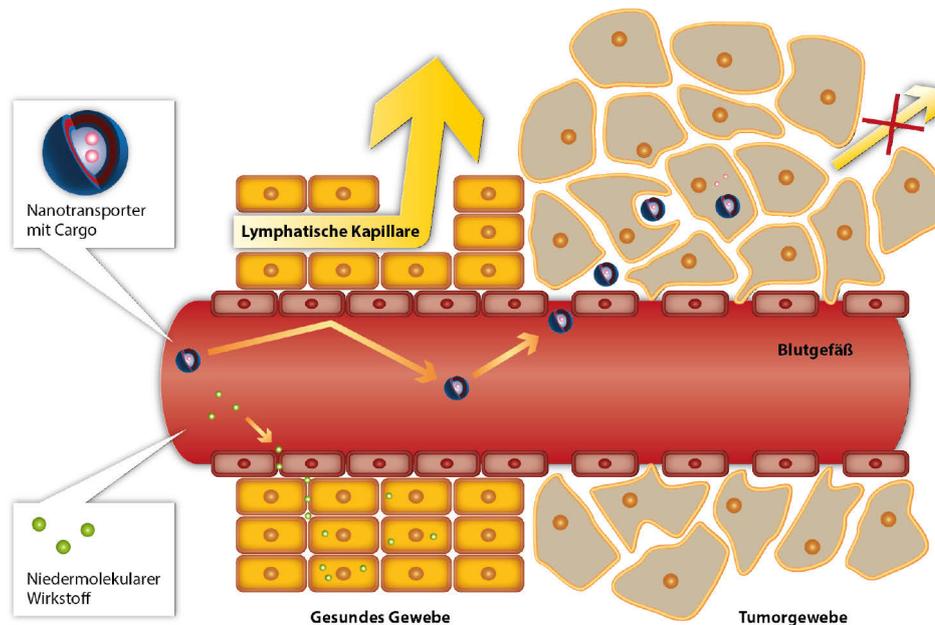


Abb. 1.7: Enhanced Permeability and Retention Effect. Nanotransporter können im Vergleich zu niedermolekularen Wirkstoffen nicht durch die intakte Endothelschicht eines Blutgefäßes im gesunden Gewebe diffundieren. Die erhöhte Permeabilität der Blutgefäße im Tumorgewebe kann eine Extravasation der Nanotransporter ermöglichen. Auf Grund der unwirksamen Lymphdrainage ist zudem der Abtransport gehemmt, was zu einer erhöhten Verweilzeit (Retention) der Nanotransporter im Tumorgewebe führt. (Nach Maeda et al. 2000)³¹

Neben dem passiven Targeting werden auch Targeting-Strategien unter Zuhilfenahme von spezifischen Liganden verfolgt: das sogenannte *aktive Targeting* (Abb. 1.8). Dabei soll der Umstand genutzt werden, dass Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen bestimmte Marker vermehrt auf ihrer Oberfläche tragen. Oft stehen diese ebenfalls mit der erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen im Zusammenhang. Herceptin® beispielsweise ist ein Antikörper-basiertes Medikament, das in der Behandlung von metastasiertem Brustkrebs eingesetzt wird. Die Wirkung beruht auf der spezifischen Bindung dieses Antikörpers (Trastuzumab) an den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2, der in etwa 20 % aller invasiven Mammakarzinome stark überexprimiert ist. Die Bindung des Antikörpers an HER 2 blockiert diese Rezeptoren und hemmt somit das Wachstum der Krebszellen.²⁶

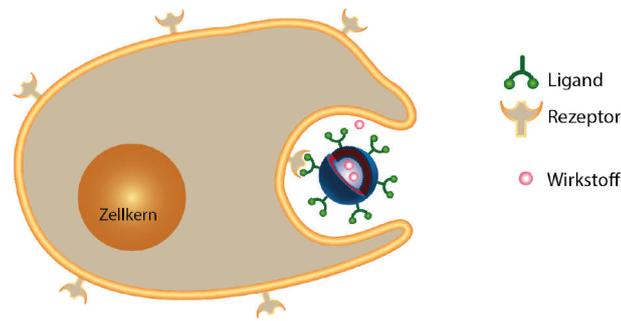


Abb. 1.8: Aktives Targeting zur Adressierung von Wirkstoffträgern. Spezifische Liganden des Wirkstofftransporters binden an Oberflächenmarker auf erkrankten Zellen (z.B. Tumorzellen). Dadurch wird zum einen eine Akkumulation des Wirkstoffträgers im Bereich des Tumors erzielt und zum anderen kann eine Rezeptor-vermittelte Endozytose zur Aufnahme der Transporter in die erkrankten Zellen führen.

Bei der Adressierung eines Wirkstoffträgersystems soll diese aktive Targeting-Strategie, also die spezifische Bindung an erkrankte Zellen, genutzt werden, um den Wirkstoff zum einen in der Tumoregion anzusammeln und des Weiteren eine spezifische Aufnahme des Wirkstoffs in die Zelle zu induzieren. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen die Targeting-Liganden an der Oberfläche des Nanotransporters möglichst kovalent angebunden werden und auch nach Kontakt mit Blutserum bindungsaktiv und zugänglich bleiben. Die Kombination aus passivem und aktivem Targeting verspricht die höchste Erfolgsquote, jedoch wird auch die Herstellung der multifunktionalen Partikel komplizierter und teurer. Reduzierte Toxizität, also verminderte Nebenwirkungen, gepaart mit verbesserter Wirksamkeit, vergrößern das therapeutische Fenster und sind die Haupttriebkraft für die Entwicklungen in der Nanomedizin.

Bisher sind bereits ein Dutzend nanopartikulärer Wirkstoffträgersysteme auf dem Markt.³⁴ Diese sind größtenteils Liposom-basierte Systeme (acht Präparate). Polymere Mizellen, Protein-Nanopartikel und Polymer-Wirkstoff-Konjugate repräsentieren die restlichen vier Marktprodukte. Im Folgenden soll kurz auf die verschiedenen Konzepte und Produkte eingegangen werden. Eine Zusammenfassung der Produkte und Anwendungsgebiete ist in Tab. 1.1 gegeben.

Liposome

Liposome als vesikuläre Strukturen, bestehend aus einer Doppelschicht von Phospholipiden und einem inneren wässrigen Kompartiment, wurden bereits 1965 in der Literatur beschrieben.³⁵ Die Lipid-Membran von Liposomen kann zum Lösen und Transport von hydrophobem Cargo genutzt werden und gleichzeitig bietet das innere Lumen des Vesikels Raum, um hydrophile Komponenten von der Umgebung geschützt einzuschließen (Abb. 1.9).

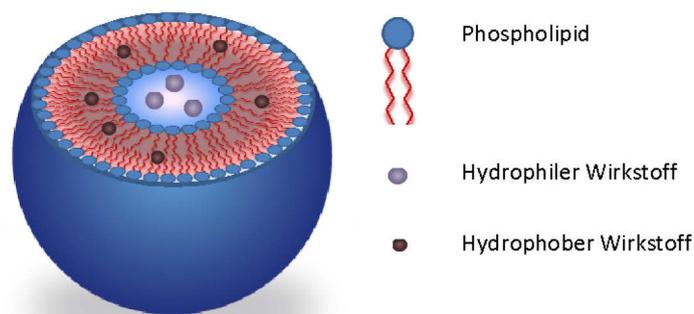


Abb. 1.9: Liposom. Im inneren wässrigen Kompartiment können hydrophile Substanzen verkapselt werden. Die hydrophobe Membran ermöglicht zusätzlich den Transport von wasserunlöslichen Wirkstoff-Komponenten.

Doxil® ist die älteste liposomale Arznei-Formulierung, die mit der Zulassung durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) 1995 Marktreife erzielte.³⁶ Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes Stealth-Liposom, welches auf der Oberfläche Polymerketten aus Polyethylenglycol (PEG) trägt, um eine verlängerte Blutzirkulation zu gewährleisten. Der innere wässrige Kern beinhaltet das Chemotherapeutikum Doxorubicin, dessen zytostatische Wirkung auf DNA-Interkalation und eine damit verbundene Hemmung des Enzyms Topoisomerase II basiert. Derzeit kann Doxil® neben der Behandlung des Karposi-Sarkom, der ersten zugelassenen Indikation, auch bei Eierstock- und metastasierendem Brustkrebs eingesetzt werden.³⁷

Ähnliche Präparate mit Zytostatika und nicht-pegylierten Liposomen sind Myocet® (liposomales Doxorubicin), DaunoXome® (liposomales Daunorubicin) und DepoCyt® (liposomales Cytarabin), welche ebenfalls bei bestimmten Indikationen für den Einsatz in der Krebstherapie zugelassen sind.

Liposome werden auch zur Behandlung mit starken Schmerzmitteln (DepoDur®, liposomales Morphin) oder, beladen mit Antimykotikum (Amphotericin B), zur Bekämpfung von Pilzinfektionen eingesetzt (AmBisome®, Abelcet®). Des Weiteren gibt es ein liposomales Medikament, das im Einsatz gegen altersbedingte Makuladegeneration (AMD), eine Erkrankung der Netzhaut, Anwendung findet (Visudyne®).

Den Ansatz der liposomalen Kombinations-Krebstherapie mit mehreren Wirkstoffen zum Erreichen synergistischer Effekte verfolgt beispielweise das US Unternehmen *Celator Pharmaceuticals*. Die beiden Kombinationspräparate CPX-1 (Irinotecan/Floxuridin) und CPX-351 (Cytarabine/Daunorubicin) befinden sich derzeit in Phase II der klinischen Entwicklung.^{38, 39}

Ergänzend zu den klassischen Zytostatika der Chemotherapie wird immer mehr auch an siRNA-basierten Therapiestrategien geforscht. Die siRNA soll nach Aufnahme in die Tumorzellen durch spezifische Wechselwirkung mit der mRNA (messenger RNA) des Zielgens die Proteinbiosynthese von tumorspezifischen Überlebensfaktoren verhindern und so die Apoptose der Krebszelle induzieren. Drei Produkte mit liposomaler siRNA (ALN-VSP02, Atu027 und TKM-PLK1) der Unternehmen *Alnylam Pharmaceuticals*, *Silence Therapeutics AG* und *Tekmira Pharmaceuticals* befinden sich bereits in der Klinischen Phase I.^{40, 41}

Polymermizelle

Polymere Mizellen bestehen aus amphiphilen Blockcopolymeren, die sich bei ausreichender Konzentration in wässriger Umgebung zu sphärischen Partikeln selbstorganisiert haben (Abb. 1.10). Im Gegensatz zu Liposomen wird hier der innere Kern von den hydrophoben Polymerblöcken gebildet und kann zur Einlagerung und zum Transport schwer wasserlöslicher Substanzen dienen. Polymermizellen sind für gewöhnlich groß genug, um einer sofortigen Elimination durch die Niere zu entgehen und gleichzeitig klein genug, um vom EPR-Effekt in Tumor- oder Entzündungsgebieten zu profitieren. Außerdem scheint die vergleichsweise kleine Größe der Polymermizellen eine Zellaufnahme über alternative Wege zu ermöglichen, die den „*drug efflux mechanism*“ umgeht und so auch multi-drug-resistente Zellen für Therapeutika zugänglich macht.⁴²

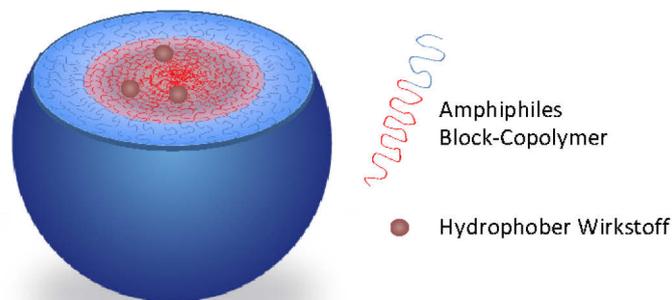


Abb. 1.10: Polymere Mizelle mit hydrophobem Cargo

Als hydrophiler Block wird zumeist Polyethylenglycol (PEG) verwendet, welches auf Grund der guten Wasserlöslichkeit, der Vermeidung von starken Protein-Wechselwirkungen und der relativen Bioverträglichkeit sehr beliebt ist. Für den hydrophoben Anteil des amphiphilen Polymers werden häufig hydrophobe Poly-Aminosäuren gewählt. Diese sind bioabbaubar und bieten damit die Möglichkeit einer pH-geschalteten Wirkstofffreisetzung am Zielort.

Das erste Präparat basierend auf polymeren Mizellen zur Krebsbehandlung wurde 2007 in Korea zugelassen. Es handelt sich dabei um Genexol-PM®, Mizellen aus PEG-polyactid-Blockcopolymeren, welche das schwer wasserlösliche Paclitaxel in ihrem inneren Kern als Cargo tragen. Diese Polymermizellen sollen bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit besser als die bisherige Cremophor EL®-basierende Formulierung (Genexol®) sein, die (wie oftmals beschrieben) hypersensitive Reaktionen des Immunsystems auslösen kann.^{43, 44}

Die Gruppe um Professor Kataoka an der Universität Tokio in Japan ist seit vielen Jahren sehr aktiv an der Entwicklung stimuli-responsiver Polymermizellen beteiligt, die eine noch gezieltere Therapie durch schaltbare Wirkstofffreisetzung zum Ziel hat.⁴⁵

Beispielsweise wurden verschiedene Paclitaxel-beladene Polymermizellen basierend auf Methoxy-PEG-polyaspartat entwickelt, die sich z.T. schon in der Klinischen Phase III befinden.⁴⁶

Ein weiteres vielversprechendes Konzept basierend auf Triblockcopolymeren Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid (PEO-PPO-PEO) wurde von *Supratek Pharma Inc.* bereits in die Klinische Phase II gebracht. PEO-PPO-PEO-

Polymere wurden in der Literatur mehrfach mit der Überwindung von Multi-Drug-Resistenzen in Verbindung gebracht.^{42, 47, 48} Die PEO-PPO-PEO-Formulierung des Chemotherapeutikums Doxorubicin soll daher insbesondere für chemo-resistente metastasierende Tumoren eingesetzt werden.^{49, 50}

Polymer-Wirkstoff-Konjugate

Zukunftsweisende Arbeiten in dem Bereich polymerbasierter Therapeutika reichen bis in die 1970er Jahre zurück.⁵¹ Helmut Ringsdorf gilt als einer der wichtigsten Pioniere dieser Zeit, der zur Entwicklung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten entscheidend beitrug.⁵²⁻⁵⁴ In dieser Kategorie seien zunächst zwei auf dem Markt befindliche Produkte von *Sigma-Tau Pharmaceuticals* erwähnt. Oncaspar® und Adagen® sind Enzym-basierte Therapeutika.⁵⁵ Die Konjugation der Enzyme an mehrere Polymerketten aus Monomethoxy-Polyethylenglykol resultiert in einer schützenden Polymerhülle um das aktive Protein. Dies führt zum einen zu einer verlängerten Wirkdauer des Proteins, da es vor Abbau und Eliminierung geschützt ist, und zum anderen zur Vermeidung oder Verringerung hypersensitiver Reaktionen im Vergleich zu den nicht-pegylierten Proteinen, die auf Grund ihres bakteriellen bzw. bovinen Ursprungs allergenes Potenzial haben.

Das letzte Beispiel ist das bereits beschriebene Präparat Abraxane®. Hier wurde der niedermolekulare Wirkstoff Paclitaxel an das Protein bzw. Biopolymer Albumin gebunden. In diesem Fall wird somit das Albumin als Trägersystem zum Transport des hydrophoben niedermolekularen Zytostatikums eingesetzt.¹⁷

Tab. 1.1: Nanopartikuläre Wirkstoffpräparate auf dem pharmazeutischen Markt.³⁴

Produkt	Trägersystem	Wirkstoff	Anwendungsgebiet	Hersteller
Doxil®	Pegyliertes Liposom	Doxorubicin	Kaposi-Sarkom, metastasierter Brust- und Eierstockkrebs	Janssen Pharmaceuticals
Myocet®	Liposom	Doxorubicin	metastasierter Brustkrebs	Cephalon Inc.(EU), Sopherion Therapeutics (US, CAN)
DaunoXome®	Liposom	Daunorubicin	HIV-assoziiertes Kaposi-Sarkom	Galen Ltd.
DepoCyt®	Liposom	Cytarabin	Lymphomatöse Meningitis	Sigma-Tau Pharmaceuticals
DepoDur®	Liposom	Morphin	Schmerzbehandlung	Pacira Pharmaceuticals
AmBisome®	Liposom	Amphotericin B	Pilzinfektionen	Astellas Pharma, Gilead Science
Abelcet®	Lipid Komplex	Amphotericin B	Pilzinfektionen	Sigma-Tau Pharmaceuticals
Visudyne®	Liposom	Verteporfin	altersbedingte Makuladegeneration (AMD)	Norvartis AG, QLT Inc. (US)
Genexol PM®	Polymermizelle	Paclitaxel	Brustkrebs und nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC)	Samyang Pharmaceuticals (Südkorea und andere asiatische Staaten)
Adagen®	Polymer-Enzym-Konjugat	Adenosin Deaminase	Kaposi-Sarkom, metastasierter Brust- und Eierstockkrebs	Sigma-Tau Pharmaceuticals
Oncaspar®	Polymer-Enzym-Konjugat	Asparaginase	metastasierter Brustkrebs	Sigma-Tau Pharmaceuticals
Abraxane®	Albumin-Nanopartikel	Paclitaxel	HIV-assoziiertes Kaposi-Sarkom	Calgene Corp. (US, EU)

Stand 2012

Neben Wirkstoffkonjugaten mit linearen Polymerketten wird auch intensiv an der Entwicklung von sogenannten *Dendrimeren* für den Einsatz im biomedizinischen Bereich gearbeitet.⁵⁶ Diese sind hochverzweigte Polymere mit globulärer Architektur. Sie zeichnen sich besonders durch ihre klar definierte Struktur und Monodispersität aus.

Unter dem Namen DEP™-Docetaxel ist kürzlich ein Dendrimer-basiertes chemotherapeutisches Produkt von *Starpharma* in die Klinische Phase I gegangen.⁵⁷ Die Studie wird zunächst in Australien mit ca. 30 Patienten, die an soliden Tumoren leiden, durchgeführt und soll künftig auf weitere Studienorte ausgeweitet werden.

Eine weitere Klasse von Wirkstofftransportern stellen Nanopartikel-Formulierung dar, welche sich im Gegensatz zu Liposomen und Polymermizellen nicht selbstorganisieren, sondern in einem Verfahrensprozess hergestellt werden.

Für feste Lipidnanopartikel, sogenannte SLN™ (*Solid lipid nanoparticles*), wurde 1996 ein europäisches Patent erteilt.⁵⁸ Diese werden durch Hochdruckhomogenisation von in Wasser dispergierten Lipiden hergestellt und mit Hilfe von Tensiden oder Polymeren gegen Aggregation stabilisiert.⁵⁹ Lipidnanopartikel werden bereits in einigen kosmetischen Produkten (als Nanopearls®) eingesetzt und wurden auch für verschiedene Anwendungen als Wirkstoffträgersysteme weiterentwickelt.⁶⁰⁻⁶² Derzeit befindet sich jedoch noch kein injizierbares Lipidnanopartikel-basiertes Produkt auf dem Markt.

Livitag® von *BioAlliance Pharma S.A.* ist eine auf Poly(isohexylcyanoacrylat)-Nanopartikel basierte Formulierung des Krebsmittels Doxorubicin. Diese Nanotransporter wurden insbesondere für die Behandlung von chemoresistenten Lebertumoren entwickelt und befinden sich bereits in der klinischen Phase III.⁶³

Als letztes Beispiel sei die nanopartikuläre Camptothecin-Formulierung von *Cerulean Pharma Inc.* erwähnt. Hierbei handelt es sich um ein Konjugat aus β -Cyclodextrin-PEO-Copolymer und dem Zytostatikum Camptothecin, welches nachfolgend in Nanopartikel mit Durchmessern zwischen 20 und 50 nm überführt wird.⁶⁴ Zurzeit läuft eine Klinische Studie Phase II mit Patienten, die an nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (engl.: *Non-Small Cell Lung Cancer* (NSCLC)) im fortgeschrittenen Stadium leiden.

Nanotransporter mit Targeting-Liganden

Nanopartikelartige Wirkstoffträgersysteme, die ergänzend zu dem passiven Targeting basierend auf dem EPR-Effekt auch die aktive Zelladressierung mittels spezifischen Targeting-Liganden ausnutzen, befinden sich derzeit noch in den klinischen Phasen I und II.

BIND-014 beispielsweise ist ein Nanocarrier basierend auf PEG-polylactid mit eingelagertem Docetaxel. Ein bestimmter Anteil des Blockcopolymers PEG-PLA ist mit ACUPA (S,S-2-[3-[5-amino-1-carboxypentyl]-ureido]-Pentandisäure), einem targeting-Liganden, welcher an das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) bindet, funktionalisiert. PSMA ist oftmals auf Prostata-Krebszellen überexprimiert und gilt daher als vielversprechender Adressat für die spezifische Krebstherapie. Zurzeit befindet sich BIND-014, das von *Bind Biosciences Inc.* entwickelt wird, in der klinischen Phase I.⁶⁵

Ein Liposom-basiertes Präparat von *Mebiopharm Co., Ltd.*, das mit Transferrin-Liganden auf der Oberfläche bestückt ist, befindet sich bereits in der klinischen Phase II.⁶⁶ Im inneren wässrigen Kompartiment dieser funktionalisierten Liposomen ist Oxaliplatin eingeschlossen, bei welchem es sich ebenfalls um ein toxisches Chemotherapeutikum handelt.

Auch wenn die Kombination aus passivem (auf dem EPR-basierenden) und aktivem (mit spezifischen Bindungsliganden) Targeting großes Potenzial gerade in der Krebstherapie bietet, ist es dennoch verständlich, dass es bisher noch kein solches Präparat auf den Markt geschafft hat.

Die spezifische Wirkort-Adressierung durch Funktionalisierung der Nanotransporter-Oberfläche mit spezifischen Liganden bedeutet eine kompliziertere Herstellung, also einen deutlich erhöhten Produktionsaufwand. Dadurch werden die Präparate nicht nur in der Produktion teurer, sondern müssen auch erweiterten Anforderungen bezüglich der Zulassungsregulatorien genügen.

Solange die Verbesserung der Wirksamkeit eines aktiv gesteuerten Nanotransporters gegenüber dem einfacheren, nur von dem EPR-Effekt profitierenden Wirkstoffträger nicht den erhöhten Aufwand in Herstellungs- und Zulassungsverfahren aufwiegt, werden wohl weiterhin die auf passives Targeting basierenden Systeme den Markt anführen.

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen selbstorganisierte nanoskalige Polymerstrukturen, basierend auf amphiphilen Blockcopolymeren, im Hinblick auf die Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen hergestellt und untersucht werden. Dazu sollen zunächst grundlegende Experimente mit Hilfe des Modellpolymers Polyethylenoxid-*block*-Polybutadien durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich um ein nicht-bioabbaubares Polymer, das als hydrophilen Block das oft verwendete und gut untersuchte Polyethylenoxid aufweist und daher ein gutes Modell darstellt. Der hydrophobe Block aus Polybutadien ermöglicht eine dauerhafte Fixierung der Polymerstrukturen durch eine Gammastrahlen-induzierte Vernetzung der Polymerketten und erleichtert dadurch die Analytik der organisierten supramolekularen Strukturen.

Sowohl Größe und Form als auch Oberflächenfunktionalisierung sollen auf ihre Einflüsse und Wechselwirkungen mit menschlichen Zellen untersucht werden. Zudem sollen die polymeren Nanopartikel in Anwesenheit von Serumproteinen charakterisiert werden, um Aufschluss über ihr Verhalten im Körper zu erhalten. Neben grundlegender Forschung auf Basis des Modellsystems steht die Entwicklung eines potenziellen theranostischen Wirkstoffträgersystems im Vordergrund dieser Arbeit. Dabei soll neben der Beladung der Polymerstrukturen mit Wirkstoff auch die Inkorporation magnetischer Nanopartikel realisiert werden. Letztere sollen den Nanotransporter mit einer zusätzlichen Funktion als Kontrastmittel für bildgebende Verfahren ausstatten. Neben Untersuchungen zum Wirkstofffreisetzungverhalten soll schließlich eine Oberflächenfunktionalisierung mit einem spezifischen Liganden durchgeführt werden, um eine aktive Targeting-Strategie evaluieren zu können.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Amphiphile Blockcopolymere

Blockcopolymere sind Makromoleküle, die aus mindestens zwei kovalent verknüpften Homopolymersegmenten verschiedener Monomere bestehen. Man unterscheidet je nach Anzahl der zumeist linear verknüpften Blöcke Di-, Tri- oder Multiblockcopolymere. Unterschiedliche Eigenschaften der Polymersegmente können Blockcopolymeren amphiphilen (griech.: amphi = beide; philos = Freund) Charakter geben, sie können damit also gleichzeitig hydrophiles (wasserlösliches) und hydrophobes (wasserabweisendes) Verhalten zeigen. Auf Grund der Amphiphilie dieser Blockcopolymere kann es zu einer sogenannten *Mikrophasenentmischung* kommen. Die Blockcopolymere können sich daher sowohl im Bulk (Polymerschmelze) als auch in Anwesenheit eines selektiven Lösungsmittels für nur einen Block in verschiedene Morphologien anordnen. Diese Eigenschaft bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten als Stabilisator oder Lösungsvermittler an Öl-Wasser- und anderen Grenzflächen.

Die spezifischen Eigenschaften der Blockcopolymere lassen sich u. a. durch die Wahl der Monomere sowie der Länge der Blöcke gezielt beeinflussen. Blockcopolymere können entweder über eine nachträgliche Verknüpfung zweier Homopolymersegmente oder durch sequenzielle Polymerisation verschiedener Monomere hergestellt werden. Letztere kann mittels kontrollierter bzw. lebender Polymerisation wie anionischer, kationischer, radikalischer oder koordinativer Polymerisation durchgeführt werden.⁶⁷⁻⁷²

2.2 Selbstorganisation von Amphiphilen

„Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile“ Aristoteles (384 v.Chr. – 322 v.Chr.)

In der Biologie spielen organisierte supramolekulare Strukturen wichtige Schlüsselrollen. Die Zellmembran beispielsweise ist aus Phospholipiden aufgebaut und hat zusammen mit anderen Komponenten wie Cholesterol, Tunnelproteinen, Glycolipiden und Glycoproteinen als selbstorganisiertes Gesamtkonstrukt wichtige Aufgaben wie die Kontrolle über Transportprozesse in und aus der Zelle.

Phospholipide besitzen eine negativ geladene Phosphatgruppe als hydrophile Kopfgruppe, die über eine Glycerid-Gruppe mit zwei Fettsäureketten als hydrophobe Schwanzgruppe verknüpft sind. Sie zeigen somit amphiphiles Verhalten und können sich in wässriger Umgebung zu Membranstrukturen selbstorganisieren.⁷³

Die Haupttriebkraft der Selbstorganisation ist das lyotrope Verhalten eines Amphiphils. Der Terminus *lyotropisch* hat griechische Wurzeln und setzt sich aus „lyo“ (= Lösungsmittel) und „trop“ (= induziert) zusammen. Wird ein Amphiphil von einem guten Lösungsmittel für beide Blöcke in ein selektives Lösungsmittel transferiert, in welchem nur eines der Polymersegmente gut löslich ist, wird die Formation von übergeordneten Strukturen induziert. Im Falle von Wasser als selektives Lösungsmittel ist dieses lyotrope Verhalten hauptsächlich auf den sogenannten *hydrophoben Effekt* zurückzuführen.^{74, 75} Dieser beschreibt, dass es durch Lösen eines apolaren Stoffes zu einer „erzwungenen“ Strukturierung der Wassermoleküle in unmittelbarer Umgebung kommt, was mit einem vergleichsweise hohen Entropieverlust einhergeht. Demnach ist die Selbstorganisation amphiphiler Moleküle neben der Vermeidung enthalpisch ungünstiger Wechselwirkungen des hydrophoben Blocks mit Wasser auch ein entropisch getriebener Prozess. Dies führt zu einer Assoziation der hydrophoben Blöcke, während die hydrophilen Segmente dem Wasser zugewandt sind und dieses vor dem direkten Kontakt mit dem hydrophoben Anteil abschirmen.

Abhängig von der Zusammensetzung eines Amphiphils, also dem Verhältnis und der Eigenschaften des hydrophilen und des hydrophoben Anteils, können Strukturen unterschiedlicher Morphologie aus der Selbstorganisation resultieren. Israelachvili et al. präsentierten 1976 ihre Theorie zur Selbstorganisation und führten das Konzept des kritischen Packungsparameters (P_c) ein, um die Bildung supramolekularer Strukturen aus Amphiphilen vorherzusagen.⁷⁶

Der kritische Packungsparameter ist definiert als $P_c = v/a_0l_c$, wobei v das Volumen des hydrophoben Anteils, a_0 die Fläche, die durch die hydrophile Kopfgruppe eingenommen wird und l_c die Konturlänge des Moleküls repräsentiert (Abb. 2.1). Der kritische Packungsparameter beschreibt damit die Form des Moleküls, welche mit der Krümmung an der hydrophob-hydrophilen Grenzfläche in Zusammenhang steht und somit eine Vorhersage der selbstorganisierten Struktur ermöglicht.⁷⁷ P_c -Werte unterhalb 0,5 resultieren in stark gekrümmten Aggregaten wie kugelförmigen und zylindrischen Mizellen, während mit wachsendem P_c bis $v/a_0l_c = 1$ Doppelschichten die favorisierte

Anordnung sind. Inverse Mizellen bilden sich, wenn der kritische Packungsparameter den Wert 1 übersteigt.

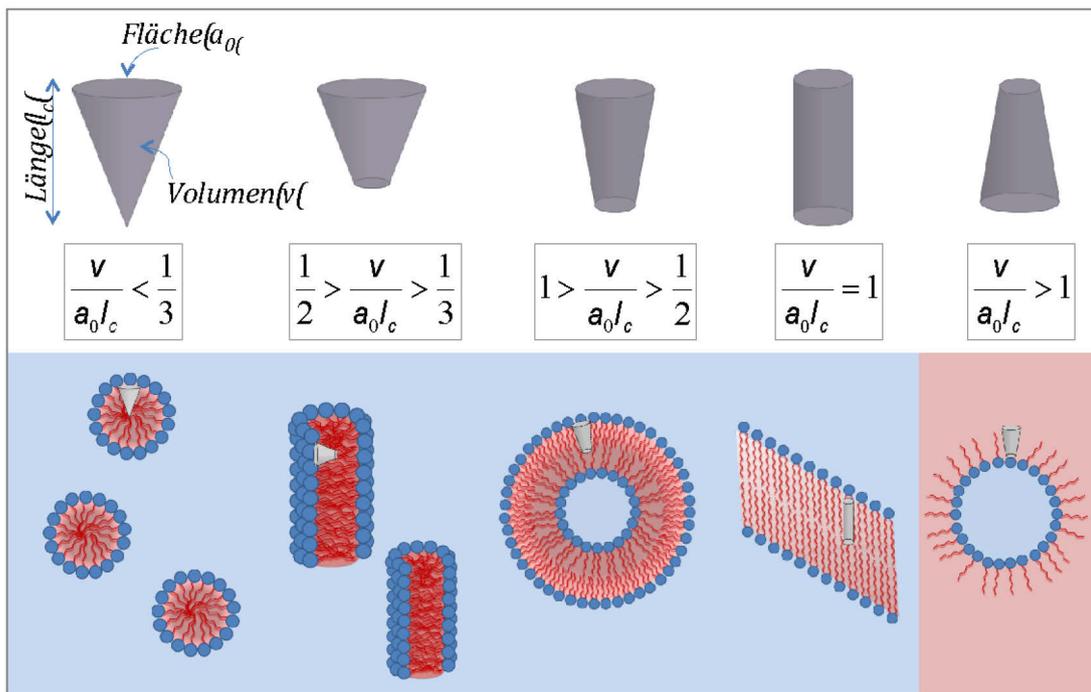


Abb. 2.1: Der kritische Packungsparameter P_c und die daraus hergeleitete Morphologie der selbstorganisierten Strukturen (nach Vorlage von Israelachvili et al. 1976)

Amphiphile Blockcopolymere können ähnliches Verhalten wie Phospholipide zeigen. Die entstehende Morphologie der übergeordneten Strukturen kann durch die Veränderung der Blocklängen beeinflusst werden. Die schrittweise Verringerung der Blocklänge des hydrophilen Blocks führt so zu einer Umwandlung von kugelförmigen über zylindrische Mizellen und schließlich zur Ausbildung von lamellaren Strukturen.^{78, 79}

Neben der rein geometrischen Betrachtung kann die Aggregation von Amphiphilen auch thermodynamisch beschrieben werden. Betrachtet man das Verhalten von Amphiphilen in der Polymerschmelze, resultiert die Mikrophasenseparation hauptsächlich aus Grenzflächeneffekten an der hydrophil-hydrophoben Grenzfläche und Entropieverlusten, welche durch die geordnete Struktur der Polymerketten innerhalb der Mikrodomänen bedingt sind.⁸⁰ In diesem Zusammenhang ist ein Diblockcopolymer AB durch den Polymerisationsgrad ($N = N_A + N_B$) und seine Komposition ($f_A = N_A/N$) charakterisiert. In der Polymerschmelze kann das Blockcopolymer als inkompressible Gauß-Kette beschrieben werden, wobei jedes Segment ein festgelegtes Volumen einnimmt. Die

Wechselwirkung zwischen den unterschiedlichen Segmenten kann mit Hilfe des *Flory-Huggins*-Interaktionsparameters χ ausgedrückt werden, wobei positive Werte für χ auf energetisch ungünstige Wechselwirkungen hindeuten. Das Produkt von χN wird *Segregationsparameter* genannt und bestimmt, wie stark die beiden Segmente A und B segregieren.⁸¹ Danach werden Bereiche schwacher Entmischung ($\chi N < 20$), das sogenannte WSL (*weak segregation limit*) und Bereiche starker Entmischung ($\chi N > 100$) SSL (*strong segregation limit*) unterschieden. Während im Bereich starker Segregation scharfe Grenzen zwischen den Mikrodomänen existieren, können im schwach segregierten Bereich auch bikontinuierliche Phasen wie der Gyroid gefunden werden (Abb. 2.2).

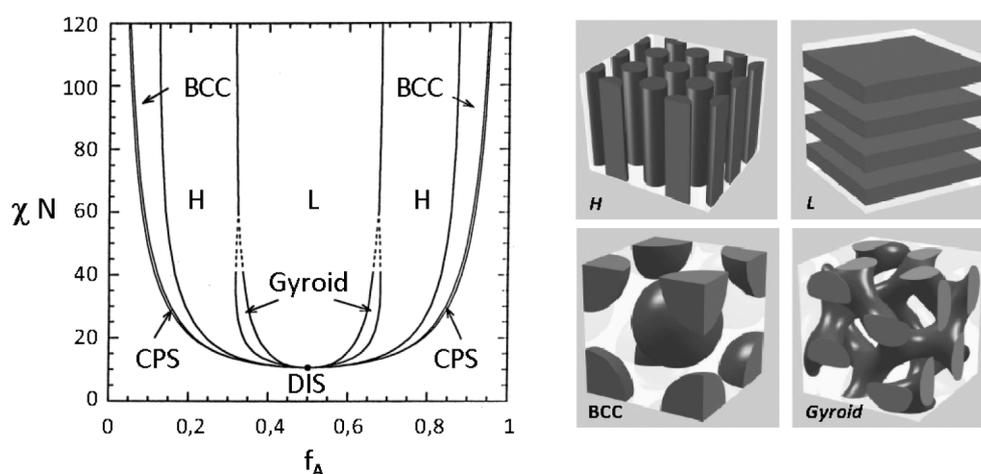


Abb. 2.2: Berechnetes Phasendiagramm für Blockcopolymere (links) und die schematische Darstellung verschiedener Mikrodomänen (rechts).^{82, 83} Die Abkürzungen bedeuten: L Lamellen, H hexagonale Zylinder, BCC kubisch innenzentrierte Kugelpackung (engl.: bicontinuous cubic), CPS kubisch dichteste Packung (close-packed spheres) und DIS ungeordnete Phase (engl.: disordered).

Für die Beschreibung der Mikrophasenseparation in Anwesenheit eines selektiven Lösungsmittels müssen weitere Parameter berücksichtigt werden. Diese beinhalten unter anderem die *Flory-Huggins*-Interaktionsparameter für den A-Block und B-Block mit dem Lösungsmittel sowie die relativen Volumenanteile aller Komponenten in der Mischung. Erfolgt die Selbstorganisation mit Hilfe eines Co-Lösungsmittels, müssten im Grunde zusätzlich alle *Flory-Huggins*-Interaktionsparameter für die verschiedenen Lösungsmittelgemische bestimmt werden. Zudem spielen weitere Kenngrößen wie beispielsweise die kritische Aggregationskonzentration für die Selbstorganisation im selektiven Lösungsmittel eine entscheidende Rolle.

In einem selektiven Lösungsmittel gebildete Lamellen tendieren ab einer bestimmten Größe zur Ausbildung von geschlossenen Vesikelstrukturen. Dieses Phänomen kann mit hohen Energieverlusten durch Grenzflächeneffekte erklärt werden. Die Linienenergie, die von der Linienspannung γ an den Rändern der Doppellage herrührt, ist dabei die treibende Kraft. Ihr entgegen wirkt die Biegeenergie, die von dem Biegemodul κ abhängt und aufgebracht werden muss, um die Vesikelformation zu ermöglichen. Die Vesikelbildung aus einer scheibenartigen Lamelle wird demnach gefördert, wenn die Linienenergie hoch und die Biegeenergie niedrig ist (Abb. 2.3).⁸⁴

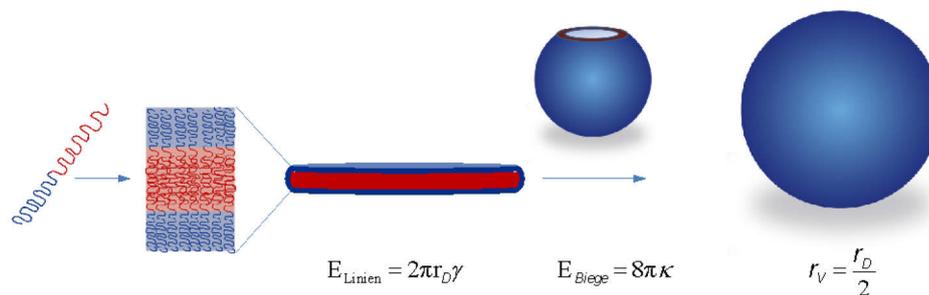


Abb. 2.3: Schematische Illustration der Vesikel-Formation durch Zusammenschluss einer Doppelschicht-Scheibe (adaptiert von Antonietti & Förster 2003)⁸⁰: Die Linienenergie einer Scheibe $E_{\text{Linien}} = 2\pi r_D \gamma$ (mit γ = Linienspannung) steht mit der Biegeenergie $E_{\text{Biege}} = 8\pi \kappa$ (mit κ = Biegemodul) bei der Vesikel-Bildung im Wechselspiel. Der Scheibenradius r_D für eine gegebene Fläche entspricht dabei dem doppelten Vesikelradius r_V . Damit ergibt sich für eine minimale Vesikelgröße $r_{V,\text{min}} = 2\kappa/\gamma$. Der Zusammenschluss zum Vesikel verläuft irreversibel, da durch das Verschwinden der Scheibenränder eine Stabilisierung erfolgt.

Aus dem Gegenspiel von Biege- und Linienenergie ergibt sich eine minimale Vesikelgröße mit $r_{V,\text{min}} = 2\kappa/\gamma$. Da nach Zusammenschluss eines Vesikels die Linienenergie nicht mehr von Bedeutung ist, resultiert die Gleichgewichtsgröße eines Vesikels nur aus dem Gleichgewicht aus Biegeenergie (in Richtung weniger großer Vesikel) und der Mischungsentropie (in Richtung vieler kleiner Vesikel).⁸⁰

Die geringe Löslichkeit von Lipiden und vielen Blockcopolymeren beschränkt oftmals den Austausch zwischen den assemblierten Strukturen, so dass Form und Größe weniger ein Ergebnis des Gleichgewichts sind, als vielmehr durch die Präparationsmethoden bestimmt werden. Auf diese Weise können sogenannte *Nicht-equilibrium*-Vesikel oder andere polymere Strukturen in einem thermodynamisch ungünstigen Zustand gefangen werden.

2.2.1 Kinetik der Selbstorganisation

Die Selbstorganisation von Amphiphilen ist ein extrem schneller Prozess und verläuft abhängig der Molekülgröße innerhalb weniger Millisekunden oder gar im Mikrosekundenbereich. Daher war es bisher kaum möglich, Zwischenzustände experimentell zu beobachten. Mit Hilfe neuester Computertechnik mit hohen Rechenleistungen und Simulationsmethoden wie beispielsweise der *Molekulardynamik* (MD) konnten auch Anfangsstadien von supramolekularen Strukturen simuliert werden. Auf Grund der enormen Komplexität, die aus interatomaren Kräften resultiert, ist die Methode der Molekularen Dynamik mit atomarer Auflösung beschränkt auf kleinere Ausschnitte von Aggregat- bzw. Membranstrukturen von einigen zehn Nanometern und die Simulationszeit ist auf wenige Mikrosekunden begrenzt. Zur Simulation von hydrodynamischen Phänomenen in Fluiden wurde vor fast 20 Jahren die Methode der *Dissipativen Partikel-Dynamik* (DPD, dissipative particle dynamics), eine sogenannte *coarsegrained* Technik, entwickelt.⁸⁵ Bei der DPD-Simulation werden Wassermoleküle und Monomereinheiten des Amphiphils durch Kugeln (Partikel) repräsentiert. Diesen Kugeln werden dann Eigenschaften zugewiesen, so dass sowohl Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Monomereinheiten als auch Interaktionen der unterschiedlichen Komponenten mit dem Lösungsmittel berücksichtigt werden können.

In einer Publikation von Shillcock et al. wurde die Vesikelbildung aus amphiphilen Molekülen mit Hilfe dieser Methode simuliert.⁸⁶ Dabei wurde ein typisches Amphiphil mit linearer Architektur H_3T_6 als Modell verwendet, welches durch drei hydrophile „Kopf“-Kugeln (H für *head*) und sechs hydrophobe „Schwanz“-Kugeln (T für *tail*) dargestellt wurde. Für alle Kugeln wurde der gleiche Radius angenommen, welcher die intermolekularen Kräfte repräsentiert. Wasser wurde durch einzelne Kugeln (W für *water*) repräsentiert. Nachdem molekulare Architektur, Konzentration und Feldstärke spezifiziert wurden, startete die Simulation, basierend auf der Integration der Newtonschen Bewegungsgesetze für die Bewegung aller Partikel. Die Simulationen wurden bei konstanter Temperatur (300 K) durchgeführt. Abb. 2.4 zeigt Schnappschüsse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Simulation.

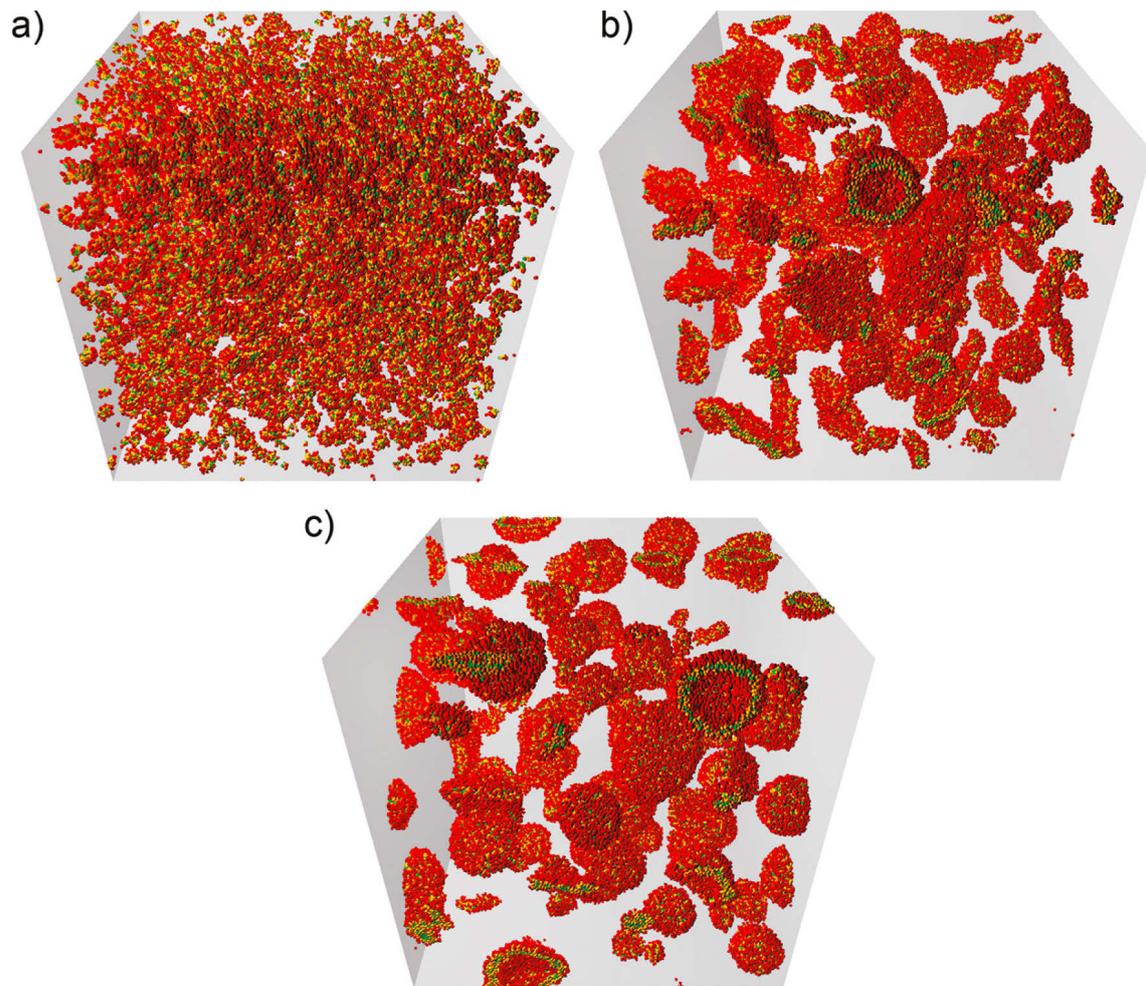


Abb. 2.4: DPD-Simulation: Spontane Vesikelselbstorganisation. Schnappschüsse zu verschiedenen Zeiten bei der Vesikel-Selbstorganisation aus einer Dispersion von anfänglich zufällig verteilten 58 240 amphiphilen Molekülen in 5 000 000 Wasserkugeln in einer (90 nm^3) Simulationsbox (80 mM Amphiphil-Konzentration). Amphiphile haben eine lineare Architektur H_3T_6 , wobei die hydrophilen Partikel H rot gefärbt sind und die hydrophoben Schwanzpartikel T orange dargestellt sind, das terminale Schwanzpartikel jedoch jeweils grün gekennzeichnet ist. Diese Momentaufnahmen zeigen drei Stufen des Wachstums. Zunächst formen die amphiphilen Moleküle kleine Mizellen, welche diffundieren, fusionieren und schließlich planare Doppelschichten bilden (a, $\sim 2 \mu\text{s}$). Im nächsten Schritt wachsen die Doppelschichten an und biegen sich schließlich in Vesikelstrukturen. Die Vesikelstrukturen wachsen weiter an, indem sie teilweise mit noch existierenden Doppelschichten oder miteinander fusionieren (b, $\sim 80 \mu\text{s}$). Zuletzt ist das System von geschlossenen Vesikeln dominiert, welche sich im Raum bewegen, aber nur gelegentlich weiter miteinander fusionieren, da dieser Prozess deutlich langsamer ist als die beobachtete Simulationsdauer (c, $\sim 162 \mu\text{s}$). Die Dauer der unterschiedlichen Phasen ist von der Amphiphil-Konzentration abhängig. Entnommen aus Shillcock⁸⁶, Copyright © 2012, American Chemical Society. Wiedergabe mit Genehmigung.

Wie die Beobachtungen aus Abb 2.4 zeigen, lässt sich der Prozess der Selbstorganisation nacheinander in drei Phasen beschreiben. In den drei Phasen dominieren unterschiedliche Aggregationsformen, welche ihrerseits unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen. Zuerst bilden sich sehr schnell Mizellen. Frühere Veröffentlichungen auf der Basis von atomaren Simulationen über molekulare Dynamiken ergaben Zeiten von

wenigen Nanosekunden für diesen Prozess.⁸⁷ Nachfolgend wachsen diese Mizellen an, welche sich schließlich zu quasi-planaren Doppelschichten organisieren. Die Dauer dieser Phase hängt davon ab, wie viel Zeit die Mizelle benötigt, um genügend Material anzusammeln, so dass sich ein Stück einer planaren Membran ausbilden kann. Die nächste Phase ist eine längere Periode, in der Mizellen wie auch planare Doppelschicht-Fragmente diffundieren und langsam zu größeren Doppelschichten fusionieren, bis es zur Schließung der Membranen in Vesikelstrukturen kommt. Diese Phase kann bei diesem Modell für kleine Amphiphile von 50 bis zu 400 μs andauern, abhängig von der Konzentration. Je höher die Konzentration, desto schneller können Vesikel gebildet werden. In den hier untersuchten Konzentrationsbereichen lagen Vesikel und planare Doppelschichten in fast allen Phasen nebeneinander vor. Die Vesikel schienen einwandig zu sein und bei geringerer Konzentrationen im Durchschnitt kleiner als bei höheren Konzentrationen.

Für eine potenzielle Beladung der Vesikelstrukturen (beispielsweise als Wirkstoffträger) ist offenbar die zweite Wachstumsphase, in der die scheibenförmigen Doppelschichten in ihrer Größe zunehmen, entscheidend, um eine möglichst große Menge des Cargo in dem entstehenden Vesikel einzukapseln.⁸⁸

2.3 Polymersome

Vesikuläre Strukturen aus Blockcopolymeren werden auch *Polymersome* genannt. Dieser Terminus wurde aus den Begriffen *Polymer* und *Liposom*, dem natürlichen Vorbild aus Phospholipiden, geschaffen. Die Forschergruppen um Meijer in den Niederlanden und Eisenberg in Kanada legten den Grundstein für die Entwicklung der polymeren Vesikel, wovon sie bereits 1995 berichteten.^{89, 90} Vier Jahre später wurden von Discher et al. erstmals vergleichende Experimente zwischen Liposomen und Polymersomen bezüglich ihrer Membraneigenschaften veröffentlicht.⁹¹

2.3.1 Herstellungsmethoden für Polymersome

Die Herstellungsmethoden für Polymersome sind weitestgehend von Techniken zur Liposom-Herstellung abgeleitet.

Bei der **Filmrehydration** wird zunächst ein sehr dünner Polymerfilm auf eine Oberfläche aufgebracht. Dazu wird eine kleine Menge Polymer (gelöst in einem guten Lösungsmittel

für beide Blöcke) z.B. in einen Rundkolben gegeben und das Lösungsmittel vollständig abgedampft. Im nächsten Schritt wird das Polymer durch Zugabe von Wasser oder wässriger Pufferlösung wieder von der Oberfläche gelöst. Dies kann durch Energiezufuhr erleichtert werden wie beispielsweise durch Rühren, Schütteln oder Ultraschall. Auf diese Weise können uni- und multilamellare Vesikel hergestellt werden, die zumeist eine relativ breite Größenverteilung aufweisen.^{73, 92} Mittels Membran-Extrusion durch eine Polycarbonat-Membran mit definierten Porengrößen können die Vesikel nachträglich in ihrer Größe reduziert und vereinheitlicht werden. Allerdings ist dieser Verfahrensschritt extrem zeitaufwändig, auf kleine Probenmengen (gewöhnlich wenige mL) beschränkt und resultiert zudem in Materialverlust durch Adsorption an der Extrusionsmembran.

Abhängig von den Blocklängen lassen sich manche amphiphile Polymere auch direkt vom Bulkmaterial in die wässrige Umgebung lösen, jedoch ist hierfür ein deutlich höherer Energieeintrag notwendig, um eine vollständige Rehydratation zu erreichen.

Zur Herstellung sehr großer (im Mikrometer-Bereich), relativ einheitlicher unilamellarer Vesikel (engl.: *GUV giant unilamellar vesicles*) eignet sich z.B. die Methode der **Elektroformation**. Dabei wird ein dünner Polymerfilm auf ein Elektrodenpaar aufgebracht. Die Rehydratation in Wasser wird durch ein oszillierendes elektrisches Feld induziert.

Polymersome können auch mit der **Detergenz-Methode** hergestellt werden, bei der das Polymer mit Hilfe eines Detergenz in Wasser dispergiert wird. Nachfolgend wird das Detergenz durch Dialyse wieder entfernt.⁹³

Bei der **Nanopräzipitation** (auch Co-Lösungsmittelmethode genannt) wird das amphiphile Polymer in einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel gelöst und tropfenweise in Wasser gegeben, wobei die Strukturbildung induziert wird. Anschließend wird das verbleibende Lösungsmittel abgedampft oder durch Dialyse entfernt. Auch die inverse Technik kann zur Polymersom-Herstellung eingesetzt werden. Hierbei wird unter Rühren sukzessive Wasser zur Polymerlösung gegeben bis der Wasseranteil soweit erhöht ist, dass eine Strukturbildung eintritt. Verbleibendes Lösungsmittel muss auch hierbei aus der resultierenden Polymersom-Dispersion wieder entfernt werden.^{94, 95}

Eine Weiterentwicklung der Nanopräzipitations-Methode wurde von Förster et al. vorgestellt. Die Inkjet-Technologie von Druckern wurde hier zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln genutzt. Kleinste Mengen an Polymerlösung im Picoliter-Bereich

wurden in ein Wasserreservoir injiziert. Durch die exakte Dosierung der Polymerlösung konnten reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Vesikelgröße erreicht werden, jedoch ist die Methode auf Ethanol als Lösungsmittel beschränkt, da die Druckerpatronen gegen viele andere Lösungsmittel nicht beständig sind.⁹⁶

Insbesondere auch im Hinblick auf industrielle Anwendungen von Polymersomen ist eine kontinuierliche Polymersom-Herstellung wünschenswert. Kontinuierliche Verfahren können im Vergleich zur Batch-Synthese höhere Durchsätze und bessere Reproduzierbarkeit bieten. Außerdem sollte auf nachträgliche Verfahrensschritte wie die Membranextrusion zur Größenvereinheitlichung verzichtet werden können.

Die Forschergruppe um Weitz berichtete 2005 erstmals über ein mikrofluidisches System, welches auf einer Wasser-in-Öl-in-Wasser (W/O/W) **Doppelemulsionstechnik** basiert.⁹⁷ Dieser mikrofluidische Aufbau besteht aus zwei runden Glaskapillaren, die ihrerseits innerhalb eines weiteren Röhrchens miteinander verschachtelt hintereinander angeordnet sind. (Abb. 2.5)

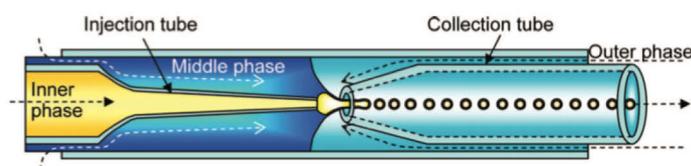


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Mikrokapillar-Geometrie zur Generierung von Doppelemulsionen. Die äußere Phase (outer phase) ist nicht mit der mittleren Phase (middle phase) mischbar und letztere ist ihrerseits nicht mit der inneren Phase (inner phase) mischbar. Die äußere Glaskapillare besitzt einen Außendurchmesser von 1000 μm und einen Innendurchmesser von 580 μm . Sowohl das Injektionsröhrchen (injection tube) als auch das Sammelröhrchen (collection tube) verjüngen sich im Inneren der Glaskapillare. Die Innendurchmesser betragen dort ca. 10 bis 50 μm für das Injektionsröhrchen und 40 bis 100 μm für das Sammelröhrchen. Entnommen aus Shum et al.⁹⁸ Copyright © 2008, American Chemical Society. Wiedergabe mit Genehmigung.

Drei verschiedene Fluidströme, welche als innere, mittlere und äußere Phase bezeichnet werden, werden gleichzeitig in das Gerät gepumpt. Das Diblockcopolymer ist in einem organischen Lösungsmittel gelöst und stellt die mittlere Phase dar. Die innere Phase besteht aus Wasser. Die äußere Phase ist ebenfalls wässrig, wobei ihre Viskosität durch Zusatz von Alginat erhöht wird. Die innere und die mittlere Phase werden nun hydrodynamisch fokussiert in den Eingang des Sammelröhrchens (*collection tube*) geleitet, wodurch uniforme W/O/W-Doppelemulsionströpfchen gebildet werden. Mit

Hilfe dieser kontinuierlichen Herstellungsweise können einheitliche große Polymersome im Mikrometermaßstab (GUV) hergestellt werden. Auch magnetisch beladene, jedoch ebenfalls sehr große (mehrere Mikrometer) Polymer- als auch Lipidvesikel wurden mittels mikrofluidischer Doppemulsionstechnik hergestellt.^{99, 100}

Gerade für die medizinische Anwendung als Wirkstoffträgersysteme ist der Größenbereich von 20-200 nm, also der submikrone Größenbereich, von besonderem Interesse.

Da die im Folgenden beschriebene Mikromischertechnologie zur Polymersom-Herstellung einen großen Stellenwert im Rahmen dieser Arbeit hat, soll dieser Methode nun ein eigener Abschnitt gewidmet werden.

2.3.2 Kontinuierliche Herstellung von Polymersomen im Mikromischer

Die Herstellung von Polymersomen im Mikromischer ist wie die Inkjet-Technologie ebenfalls eine Weiterentwicklung der Nanopräzipitation bzw. der Co-Lösungsmittelmethode. Die kontinuierliche Herstellung soll Probleme, welche bei der konventionellen Batch-Methode auftreten, minimieren bzw. beheben. Diese bestehen zum einen darin, dass die Vesikelbildung stark von der injizierten Polymermenge abhängt und zum anderen von der Durchmischung beim Rühren beeinflusst wird. Des Weiteren können sehr hydrophobe Blockcopolymere, aber auch hydrophobe Komponenten, die in die Vesikelmembran eingelagert werden sollen, beim Kontakt mit Wasser als selektives Lösungsmittel ausfallen, wenn die Selbstorganisation nicht schnell genug erfolgt. Außerdem ist im Batch allgemein der Durchsatz begrenzt und die Reproduzierbarkeit von Ansatz zu Ansatz kann schwanken.

Insbesondere für sehr schnelle Reaktionen und für solche, die eine besondere Reaktionskontrolle erfordern, wurden in den letzten Jahren vermehrt mikrofluidische Systeme zur Synthese eingesetzt. Die sehr kleinen Volumina, mit denen in Mikromischern gearbeitet wird, vergrößern die Grenzflächen zwischen den einzelnen Reaktionskomponenten, wodurch eine sehr schnelle Mischung und damit eine geringe Mischzeit realisiert werden kann. Zusätzlich ist eine gute Temperaturkontrolle gegeben und damit auch eine schnelle Abfuhr von Reaktionswärme gewährleistet. Auf diese Weise können unerwünschte Nebenreaktionen reduziert werden. Außerdem können auf Grund der geringen Reaktionsvolumina auch gefährliche Reaktionen, beispielsweise mit Peroxiden oder elementarem Fluor, kontrolliert durchgeführt werden.^{101, 102}

Mikromischer-basierende Systeme wurden auch in der Polymersynthese bereits erfolgreich angewendet.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Bei der Polymersom-Herstellung soll die Mikromischer-Technologie in Anlehnung an die konventionelle Co-Lösungsmittelmethode helfen, einen kontrollierten Transfer des Blockcopolymers vom guten Lösungsmittel für beide Blöcke in ein selektives Lösungsmittel zu ermöglichen.

Das Konzept zur Nutzung von Mikromischern für die Polymersom-Herstellung aus Poly(butadien)-*block*-Poly(ethylenoxid) PB-*b*-PEO mit der Co-Lösungsmethode wurde 2009 erstmals von Müller et al. vorgestellt.¹⁰⁶ Im Rahmen der Dissertation von Raphael Thiermann wurde die Methode weiterentwickelt und optimiert.¹⁰⁷ Für das System PB₁₃₀-PEO₆₆ konnten bereits engverteilte Polymervesikel verschiedener Größen kontinuierlich hergestellt werden.¹⁰⁸ Im Gegensatz zu der von der Gruppe um Weitz vorgestellten kontinuierlichen Methode der Doppalemulsion war es mit dem Mikromischersystem auch möglich, Polymersome mit Durchmessern unterhalb von 100 nm herzustellen. Außerdem konnten durch Variation der Mischparameter auch Vesikel-Vorstufen wie Mizellen und scheibenförmige Strukturen erhalten und visualisiert werden. Auf den in dieser Arbeit verwendeten Mikromischer und auf das Prinzip der Selbstorganisation im Mikromischer soll im Folgenden noch einmal genauer eingegangen werden.

2.3.2.1 Aufbau der Mikromischer-Anlage

In Abb. 2.6 ist der prinzipielle Aufbau der Mikromischer-Anlage dargestellt. Das Polymer ist in einem guten Lösungsmittel für beide Blöcke gelöst und liegt in Form von Unimern vor. In einem zweiten Reservoir befindet sich das selektive Lösungsmittel, welches in diesem Fall Wasser ist. Die beiden Lösungen werden mit Hilfe von HPLC-Pumpen in den Mikromischer gepumpt, wo schließlich durch Mischung der Anteil des selektiven Lösungsmittels soweit erhöht wird, dass eine Strukturbildung einsetzt.

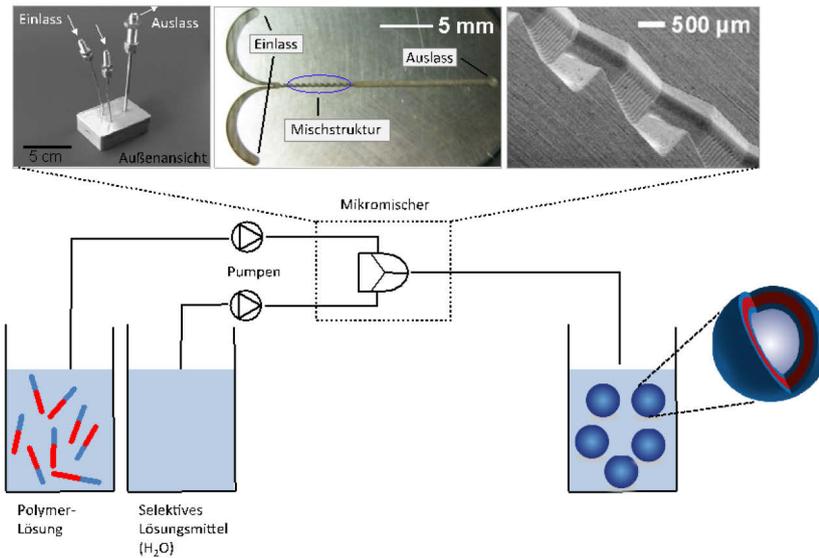


Abb. 2.6: Prinzipieller Aufbau des Mikromischer-Systems zur Polymersom-Herstellung. Die oberen Bilder zeigen den Mikromischer in der Außenansicht, die Struktur im Inlay des Mischers und eine Vergrößerung der Mischstruktur.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich ein sogenannter *Raupenmischer* Modell CPMM-R300 (CPMM engl.: *caterpillar micro mixer*) verwendet, welcher im Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH entwickelt wurde. Die Spezifikationen dieses Mischers sind in Tab 2.1 zusammengefasst. Der verwendete Raupenmischer ist aus Edelstahl gefertigt. Die Mischkammer hat ein inneres Volumen von 10 μL . Die Verweildauer in der Mischstruktur liegt je nach Flussrate (max. 4 L/h) zwischen 3,6 und 72 ms. Die Mischung beruht auf dem sogenannten *SAR-Prinzip* (engl. *split and recombine*, dt. aufspalten und wiedervereinen) (Abb 2.7).¹⁰⁹ Die Mischstruktur hat bei diesem Modell eine Breite von 300 μm und ist aus insgesamt 12 Elementen aufgebaut. Mit jedem Element wird das Fluid einem SAR-Schritt unterzogen. Im idealen Fall würde dies somit zur Ausbildung von 2048 ($= 2^{11}$) Lamellen führen.

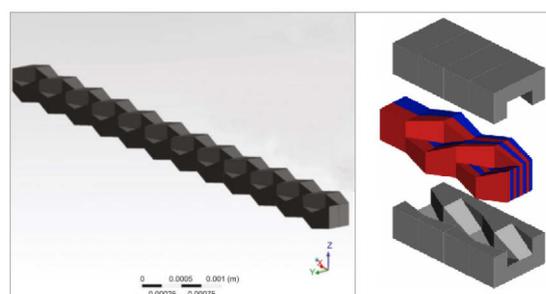


Abb. 2.7: Modell der Mischstruktur des Raupenmischers (links) und theoretisches Mischprofil nach dem SAR-Prinzip

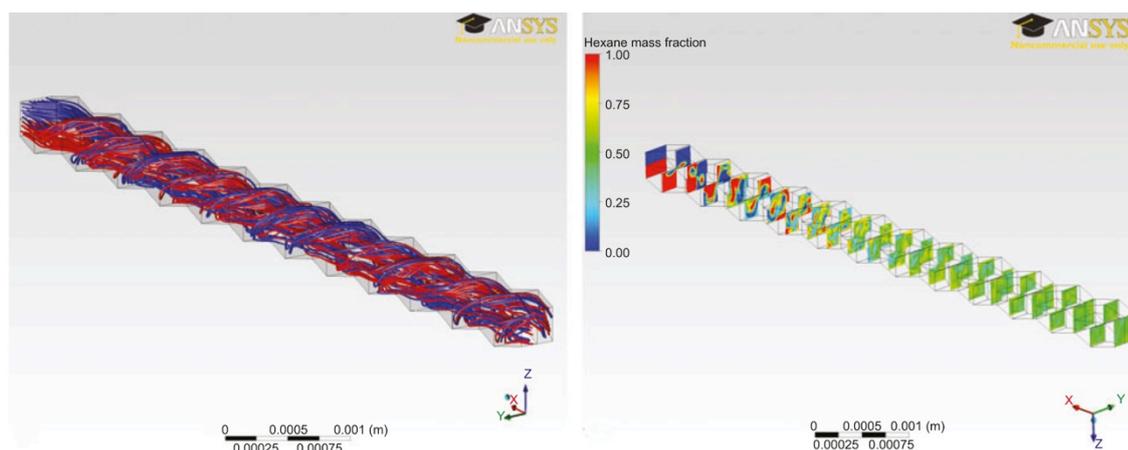


Abb. 2.8: Simulation der Flussbedingungen und des Konzentrationsprofils im CPMM-300 Raupenmischer: Die Simulation bezieht sich auf die Mischung einer Monomer-Lösung (50 Gew.-% THF, 50 Gew.-% Styrol) mit reinem n-Hexan für einen Massenstrom von 0,03 g/s. Entnommen aus Ziegenbalg et al.¹⁰⁵, Copyright © 2012, De Gruyter. Wiedergabe mit Genehmigung.

Unter realistischen Bedingungen kommt es jedoch vermehrt zu interner Reibung, welches eine Zerstörung der Fluid-Lamellen zur Folge hat. Diese transversalen Kräfte dominieren das Flussprofil mit zunehmender Strecke im Mischer, so dass vermehrt Verwirbelungen auftreten, welche in einem eher chaotischen Strömungsprofil resultieren (Abb. 2.8).^{105, 109}

Diese „kontrollierte“ turbulente Mischung ist sehr effizient, so dass Mischzeiten $t_{M,95\%}$ von wenigen Millisekunden erreicht werden können.¹⁰⁵ Die beiden Eingänge des Raupenmischer sind parallel zueinander angeordnet, dadurch ist der Einfluss bei unterschiedlichen Fluidströmen gering und die Mischzeiten bleiben auch für stark asymmetrische Flussraten nahezu konstant.¹⁰⁵ Diese Tatsache ist insbesondere für die Anwendung zur kontrollierten Selbstorganisation wichtig, weil dort sehr schnell der Anteil des selektiven Lösungsmittels erhöht werden muss und dafür asymmetrische Flussraten notwendig werden. Den Raupenmischer gibt es auch in vergrößerter Ausführung mit 600 oder 1200 μm Profilbreite. Damit ist die Möglichkeit eines einfachen *Upscalings* gegeben, denn so können bei erhöhter Flussrate vergleichbare Mischbedingungen erzielt werden.

Tab. 2.1: Spezifikationen des Raupenmischers R-300¹¹⁰

Modellbezeichnung	CPMM-V1.2-R300
Größe (L x B x H) [mm]	60 x 45 x 20
Mischkanalbreite [μm]	300
Inneres Volumen [μL]	10
Material	Edelstahl 1.4435
Betriebstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	-40 – 220
Druckstabilität [bar]	100
Flussrate [L/h]	0,5 – 4
Verweilzeit [ms]	3,6 – 72
Maximale Viskosität [mPas]	100

2.3.2.2 Phasen der Selbstorganisation im Mikromischer

Die Selbstorganisation im Mikromischer verläuft in verschiedenen Phasen, ähnlich der Simulationsergebnisse, die von Shillcock et al. beschrieben wurden (Abschnitt 2.2.1). Das Polymer ist zunächst in einem guten Lösungsmittel gelöst, die Polymerketten liegen molekular vor, es findet keine Strukturbildung statt. Im Mikromischer werden Polymerlösung und selektives Lösungsmittel gemischt. Zu Beginn der Mischzeit können Polymerketten noch frei diffundieren und sich organisieren. Wird der Gehalt an selektivem Lösungsmittel zu hoch, kann die Struktur eingefroren werden. Für Polymere mit sehr geringer Wasserlöslichkeit kann nahezu keine Diffusion einzelner Polymerketten mehr stattfinden und damit auch kein Austausch zwischen den Polymerketten der gebildeten Strukturen. Damit können auch Strukturen in einem thermodynamisch ungünstigen Zustand kinetisch gefangen werden. Bei Tensiden beispielsweise oder anderen kleinen, gut wasserlöslichen Amphiphilen ist selbst in reinem Wasser noch freie Diffusion der Unimere möglich, wodurch noch eine Dynamik der gebildeten Strukturen zu beobachten ist.

Die Selbstorganisation, welche hauptsächlich vom hydrophoben Effekt getrieben ist, setzt bei einem bestimmten Gehalt an selektivem Lösungsmittel (hier: Wasser) ein. Der

benötigte Gehalt des selektiven Lösungsmittels, bei welchem die Strukturbildung einsetzt, ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

- Polymerkonzentration
- Temperatur
- Blockcopolymer-Eigenschaften: Monomere, Blocklängenverhältnis, Molmasse
- Lösungsmiteigenschaften der verwendeten Lösungsmittel

Mit steigender Polymerkonzentration setzt die Mizellenbildung früher ein - dadurch verlängert sich die Zeit, welche den Mizellen zum Anwachsen in scheibenförmigen Doppelschichten zur Verfügung steht. Die daraus resultierenden Vesikel weisen demnach größere Durchmesser auf als bei geringerer Polymerkonzentration.¹⁰⁷ Dies wurde auch bei den Simulationen von Shillcock et al. beobachtet.

Der Zeitpunkt der Strukturbildung kann durch unterschiedlich schnelle Mischzeiten beeinflusst werden. Die Mischgeschwindigkeit steht mit der Flussrate in direktem Zusammenhang. Nur bei sehr niedrigen Flussraten, bei welchen keine Turbulenzen auftreten, also ein laminares Flussprofil vorherrscht, ist die Mischgeschwindigkeit verhältnismäßig langsam und unabhängig von der Flussrate. Hierbei beruht die Mischung ausschließlich auf Diffusion und ist somit nur von der Lamellendicke abhängig.

Mit Variation der Flussraten kann das Mischprofil innerhalb der Mischkammer beeinflusst werden. Am Eingang des Mixers herrscht gewöhnlich noch ein laminares Flussprofil bis es durch transversale Kräfte vermehrt zu Verwirbelungen kommt und in einen turbulenten Fluss übergeht. Die Mischgeschwindigkeit im turbulenten Bereich des Mixers ist im Vergleich zum laminaren Bereich stark erhöht. Der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung kann über die Flussgeschwindigkeit gesteuert werden. Da der Gehalt an selektivem Lösungsmittel in der Polymerphase in direktem Zusammenhang mit der Mischgeschwindigkeit steht, kann die Strukturbildung neben der Polymerkonzentration auch durch die Flussrate beeinflusst werden.

Der Einfluss der Flussrate auf die Strukturbildung ist in Abb 2.9 dargestellt. Mit Erhöhung der Flussrate wird der Übergang von laminarer in turbulente Strömung in Richtung des Mischereingangs verschoben. Dadurch wird die Strukturbildung in einer früheren Phase abgebrochen. Auf diese Weise lässt sich ein auf Grund seiner Geometrie und Amphiphilie bevorzugt Vesikel-bildendes Polymer auch zur Bildung von sphärischen Mizellen oder gar scheibenförmigen Doppelschichten zwingen. Raphael Thiermann

konnte im Rahmen seiner Dissertation Kugelmizellen als auch scheibenförmige Doppellagen aus PB₁₃₀-PEO₆₆ mittels Mikromischer-Technologie herstellen und mittels Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie nachweisen.¹⁰⁷ Diese Tatsache zeigt, dass die Mikromischer-Technologie Mischzeiten ermöglicht, die in der Größenordnung der Kinetik der Selbstorganisation von größeren Blockcopolymeren wie dem hier verwendeten PB₁₃₀-PEO₆₆ liegen. Auf diese Weise können für schlecht wasserlösliche Blockcopolymer kinetisch gefangene Strukturen hergestellt werden.

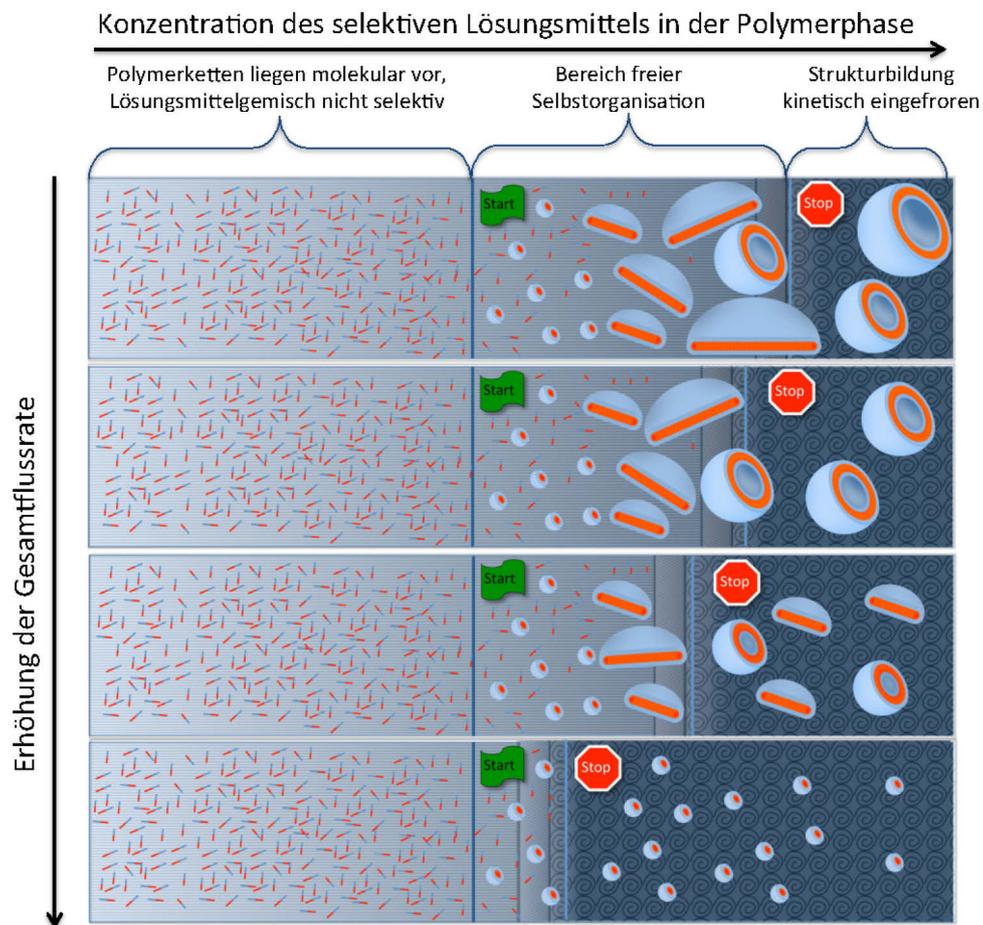


Abb. 2.9: Phasen der Selbstorganisation im Mikromischer in Abhängigkeit von der Flussrate. Reproduziert mit Genehmigung von Raphael Thiermann.¹⁰⁷ Der Übergang von laminarer in turbulente Strömung ist durch die Musterung und Farbveränderung im Hintergrund dargestellt.

Neben PB-PEO wurde auch ein Triblock aus der Gruppe der Pluronic®-Polymere in dieser Arbeit zur Herstellung von polymeren Strukturen verwendet. Auf die beiden Polymer-Systeme soll nachfolgend genauer eingegangen werden.

2.3.3 Das Polymer Polybutadien-*block*-Polyethylenoxid

Das Blockcopolymer Polybutadien-*block*-Polyethylenoxid PB-*b*-PEO ist ein nicht-bioabbaubares Blockcopolymer, das auf Grund seiner Eigenschaften gerne und häufig als Modell amphiphiler Polymere genutzt wird. Polybutadien, welches den hydrophoben Block dieses Polymers darstellt, findet auch in der Industrie breite Anwendung. So fließen beispielsweise 70 % des jährlich produzierten Polybutadiens auf Grund der hohen Elastizität und breiten Temperaturbeständigkeit (Einsatzbereich -80 °C bis 90 °C) in die Produktion von Kraftfahrzeugreifen. Der hydrophile Block besteht aus Polyethylenoxid, welche das meist verwendete nicht-abbaubare Polymer ist, das Anwendung in verschiedenen Bereichen der Medizin findet. Wie in Abschnitt 1.2.5 bereits erwähnt, wird es beispielsweise zur Stabilisierung von Liposomen (*Stealth-Liposome*) und der Verlängerung ihrer Blutzirkulationszeit als auch als Polymer für Wirkstoff-Konjugate genutzt.

2.3.3.1 Synthese

Die in dieser Arbeit eingesetzten PB-*b*-PEO-Blockcopolymere wurden von Oliver Rheingans und Michael Maskos mittels anionischer Polymerisation hergestellt (Abb. 2.10).⁷⁹ Der hierbei verwendete Cumylkalium-Initiator wurde durch säurekatalysierte Addition von Methanol an α -Methylstyrol synthetisiert. Die anionische Polymerisation von 1,3-Butadien wurde bei -65 °C in THF durchgeführt, um bevorzugt eine 1,2-Addition zu erhalten. Nachfolgend wurde zunächst eine kleine Menge Ethylenoxid zugegeben. Später wurde der Ansatz geteilt und erneut jeweils unterschiedliche Mengen an Ethylenoxid zugegeben. Vor dem Reaktionsabbruch wurden die Ansätze wieder in jeweils zwei verschiedene Reaktionen geteilt. Ein Ansatz wurde schließlich durch Zugabe von Essigsäure und der andere Ansatz durch Zugabe von Bernsteinsäure-anhydrid abgebrochen. Auf diese Weise wurden Blockcopolymere mit jeweils gleichem Polybutadien-Anteil, jedoch unterschiedlich langem Polyethylenoxid-Block erhalten. Zudem resultierten aus der Reaktion Polymere verschiedener Endgruppen ($-\text{H}$ und $-(\text{CO})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOK}$).

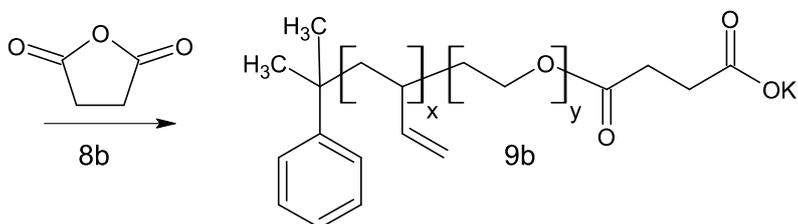
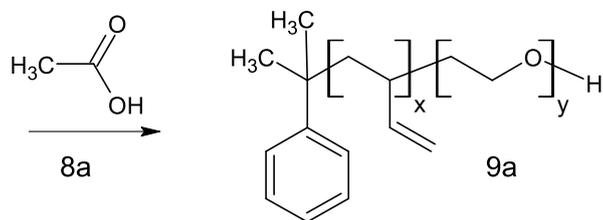
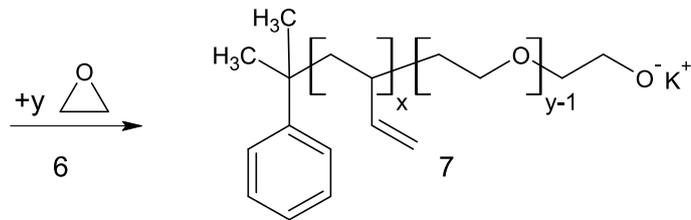
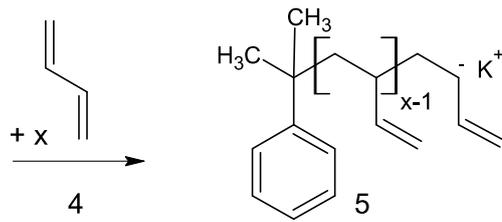
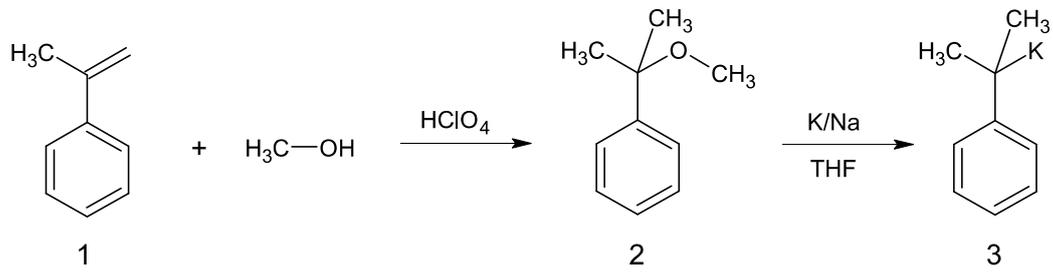


Abb. 2.10: Reaktionsschema für die Synthese von amphiphilen PB-*b*-PEO-Blockcopolymeren⁷⁹

2.3.3.2 Selbstorganisation von PB-*b*-PEO-Blockcopolymeren

Das PB-*b*-PEO-Blockcopolymer ist - wie bereits erwähnt - ein beliebtes Modellpolymer, dessen Strukturbildung bereits von verschiedenen Forschergruppen untersucht wurde.^{79, 80, 111, 112} Ein Grund dafür ist sicherlich, dass der PB-Block mit der 1,2-Doppelbindung eine Gammastrahlen-induzierte Vernetzung ermöglicht, ohne dass der Zusatz eines chemischen Vernetzers notwendig ist. Dadurch können organisierte Strukturen nachhaltig fixiert werden, was die Analyse beispielsweise mit Hilfe der Elektronenmikroskopie erheblich erleichtert. Es wurde bereits gezeigt, dass sich die Struktur durch die Vernetzung nicht verändert.^{112, 113} Des Weiteren zeigen fixierte Nanostrukturen aus Polybutadien ausreichend Kontrast in der Elektronenmikroskopie, so dass auf eine zusätzliche Kontrastierung wie beispielsweise mit Uranyl-Acetat verzichtet werden kann.

Die bevorzugte Strukturbildung des PB-*b*-PEO-Copolymers in einem selektiven Lösungsmittel unterscheidet sich, ähnlich wie bei Tensiden, je nach Polymerzusammensetzung. Dabei ist sowohl die Kettenlänge der jeweiligen Blöcke als auch das Verhältnis der Blöcke zueinander von Bedeutung. In Abb. 2.11 ist ein schematisches Phasendiagramm für PB-*b*-PEO in Wasser dargestellt, das die bevorzugte Strukturbildung in Abhängigkeit der Polymerkomposition zeigt.^{79, 111}

Aus diesem auf experimentellen Daten für PB-*b*-PEO beruhenden Phasendiagramm lässt sich eine generelle Tendenz herleiten, die maßgeblich von der Fraktion f des hydrophilen Blocks abhängt. Doppellagige Systeme wie vesikuläre Strukturen bilden sich in Wasser, wenn die hydrophile Fraktion bezogen auf die Gesamtmasse bei ca. $f = 30 \% \pm 10 \%$ liegt. Erhöht sich der hydrophile Anteil bis zu ca. $f < 50 \%$, wird eine zylindrische Morphologie bevorzugt. Bei fortlaufender Erhöhung der hydrophilen Fraktion steigt die Tendenz zur Ausbildung von sphärischen Mizellen bis bei sehr hohem Anteil des hydrophilen Volumens nahezu ausschließlich sphärische Strukturen entstehen. Diese Abhängigkeit der bevorzugten Strukturbildung von der hydrophilen Fraktion des Amphiphils lässt sich auch auf andere Blockcopolymer-Systeme übertragen.^{78, 114}

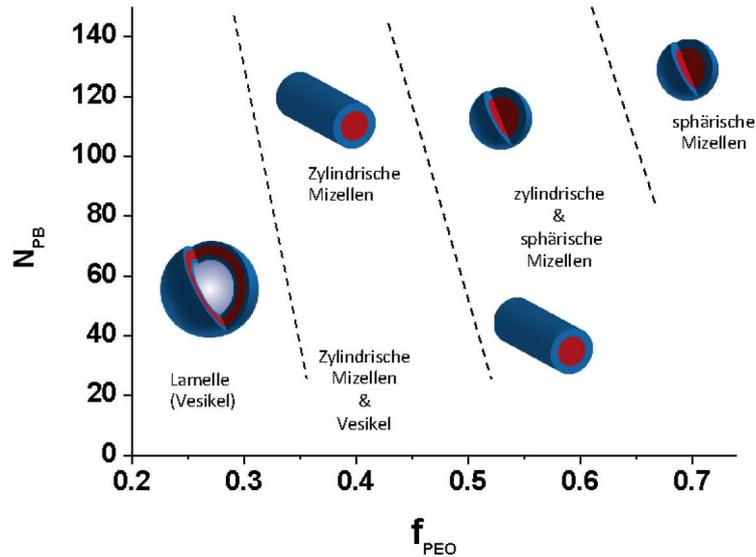


Abb. 2.11: Morphologie-Diagramm für die Strukturbildung von PB-*b*-PEO-Blockcopolymeren in Wasser in Abhängigkeit der PB-Wiederholungseinheiten und des PEO-Gewichtsanteils (adaptiert nach Maskos 2006 und Jain & Bates 2004).^{79,111}

Assemblierte Strukturen aus PB-*b*-PEO sind im Allgemeinen sehr stabil. Mit steigender Blocklänge des PB-Segments nimmt die Löslichkeit des Polymers in Wasser ab. Dadurch ist keine oder kaum freie Diffusion von Unimeren möglich und der Austausch zwischen den gebildeten Strukturen ist kinetisch gehemmt. Die Dimensionen der supramolekularen Strukturen, beispielsweise die Membrandicke der Vesikel, können durch Variation der Blocklängen ebenfalls beeinflusst werden. Discher und Eisenberg zeigten eine Proportionalität der Membrandicke für Polymersome von $d \sim MW^b$ (mit $b = 0,5$ bis $0,6$) für Blockcopolymere mit MW als Molmasse des hydrophoben Blocks.¹¹⁵ Die Membran von PB-*b*-PEO-Vesikeln ist nachweislich sehr stabil und kaum permeabel. Müller et al. zeigten mit der Verkapselung des pH-sensitiven Farbstoffs Phloxin B, dass dieser im Inneren der PB-*b*-PEO-Vesikel vor pH-Änderungen geschützt ist.¹¹⁶ In einer Publikation von Rodrigues-Garcia et al. wurde die extrem hydrophobe PB-Schicht der Polymersom-Membran ebenfalls als Diffusionsbarriere für hydrophile Substanzen bestätigt.¹¹⁷ Diese enorme Stabilität und Impermeabilität der PB-*b*-PEO-Strukturen erleichtert zwar grundlegende Untersuchungen, limitiert jedoch auch die biomedizinischen Anwendungen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres, kommerziell erhältliches Polymer für potenzielle Anwendungen als Wirkstoffträgersystem untersucht.

2.3.4 Das Polymer Pluronic® L121

Amphiphile Triblockcopolymer aus Poly(ethylenoxid)-Poly(propylenoxid)-Poly(ethylenoxid), auch bekannt als Poloxamere oder unter dem Handelsnamen Pluronic®, erfreuen sich eines großen Forschungsinteresses, insbesondere auch im Bereich der Biomedizin.^{22, 118-121} Viele Poloxamere sind von der US-Behörde FDA für verschiedene Anwendungen zugelassen und werden bereits in vielen kosmetischen Produkten beispielsweise als Emulgatoren eingesetzt.¹²² Auch in einigen medizinischen Formulierungen von z.B. hydrophoben Proteintherapeutika wie Interferonen (Rebif®) sind Poloxamere als Zusatzstoffe zugelassen.¹²³

Die Beliebtheit der Pluronic®-Polymere als potenzielle Wirkstoffträgersysteme ist sicherlich auch durch Polyethylenoxid als hydrophilem Block begründet, welcher eine zusätzliche PEGylierung wie bei Liposomen (Stealth-Liposomen) überflüssig macht. Neben der Verlängerung der Blutzirkulation ist das immer häufiger auftretende Phänomen der Multi-Drug-Resistenz (MDR) vieler Tumoren ein wichtiges Thema bei der Entwicklung von Wirkstoffträgern. Wie in Abschnitt 1.2.5 bereits erwähnt, wurden Pluronic®-Polymere auch im Zusammenhang mit der Überwindung von MDR durch Hemmung von Effluxpumpen in der Literatur beschrieben.¹²⁴ Zudem zeigen Pluronic®-Polymere generell ein gutes Sicherheitsprofil. Auch wenn es sich bei dem synthetischen PEO-PPO-PEO um ein nicht-bioabbaubares Material handelt, so werden normalerweise Moleküle, die unterhalb eines Molekulargewichts von 10-15 kDa liegen, über die Niere ausgeschieden (vgl. Abschnitt 1.2.3).^{125, 126}

Eine ausführliche Literaturrecherche ergab keine Hinweise auf ein bereits auf dem Markt befindliches Pluronic®-basierendes Wirkstoffträgersystem. Das in Abschnitt 1.2.5 beschriebene mizellare System aus Pluronic®-Polymeren beladen mit Doxorubicin (Produkt SP1049C von Supratek Pharma Inc.) befindet sich derzeit in der klinischen Phase II.

2.3.4.1 Synthese von Pluronic®-Polymeren

Pluronic®-Polymere werden durch schrittweise Addition von Propylenoxid und nachfolgend Ethylenoxid an Propylenglycol hergestellt (Abb. 2.12). Die Stufen der Oxyalkylierung werden in Anwesenheit eines alkalischen Katalysators wie Natrium- oder Kaliumhydroxid durchgeführt. Der Katalysator wird nachfolgend neutralisiert und vom Endprodukt entfernt.¹²⁷

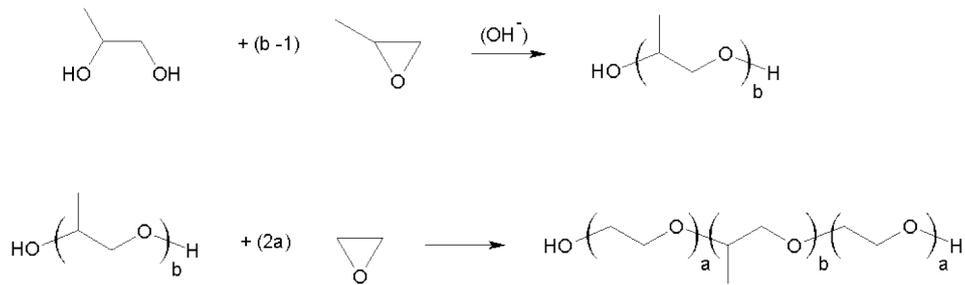


Abb. 2.12: Syntheschema für PEO-PPO-PEO-Triblockcopolymer nach Schmolka 1977¹²⁷

Eine Übersicht über die kommerziell erhältlichen Poloxamer- (bzw. Pluronic®) Polymere zeigt Tab. 2.2. Pluronic® L121 entspricht dabei dem Poloxamer 401, welches mit nur 10 % Polyethylenoxid-Anteil zu den hydrophobesten Polymeren dieser Serie gehört und ein mittleres Molekulargewicht von insgesamt ca. 4400 g/mol besitzt.

Tab. 2.2: Poloxamer-Serie¹²⁷

MW _{PPO} ¹ ↓	% Ethylenoxid							
	10	20	30	40	50	60	70	80
4000	401*	402	403	–	–	–	407	–
3250	331	–	333	334	335	–	–	338
2750	–	282	–	284	–	–	–	288
2250	231	–	–	234	235	–	337	238
2050	–	212	–	–	215	–	217	–
1750	181	182	183	184	185	–	–	188
1200	–	122	123	124	–	–	–	–
950	101	–	–	–	105	–	–	108

¹Molekulargewicht des hydrophoben Blocks Polypropylenoxid
* Poloxamer 401 entspricht Pluronic® L121

2.3.4.2 Phasenverhalten von Pluronic® L121

Abhängig von der Blocklängenkomposition der Pluronic®-Polymere unterscheidet sich ihre Tendenz der Selbstorganisation in wässriger Umgebung. Viele der häufig untersuchten PEO-PPO-PEO-Polymere haben einen hohen hydrophilen Anteil und organisieren sich in Wasser zumeist in Mizellenstrukturen mit einem hydrophoben PPO-Kern und einer hydrophilen PEO-Hülle.^{128, 129} Das in dieser Arbeit verwendete Pluronic® L121, $\text{EO}_5\text{PO}_{68}\text{EO}_5$, ist - wie bereits erwähnt - ein relativ hydrophobes Blockcopolymer und zeigt im Phasenverhalten die Tendenz zur Bildung von lamellaren Strukturen.^{130, 131} Auf Grund dieser Eigenschaft eignet sich dieses Polymer gut zur Herstellung von Polymersomen. Da Polymersome ähnlich der Liposome sowohl ein hydrophiles inneres Kompartiment besitzen als auch die Möglichkeit bieten, hydrophobe Substanzen in der Membran zu lösen, sind sie für die Anwendung als Wirkstoffträger besonders interessant.

Vesikel aus PEO-PPO-PEO-Triblockcopolymeren unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von den zuvor beschriebenen PB-PEO-Diblock-Vesikeln. PPO ist im Vergleich zu PB weniger hydrophob und stellt demnach für wasserlösliche Substanzen keine so undurchdringliche Barriere dar, als es bei PB-PEO-Vesikeln der Fall ist. Rhodrigues-Garcia führte vergleichende Untersuchungen zwischen den beiden Polymer-Systemen durch und konnte für Pluronic®-L121-Vesikel im Gegensatz zu PB-PEO-Polymersomen eine gewisse Membrandurchlässigkeit für verschiedene Farbstoffe als auch für kleine Ionen zeigen.¹¹⁷ Auf Grund der bedingten Wasserlöslichkeit des Polypropylenoxid-Blocks weist die Pluronic®-L121-Membran einen gequollenen, gelartigen Zustand auf und ist deutlich flexibler und fluider als die Polybutadien-Membran. Des Weiteren zeigen PEO-PPO-PEO-Polymere thermo-responsives Verhalten und weisen eine untere kritische Lösungstemperatur, eine sogenannte LCST (*lower critical solution temperature*) auf. Unterhalb dieser Temperatur wandelt sich der hydrophobe PPO-Block in einen hydratisierten, hydrophilen Zustand, so dass aggregierte supramolekulare Strukturen wie Mizellen und Vesikel beginnen sich aufzulösen bis schließlich nur noch unimolekulare Ketten vorliegen. Umgekehrt beginnen molekular vorliegende Ketten bei Temperaturerhöhung in supramolekulare Strukturen zu aggregieren - diese Temperatur wird auch *kritische Aggregationstemperatur* (CAC, engl. *critical aggregation temperature*) genannt. Die Phasenübergangstemperatur von Pluronic®-Polymeren ist von den jeweiligen Blocklängen abhängig und liegt zwischen 14 °C und 100 °C.¹²⁷

In Abb. 2.13 ist ein Phasendiagramm für Pluronic® L121 dargestellt. Pluronic® L121 liegt bei niedrigen Konzentrationen und Temperaturen unterhalb von 15 °C weitestgehend in Form von Unimeren vor (L_1). Im Bereich des Zweiphasen-Regimes von isotroper Polymerlösung und lamellarer Phase (L_1+L_α) lassen sich Vesikel-Strukturen herstellen.^{130, 131} Bei sehr hohen Polymerkonzentrationen (> 75 Gew.-%) wurde in einem $EO_5PO_{68}EO_5/D_2O$ -System auch das Vorliegen einer inversen hexagonalen Phase (H_2) beobachtet.¹³²

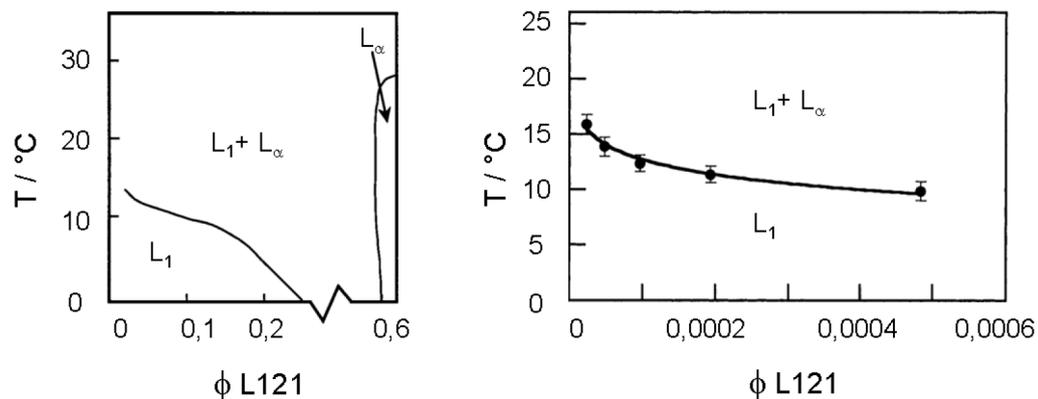


Abb. 2.13: Phasendiagramm eines $EO_5PO_{68}EO_5/D_2O$ -Systems: L_1 entspricht der isotropen Polymerlösung und L_α der lamellaren Phase. Entnommen aus Schillen et al.¹³¹ und Bryskhe et al.¹³⁰ Copyright © 1999, 2004, American Chemical Society. Wiedergabe mit Genehmigung.

Für den Gebrauch von Wirkstoffträgersystemen ist der Phasenübergang von Pluronic® L121 bei niedrigen Temperaturen ungünstig, da die supramolekulare Vesikelstruktur relativ instabil ist und dadurch beispielsweise eine gekühlte Lagerung für empfindliche Wirkstoffe unmöglich wird. Aus diesem Grund wurden schon einige Arbeiten bezüglich Stabilisierungsmöglichkeiten von Pluronic®-Vesikeln durchgeführt.^{133, 134} Eine Strategie war beispielsweise der Einbau eines Vernetzers, Pentaerythritoltetraacrylat (PETA), welcher durch UV-Strahlung oder thermisch induziert polymerisiert und so die Membran stabilisiert. Allerdings weisen Rückstände des Vernetzers zytotoxische Effekte auf. Des Weiteren kann sowohl UV-Strahlung als auch erhöhte Temperatur zur Beschädigung labiler Wirkstoffe führen.

2.3.5 Der Wirkstoff Camptothecin

Im Rahmen dieser Arbeit war neben der Herstellung von Polymersomen auch deren Beladung von zentraler Bedeutung. Camptothecin ist eine zytotoxische Substanz, die ursprünglich aus der Rinde des sogenannten „Happy tree“, *Camptotheca acuminata*, gewonnen wurde.¹³⁵ Die zytotoxische Wirkung von Camptothecin beruht auf der Interaktion mit dem Enzym Topoisomerase I, welches eine zentrale Rolle bei der Entspiralisierung von DNA-Abschnitten während der Replikation spielt.¹³⁶ Wie viele in der Krebstherapie eingesetzten Wirkstoffe greift damit auch Camptothecin in Vorgänge bei der Zellteilung ein. Ziel ist es, Krebszellen auf Grund ihrer erhöhten Teilungsrate verstärkt zu treffen. Leider haben solche Chemotherapeutika starke Nebenwirkungen, die besonders auch andere Zellen mit hoher Teilungstendenz, wie Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes und Haarwurzelzellen treffen.

Nicht nur auf Grund seiner Toxizität ist Camptothecin ein geeigneter Wirkstoff, dessen Wirkung und Sicherheit mit Hilfe eines Trägersystems enorm verbessert werden könnten. Camptothecin ist eine sehr hydrophobe Substanz, die nahezu wasserunlöslich ist ($< 10 \mu\text{g/ml}$).^{118, 137} Eine Verabreichung ohne Lösungsvermittler ist daher nur in minimaler Dosis möglich. Des Weiteren ist für die Interaktion mit der Topoisomerase I der Lacton-Ring der Substanz von tragender Bedeutung. In wässriger Umgebung kann dieser Lacton-Ring schneller Hydrolyse unterliegen und in die weniger biologisch aktive Carboxylat-Form konvertieren (Abb. 2.14).¹³⁸ Ein Wirkstoffträgersystem müsste in diesem Fall also eine erhöhte Wirkstofflöslichkeit vermitteln sowie gesundes Gewebe vor dem zytotoxischen Wirkstoff und gleichzeitig den Wirkstoff vor schneller Hydrolyse schützen.

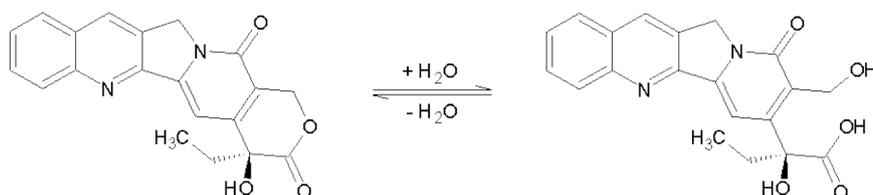


Abb. 2.14: Struktur der Lacton- und Carboxylat-Form des Camptothecins. Der Lacton-Ring kann unter physiologischen Bedingungen sehr schnell hydrolysiert werden, wodurch Camptothecin an Wirksamkeit verliert.

Auch für die Adressierung von Wirkstoffträgersystemen ist dieses Peptid äußerst vielversprechend und zudem sehr viel günstiger in der Herstellung als beispielsweise monoklonale Antikörper. In dieser Arbeit wurde [Lys³]-Bombesin verwendet, welches ein Bombesin-Analog ist, bei dem die dritte Aminosäure Arginin durch Lysin ersetzt wurde (Abb. 2.15). Dadurch trägt das Peptid eine frei zugängliche Aminogruppe, die für die Konjugation an die Polymersom-Oberfläche ausgenutzt werden kann.

Tab. 2.3: Expression des GRP-Rezeptors in menschlichen Tumoren (in Auszügen aus Cornelio et al. 2007)¹⁴⁷

Krebsart	% positiv ¹	Literaturverweis
Prostatakarzinom	63 – 100	Int J Cancer 1998;79 (1): 82-90. Cancer Res 1999;59: 1152-1159. Prostate 2000;42 (4): 1139-1146. Clin Cancer Res 2002;8 (4): 1139-1146.
Gastrinom	100	Clin Cancer Res 2002;8 (4): 1139-1146.
Mammakarzinom	33 – 72	Clin Cancer Res 2002;8 (4): 1139-1146. Cancer Res 1995;55 (2): 280-187. Am J Pathol 1999;155 (6): 2067-2076.
Ovarialkarzinom	77	Regul Pept 2000;90 (1-3): 77-84.
Pankreaskarzinom	66	Lab Invest 2000;80 (12) 1807-1817
Kolorektale Tumoren	24 – 100	Br J Cancer 1995;71 (5): 1187-1089. Br J Cancer 2000;82 (1): 124-130. Eur J Cancer 1999;35 (1): 125-123.
Nierenkrebs	35 – 100	Clin Cancer Res 2002;8 (4): 1139-1146. J Urol 2005;173: 2154-2159.
Lungenkarzinom	29 – 33	Clin Cancer Res 2002;8 (4): 1139-1146. J Cancer Res Clin Oncol 2002;128 (12):633-640.
Neuroblastom	73 – 100	Ann Surg 2002;235(5):621-629. Curr Surg 2001;58(1):86-89.

¹In den Studien wurde eine unterschiedliche Anzahl n an Proben untersucht (4<n<100). Der Prozentsatz gibt an, welcher Anteil der jeweils untersuchten Proben eine GRPR-Überexpression zeigte.

2.4 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO *superparamagnetic iron oxide*) finden schon seit den 1990er Jahren Anwendung im Bereich der Nanomedizin. Bereits 1994 wurde Endorem® und 2002 Resovist® als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie von Leber und Milz zugelassen.¹⁴⁸ Beide Produkte bestehen aus Eisenoxid-Nanopartikeln mit einer Dextran- bzw. Carboxydextranhülle als sterische Stabilisierung und weisen einen hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von 50 bis 150 nm auf. Eisenoxid-Nanopartikel gelten im Allgemeinen als biokompatibel. Die eingesetzten Eisenmengen in diagnostischer Dosierung entsprechen zudem mit 10 – 50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ nur etwa 5 – 10 % der Gesamteisenmenge im Körper und können daher nach dem Abbau in den Körpereisenpool überführt werden.¹⁴⁸ Für Eisenoxid-Nanopartikel gibt es auf Grund ihrer besonderen Eigenschaften noch weitere Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin.

Kürzlich wurde von der *MagForce AG* in Berlin das erste SPIO-basierende Magnet-Fluid für die Hyperthermie-Behandlung von Hirntumoren in Europa zugelassen.¹⁴⁹ Diese Eisenoxid-Nanopartikel haben eine Aminosilan-Umhüllung und werden direkt in das Tumorgewebe injiziert.¹⁵⁰

Des Weiteren laufen gegenwärtig verschiedene Arbeiten zum sogenannten *magnetic targeting*. Ziel ist es dabei, Nanotransporter von einem magnetischen Feld geleitet an den Wirkort zu bringen.¹⁵¹⁻¹⁵³ Eine durch ein magnetisches Feld induzierte Wirkstofffreisetzung am Zielort ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung.¹⁵⁴

SPIOs oder SPIO-basierte Systeme haben insbesondere auch für die Kombination aus Therapie und Diagnose, die bereits erwähnte Theranostik, großes Potenzial.^{155, 156}

2.4.1 Synthese

Bei magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, die für biomedizinische Anwendungen hergestellt werden, handelt es sich in der Regel um ein Gemisch aus Magnetit Fe_3O_4 und seiner oxidierten Form, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Maghemit.

Magnetit ist schon sehr lange als magnetischer Werkstoff bekannt und gehört mit seiner inversen Spinellstruktur zu der Klasse der Ferrite.¹⁵⁷ In der Kristallstruktur liegen die Sauerstoffionen in kubisch dichtester Packung vor, während Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen die Oktaeder- und Tetraeder-Lücken dieser Packung besetzen. Die Tetraeder-

Lücken des A-Untergitters werden dabei durch Eisen(III)-Ionen besetzt, während die Oktaeder-Lücken des B-Untergitters statistisch von Eisen(III)- und Eisen(II)-Ionen besetzt sind. Die Kristallstruktur von Maghemit ist der von Magnetit sehr ähnlich. Hier liegen jedoch ausschließlich Eisen(III)-Ionen vor. Maghemit besitzt eine sogenannte *defekte Spinellstruktur* mit Kationenleerstellen in den Oktaeder-Lücken des Gitters aus Sauerstoffionen.

Sowohl bei Magnetit als auch bei Maghemit handelt es sich um ferrimagnetische Materialien. Die wichtigsten Methoden zur Synthese von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln sind die Co-Präzipitation, die thermische Zersetzung und die Templat-Synthese.

2.4.1.1 Co-Präzipitation

Die Co-Präzipitations-Methode ist das einfachste und schnellste unter den hier vorgestellten Verfahren. Hierbei werden relativ kleine Eisenoxid-Nanopartikel (ca. 2 nm bis 20 nm) durch Fällung von Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzen in basischem Medium erhalten.^{158, 159} Die resultierenden Partikel zeigen zumeist eine relativ breite Größenverteilung. Die wichtigsten Vorteile dieses Verfahrens liegen in der einfachen Reaktionsführung und der Ermöglichung großer Ansätze. Zusammensetzung, Größe und Form, und somit auch die magnetischen Eigenschaften der Partikel können durch Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke der Reaktionslösung, sowie die Art und Stöchiometrie der eingesetzten Eisen-Salze (Chloride, Nitrate, Sulfate, ...) und Basen beeinflusst werden. Ebenso kann der Einsatz verschiedener Stabilisatoren sowohl die Synthese als auch die späteren Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen stark beeinflussen.

2.4.1.2 Thermische Zersetzung

Das Verfahren der thermischen Zersetzung ermöglicht die Herstellung einheitlicher monodisperser Eisenoxid-Partikel mit kontrollierbarer Größe (zwischen 3 und 50 nm) und Form (z.B. Kugeln, Stäbchen, Würfel...)^{160, 161} Dazu wird ein organisches Vorläufermolekül (*precursor*) wie beispielsweise Eisenpentacarbonyl ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) oder Eisenacetylacetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) in Anwesenheit eines Stabilisators in hochsiedenden Lösungsmitteln zersetzt. Als klassischer Stabilisator wird Ölsäure verwendet – es finden aber auch andere langkettige Fettsäuren, Amine oder Thiole Anwendung. Die thermische Zersetzung wird bei Temperaturen von ca. 100 bis 300 °C durchgeführt und ist daher sehr

energieintensiv. Synthesebedingt sind die resultierenden Partikel generell hydrophob und müssen für eine Anwendbarkeit in biomedizinischem Kontext beispielsweise durch Liganden-Austausch zunächst hydrophil stabilisiert werden.

2.4.1.3 Templat-Synthese

Eisenoxid-Nanopartikel können auch mit Hilfe von Mikroemulsionen in einem begrenzten Raum größenkontrolliert hergestellt werden. Dieses Verfahren wurde erstmals von Inouye et al. 1982 zur Eisenoxid-Nanopartikel-Synthese beschrieben.¹⁶² Die Herstellung von Metalloxiden erfolgt zumeist in inversen Emulsionen (Wasser-in-Öl). Als Templat dienen dabei mizellare Strukturen, die aus Tensiden wie z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Natriumdodecylbenzolsulfonat (SDBS) oder Triton-X 100 gebildet werden. Die Größe der Mizellen als Reaktionsräume und damit die Größe der Partikel kann über die Wahl der Lösungsmittel, der Tenside sowie deren stöchiometrische Zusammensetzung kontrolliert werden. Problematisch ist jedoch die großtechnische Anwendung dieses Verfahrens, da die Ausbeuten relativ gering sind und gleichzeitig viel Lösungsmittel verbraucht wird.

2.4.2 Physikalische Eigenschaften von Eisenoxid-Nanopartikeln

2.4.2.1 Grundlagen des Magnetismus

Die magnetische Induktion oder Flussdichte B , die magnetische Feldstärke H sowie die Magnetisierung M sind die drei Grundfelder des Magnetismus.¹⁶³ Als Einheit für B dient das Tesla (T), während H und M in Am^{-1} angegeben werden. Im materiefreien Raum wird der Zusammenhang von B und H über die magnetische Feldkonstante μ_0 hergestellt:

$$B = \mu_0 H \quad \text{Gl. 2.1}$$

mit $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ TmA}^{-1}$ (Permeabilität des Vakuums)

Die dritte Feldgröße, die Magnetisierung M , dient der Beschreibung materiegefüllter Felder. Der Zusammenhang ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$B = \mu_0(H + M) \quad \text{Gl. 2.2}$$

Zwischen der magnetischen Feldstärke H und der induzierten Magnetisierung M besteht für die meisten Materialien (Diamagnete und Paramagnete) ein linearer Zusammenhang:

$$M = \chi H \quad \text{Gl. 2.3}$$

mit χ magnetische Suszeptibilität (dimensionslose Proportionalitätskonstante)

Die Suszeptibilität χ beschreibt die Reaktion der Magnetisierung auf ein angelegtes Magnetfeld und kann damit zur Klassifizierung verschiedener magnetischer Materialien genutzt werden:

- Diamagnetische Materialien, welche im Allgemeinen Stoffe sind, deren Atome, Ionen oder Moleküle abgeschlossene Schalen und Unterschalen haben, zeigen eine negative Suszeptibilität, deren Wert für die meisten Festkörper in der Größenordnung -10^{-5} bis -10^{-4} liegt.
- Paramagnetische Materialien aus Atomen, Ionen oder Molekülen, in denen ungepaarte Elektronen vorhanden sind, zeichnen sich durch eine positive Suszeptibilität aus, welche in der Größenordnung von $+10^{-5}$ bis $+10^{-3}$ liegt.

- Ferromagnetische Materialien weisen eine deutlich höhere Suszeptibilität in der Größenordnung von $+10^4$ bis $+10^5$ auf. Hierzu sei angemerkt, dass bei ferromagnetischen Materialien kein linearer Zusammenhang zwischen M und H gilt, da diese bei ausreichend hohen Feldstärken in magnetische Sättigung geraten. Zudem weisen Ferromagnete eine Hysterese auf, so dass M keine eindeutige Funktion von H ist.

Experimentell ergibt sich das magnetische Moment m einer Probe als Betrag der Magnetisierung M integriert über das Volumen der Probe. Für eine Probe mit bekannter Masse und Dichte ergibt sich dadurch für m die Einheit Am^2 .

Bei paramagnetischen Materialien zeigen die einzelnen Spins untereinander keine Wechselwirkung. In Abwesenheit eines äußeren magnetischen Feldes sind die Richtungen der magnetischen Momente statistisch verteilt. Sie zeigen daher keine spontane Magnetisierung. Im Gegensatz dazu kommt es bei ferromagnetischen Materialien zu weitreichenden Spin-Spin-Wechselwirkungen, so dass sich ein kooperativer oder kollektiver Magnetismus ergibt, der für eine von Null verschiedene spontane Magnetisierung des Materials sorgt. Diese Magnetisierung ist von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur nimmt der Einfluss thermischer Fluktuationen zu und damit der Wert der spontanen Magnetisierung ab. Bei Temperaturen unterhalb einer charakteristischen Temperatur, der sogenannten *Curie-Temperatur* T_C , weisen ferromagnetische Materialien Domänen mit jeweils homogener Magnetisierung auf. Diese werden nach dem französischen Physiker Pierre Weiss auch *Weiss'sche Bezirke* genannt.

Neben einer parallelen Ausrichtung der Spins innerhalb von Domänen ferromagnetischer Materialien können auch andere Spinordnungen vorkommen, wie z.B. eine antiparallele Spin-Ausrichtung bei antiferromagnetischen Materialien (Abb. 2.16). Bei ferrimagnetischen Materialien liegt unterhalb der Curie-Temperatur eine antiparallele Kopplung verschieden großer Spinmomente innerhalb eines Weiss'schen Bereichs vor.

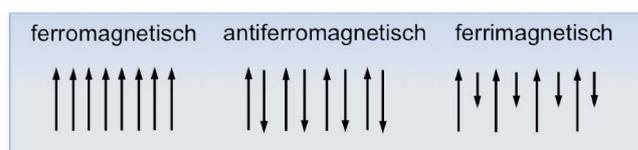


Abb. 2.16: Schematische Darstellung verschiedener Spin-Orientierungen

2.4.2.2 Superparamagnetismus

Größere Partikel aus ferro- bzw. ferrimagnetischen Materialien liegen im Allgemeinen als Mehrdomänenteilchen vor. Wird eine kritische Größe unterschritten, welche der Dimension eines einzelnen Weiss'schen Bezirks entspricht, sind alle Elektronenspins innerhalb des Partikels einheitlich ausgerichtet und es handelt sich um Eindomänenpartikel (Abb. 2.17). Diese kritische Partikelgröße ist materialabhängig und liegt typischerweise im Größenbereich von einigen 10 nm.¹⁶⁴

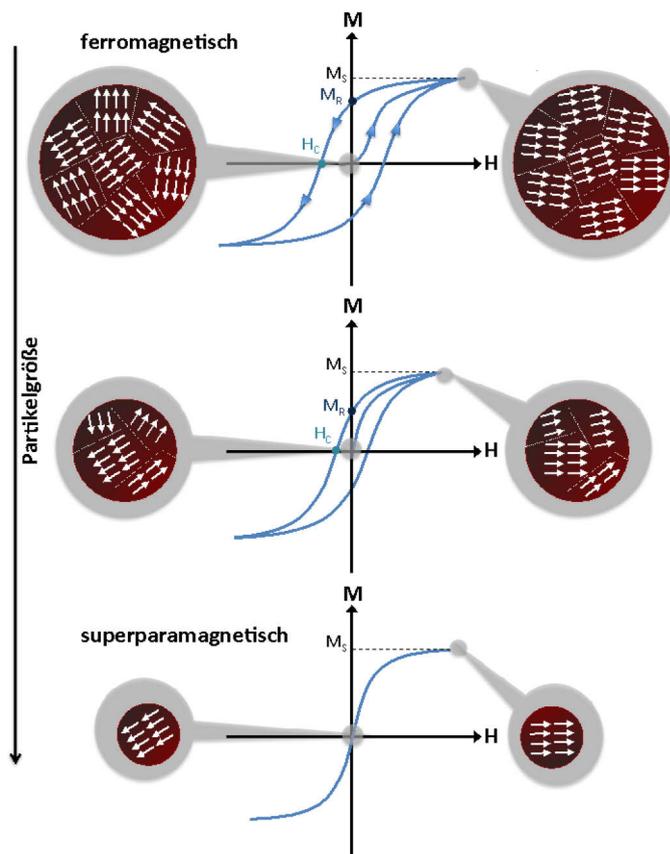


Abb. 2.17: Der Übergang von ferromagnetischem und superparamagnetischem Verhalten in Abhängigkeit von der Partikelgröße (in Anlehnung an Cademartiri et al. 2009)¹⁶⁵: Ferro- und ferrimagnetische Materialien zeigen eine Hysterese-Kurve. Wird ein Magnetfeld mit der Feldstärke H angelegt, richten sich die magnetischen Momente der Weiss'schen Bezirke danach aus. Die Magnetisierung M wächst solange mit der Feldstärke, bis die Spin-Ausrichtung maximal und die Sättigungsmagnetisierung M_S erreicht ist. Wird nun die Feldstärke wieder verringert, verbleibt eine Remanenz M_R , da die Weiss'schen Domänen nicht vollständig in die ursprüngliche Orientierung zurückkehren. Erst wenn ein Feld $-H_C$ (Koerzitivfeldstärke) umgekehrter Richtung angelegt wird, kann das Material wieder vollständig entmagnetisiert werden. Werkstoffe mit einer großen remanenten Magnetisierung und großer Koerzitivfeldstärke werden „magnetisch hart“ genannt. Verringert sich die Partikelgröße eines ferro- oder ferrimagnetischen Materials bis hin zur Dimension kleiner einer einzelnen Weiss'schen Domäne, wandelt sich die Magnetisierungskurve dieses Partikels und das Material zeigt superparamagnetisches Verhalten. Die Magnetisierungskurve ist völlig reversibel, zeigt keine Hysterese und damit auch weder eine Koerzitivfeldstärke H_C noch eine remanente Magnetisierung M_R . Erst wenn bei Abkühlung einer superparamagnetischen Probe die Blocking-Temperatur T_B unterschritten wird, kehrt das ferro- bzw. ferrimagnetische Verhalten des Materials zurück.

Auf Grund der magnetischen Anisotropie orientieren sich die magnetischen Momente bevorzugt in eine bestimmte Richtung (lokales Energieminimum). Daher können auch Eindomänenpartikel eine remanente Magnetisierung zeigen.¹⁶⁶ Sind die Partikel ausreichend klein, können die magnetischen Momente thermisch induziert die Energiebarriere (Anisotropieenergie) überwinden und es kommt zu einer spontanen Umkehr der Magnetisierung des Teilchens. Dieses Phänomen wird als superparamagnetische Relaxation bezeichnet. Die entsprechende Zeitkonstante wird Néel'sche Relaxationszeit τ_N genannt und ist wie folgt definiert:¹⁶⁷

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV_c}{k_B T}\right) \quad \text{mit } \tau_0 \sim 10^{-9} \text{ s} \quad \text{Gl. 2.4}$$

V_c : Volumen des magnetischen Korns

K : Anisotropiekonstante des Materials (Anisotropieenergie $A_E = KV_c$)

k_B : Boltzmannkonstante

T : Absolute Temperatur

Liegen die Partikel suspendiert in einem flüssigen Medium vor, kann die Neuorientierung der magnetischen Momente auch durch rotatorische Diffusion der Partikel erfolgen. Die entsprechende Zeitkonstante dieses Mechanismus wird Brown'sche Relaxationszeit τ_B genannt. Sie hängt von den hydrodynamischen Eigenschaften der Partikel ab und ist in folgendem Zusammenhang dargestellt:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_h}{k_B T} \quad \text{Gl. 2.5}$$

η : Dynamische Viskosität des Mediums

V_h : Hydrodynamisches Volumen

In flüssiger Phase konkurrieren beide Mechanismen miteinander, wobei der schnellere Prozess dominiert (Abb. 2.18).¹⁶⁷ Die effektive Zeitkonstante τ_{eff} setzt sich wie folgt aus τ_N und τ_B zusammen:

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad \text{Gl. 2.6}$$

Die Relaxationszeiten sind nach Gl. 2.4 und Gl. 2.5 in unterschiedlicher Weise von der Partikelgröße abhängig. Die Néel'sche Relaxationszeit τ_N wächst auf Grund der Exponentialfunktion sehr stark mit dem Partikelvolumen, so dass für große Partikel der Magnetisierungsvektor nahezu geblockt ist und der Brown'sche Mechanismus dominiert.

Für kleine Partikel ist der Magnetisierungsvektor so beweglich, dass Superparamagnetismus nach Néel sogar für immobilisierte Partikel gegeben ist.¹⁶⁷

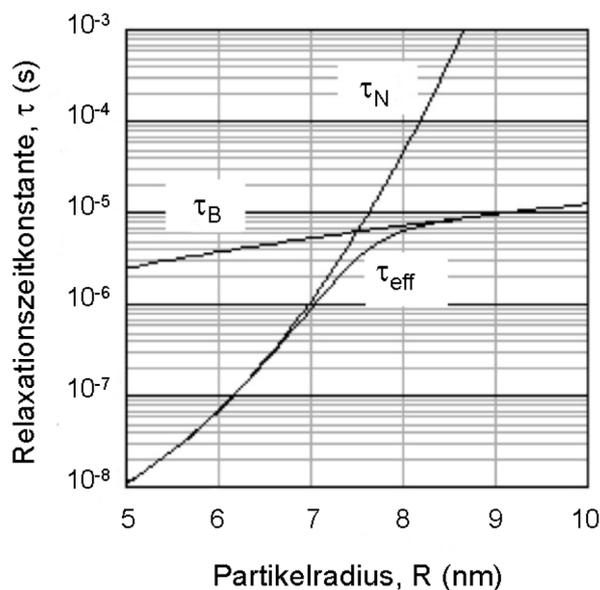


Abb. 2.18: Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Partikelgröße für Magnetit-Nanopartikel.¹⁶⁷

Superparamagnetische Teilchen verhalten sich also wie paramagnetische Materialien in Abwesenheit eines magnetischen Feldes, zeigen jedoch eine deutlich höhere Suszeptibilität. Die Magnetisierungskurve weist im Vergleich zu ferromagnetischen Materialien keine Hysterese auf. Die Magnetisierung ist somit vollständig reversibel und es bleibt keine Remanenz wie bei einem Ferromagneten zurück. Sinkt die Temperatur unter einen kritischen Wert, die sogenannte *Blocking-Temperatur*, ist die thermische Energie zu gering, um eine Änderung der Magnetisierungsrichtung der Partikel zu induzieren und es kommt wieder zu ferromagnetischem Verhalten.

2.4.3 Hyperthermie

Die Hyperthermie, eine künstlich erzeugte Überwärmung des Körpers oder lokal begrenzter Körperregionen, findet in der Krebstherapie als Alternative oder zur Unterstützung von Chemo- oder Strahlentherapie Anwendung. Die Erwärmung kann durch Mikrowellen, Radiowellen, Ultraschallwellen oder Infrarotstrahlen bewirkt werden.

Manche Körperbereiche wie beispielsweise das Gehirn sind mit konventionellen Hyperthermie-Geräten schlecht zugänglich, so dass eine exakte Wärmedosierung lokalisiert in diesem Körperbereich äußerst schwierig ist. Diese Problematik wird bei der sogenannten *Magnet-Fluid-Hyperthermie* thematisiert. Hierbei wird die Wärme mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln in einem hochfrequenten alternierenden Magnetfeld erzeugt. Erste experimentelle Untersuchungen zur Anwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln zur Hyperthermie-Behandlung wurden bereits in den 1950er Jahren durchgeführt.¹⁶⁸ Wie bereits erwähnt, wurde jedoch erst kürzlich das erste Eisenoxid-basierende Magnet-Fluid zur Hyperthermie-Behandlung bösartiger Hirntumoren in Europa zugelassen.¹⁶⁹ Die Eisenoxid-Nanopartikel müssen hierbei direkt in das Tumorgewebe injiziert werden, um die erforderliche lokale Konzentration der Partikel am Wirkort zu erreichen.

Der Mechanismus der Wärmeentwicklung unterscheidet sich für ferro- oder ferrimagnetische Partikel (FM) und superparamagnetische Partikel (SPM). Im alternierenden magnetischen Feld kommt es für erstgenannte durch die ständige Änderung der Magnetisierungsrichtung zur Reibung an den Domänenwänden und damit zu einem Hystereseverlust.¹⁷⁰ Für die Wärmefreisetzung bzw. Hysterese-Verlustleistung P_{FM} gilt:¹⁷¹

$$P_{FM} = \mu_0 f \oint H dM. \quad \text{Gl. 2.7}$$

f : Frequenz des magnetischen Wechselfelds

Die physikalische Beschreibung des Verhaltens superparamagnetischer Nanopartikel im hochfrequenten Wechselfeld basiert auf dem sogenannten *Debye-Modell*.¹⁷² Bei einer hohen Frequenz kann die Magnetisierung der superparamagnetischen Partikel dem angelegten Feld nicht mehr folgen, die Antwort der Magnetisierung kann dann als komplexe Suszeptibilität beschrieben werden:

$$\chi = \chi' + i\chi'' \quad \text{Gl. 2.8}$$

Der Imaginärteil $i\chi''$ ist frequenzabhängig und steht mit den Relaxationsprozessen (nach Néel und Brown) in Zusammenhang.¹⁷³ Die Wärmegenerierung bzw. Verlustleistung superparamagnetischer Partikel kann wie folgt ausgedrückt werden:¹⁷¹

$$P_{SPM} = \mu_0 \pi \chi''(f) H^2 f \quad \text{Gl. 2.9}$$

Um unterschiedliche Proben vergleichen zu können, wird im Allgemeinen die sogenannte *spezifische Absorptionsrate (SAR)* in W/g angegeben. Die spezifische Absorptionsrate ergibt sich durch Division der Verlustleistung P_{FM} bzw. P_{SPM} durch die Massedichte des magnetischen Materials.¹⁷¹ Im Vergleich erfordern superparamagnetische Partikel im Allgemeinen geringere Feldstärken als es für ferromagnetische Partikel der Fall ist. So können beispielsweise bei einer Feldstärke von 10 kAm^{-1} mit einer Frequenz von 400 – 500 kHz für viele kommerziell erhältliche Ferrofluide bereits SAR-Werte von ca. 40 – 100 W/g erreicht werden.¹⁷⁴ Für bakterielle Magnetosome wurden sogar SAR-Werte von fast 1000 W/g gemessen.¹⁷⁵ Um die spezifische Absorptionsrate experimentell zu bestimmen, wird die initiale Temperaturerhöhung einer Nanopartikelsuspension mit einer bekannten Konzentration in einem alternierenden magnetischen Feld gemessen. Die entsprechende Absorptionsrate bei gegebener Feldstärke und Frequenz kann wie folgt berechnet werden:¹⁷⁶

$$SAR = \frac{m_{Probe}}{m_{Eisenoxid}} \times C_m \times \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Gl. 2.10}$$

m_{Probe} : Masse der Probe

$m_{Eisenoxid}$: Masse des Eisenoxids in der Probe

C_m : Wärmekapazität der Suspension (für geringe Eisenoxidkonzentrationen wird typischerweise die Wärmekapazität des Suspensionsmediums angenommen)

$\frac{\Delta T}{\Delta t}$: Anfangssteigung der zeitabhängigen Heizkurve

Mit Hilfe der spezifischen Absorptionsrate des Ferrofluids kann die benötigte Konzentration an magnetischem Material im Tumorgewebe abgeschätzt werden. Unter Annahme, dass es sich um einen kugelförmigen Tumor mit dem Radius r handelt und eine homologe Verteilung der magnetischen Nanopartikel im Tumolvolumen vorliegt, gilt vereinfacht nach Andrä et. al 1999:^{177, 178}

$$SAR = \frac{\Delta T \cdot 3 \lambda}{r^2 c} \quad \text{Gl. 2.11}$$

ΔT : Temperaturerhöhung im Tumor

λ : Thermische Leitfähigkeit des umgebenden Gewebes

r : Radius des Tumors

c : Konzentration der magnetischen Nanopartikel (Masse pro Tumolvolumen)

Um eine Temperaturerhöhung um 6 K (von 37 °C auf 43 °C) zu erzielen, würde damit beispielsweise für Partikel mit einer SAR von ca. 100 W/g bei einem Tumordurchmesser von 5 mm mit angenommener thermischer Leitfähigkeit des Tumors und des umgebenden Gewebes von $0,64 \text{ W}/(\text{K}\cdot\text{m})$ ¹⁷⁷ eine Partikelkonzentration von ca. $18 \text{ mg}/\text{cm}^3$ benötigt. In der Phase-I-Studie der Magnetfluid-Hyperthermie bei Glioblastom (bösartiger Hirntumor) (*MagForce Nanotechnologies AG, Berlin*) wurden ähnliche Konzentrationen angewendet. Bei einem medianen behandelten Tumolvolumen von 12,1 mL wurden im Mittel fünf Punktionen intratumoral appliziert mit einer medianen Dosierung von 0,2 mL Magnetfluid (112 mg/mL, Eisenoxidkerne mit Durchmessern von ca. 15 nm) pro mL Tumolvolumen (entspricht $22,4 \text{ mg}/\text{cm}^3$).¹⁷⁹

2.4.4 Magnetresonanztomographie (MRT)

Magnetresonanztomographie ist eine weitverbreitete Technik, die vielseitig in der medizinischen Diagnostik Anwendung findet. Dieses bildgebende Verfahren ermöglicht eine detaillierte Visualisierung des Körperinneren ohne den Einsatz von ionisierender Strahlung. Die MRT kann Informationen über Struktur, Funktion und Status von biologischen Geweben im lebenden Organismus liefern.

Das Prinzip der Magnetresonanztomographie basiert physikalisch auf dem Phänomen der kernmagnetischen Resonanz (NMR nuclear magnetic resonance). In der medizinischen Bildgebung wird im Allgemeinen die Kernspinresonanz des ^1H Wasserstoffkerns angeregt. Die kernmagnetische Resonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld. Hierbei wird durch Anlegen eines statischen Magnetfeldes B_0 eine Aufspaltung der Energieniveaus der Kernspins in mehrere Zustände (Kern-Zeeman-Niveaus) induziert. Betrachtet man Wasserstoffkerne mit Spin $\frac{1}{2}$ dann resultieren zwei mögliche Zustände: parallel ($\uparrow m = +\frac{1}{2}$) und antiparallel ($\downarrow m = -\frac{1}{2}$). Zwischen den magnetisch aufgespaltenen Energiezuständen sind Übergänge möglich, wenn eine Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung (Radiowellen) mit passender Frequenz besteht.

Die Proportionalität zwischen Eigendrehimpuls (Kern-Spin \vec{J}) und magnetischem Moment $\vec{\mu}$ eines Kerns wird über eine kernspezifische Konstante, das sogenannte *gyromagnetische Verhältnis* γ ausgedrückt.

$$\vec{M} = \gamma \vec{J}$$

Gl. 2.12

Die Energiedifferenz der zuvor erwähnten Zustände ergibt sich aus der Formel für einen magnetischen Dipol in einem homogenen Magnetfeld der Stärke B_0 :

$$E = -m\gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \text{ und } E = +m\gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \rightarrow \Delta E = \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \quad \text{Gl. 2.13}$$

\hbar : Plancksches Wirkungsquantum

Das magnetische Moment eines Kerns rotiert um die Richtung des Feldes B_0 , deren Frequenz als Larmor-Frequenz ω_0 bezeichnet wird. Sie ist abhängig von der Stärke des Feldes sowie vom gyromagnetischen Verhältnis:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad \text{Gl. 2.14}$$

Entspricht die Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Welle nach $E = h\nu$ der Resonanzfrequenz des Kerns mit $h\nu = \hbar\omega = \frac{\hbar}{2\pi}\omega$ und damit der Übergangsfrequenz zwischen den Energieniveaus so gilt die Resonanzbedingung:

$$h\nu = \frac{\hbar}{2\pi}\omega = \Delta E = \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \quad \text{Gl. 2.15}$$

Bei der Magnetresonanz wird also durch das Anlegen eines Magnetfeldes eine Aufspaltung der Kernspins in unterschiedliche Energieniveaus erzielt. Die Kernspins der Moleküle orientieren sich unabhängig voneinander parallel oder antiparallel zum vorhandenen Magnetfeld. Für Kerne mit dem Spin $\frac{1}{2}$ ist das Besetzungsverhältnis, also die Anzahl der Kerne, die sich parallel bzw. antiparallel zum Feld ausrichten im thermischen Gleichgewicht nach der Boltzmann-Verteilung gegeben:

$$\frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}\right) \quad \text{Gl. 2.16}$$

Die Energieunterschiede der beiden Energieniveaus liegen unterhalb der Größenordnung der thermischen Bewegung ($k_B T$). Dennoch ergibt sich eine makroskopische Magnetisierung M_0 entlang der Achse des Hauptfeldes (z -Achse $\rightarrow M_0 = M_z$) (Abb. 2.19).

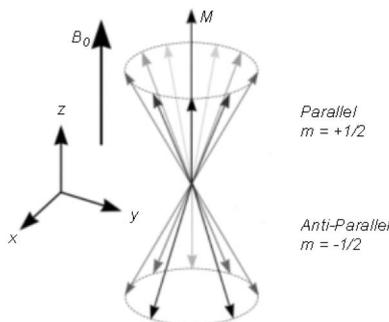


Abb. 2.19: z-Magnetisierung im thermodynamischen Gleichgewicht

Dieses System kann nun durch einen Radiowellenpuls, dessen Frequenz der Larmorfrequenz ω_0 entspricht, resonant angeregt werden, so dass der Vektor der Nettomagnetisierung aus der z-Richtung in die x-y-Ebene kippt (Abb. 2.20). Nach diesem kurzen Puls befindet sich der Zustand der Magnetisierung in einem Nicht-Gleichgewichtszustand, aus welchem das System nach kurzer Zeit wieder ins thermodynamische Gleichgewicht zurückgelangt. Es werden die longitudinale Relaxationszeit T_1 (Magnetisierung der Kerne wird in Feldrichtung geändert) bzw. die transversale Relaxationszeit T_2 der Magnetisierung unterschieden. Dabei sind die Ursachen der Relaxation verschiedene zeitabhängige Wechselwirkungen zwischen dem Spin und seiner Umgebung (T_1 Spin-Gitter) bzw. den Spins untereinander (T_2 Spin-Spin).

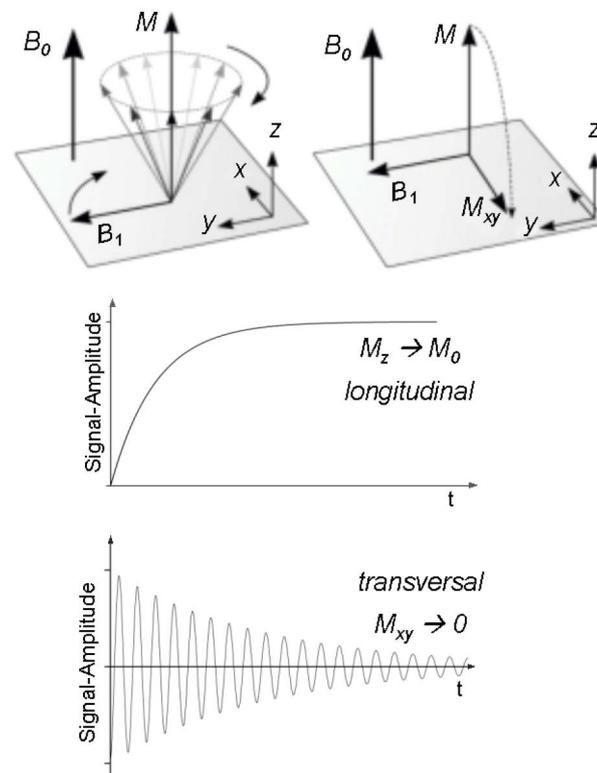


Abb. 2.20: Longitudinale und transversale Relaxation der Nettomagnetisierung M einer großen Anzahl an Protonen im Magnetfeld B_0 nach einem Resonanzfrequenzpuls B_1 . Durch den 90° -Radiowellenpuls, dessen Frequenz der Larmorfrequenz ω_0 entspricht, wird resonant angeregt und der Vektor der Nettomagnetisierung kippt aus der z-Richtung in die x-y-Ebene (oberes Bild). Die longitudinale Relaxation bzw. die Wiederherstellung der Längsmagnetisierung erfolgt, indem absorbierte Energie an die Umgebung (Gitter) abgegeben wird (Spin-Gitter-Relaxation) (mittleres Bild). Bei der transversalen Relaxation verliert die Quermagnetisierung an Intensität, da die Phasenkohärenz abnimmt. Die einzelnen Kernspins präzedieren also nicht mehr in Phase, sondern z.T. schneller oder langsamer und es kommt zu einem Auseinanderlaufen der Spin-Phasen. Es wird eine abfallende Schwingung, ein sogenannter *freier Induktionsabfall* (engl. *free induction decay* FID) beobachtet (unteres Bild).

MRT-Kontrastmittel

In der Magnetresonanztomographie werden die NMR-Signale der ^1H Wasserstoffkerne orts aufgelöst ausgewertet und Schnittbilder erzeugt. Kontrastmittel werden eingesetzt, um eine deutlichere Abgrenzung von ähnlichen Körpergeweben (wie z.B. Muskeln und Blutgefäße) zu erreichen oder erkranktes Gewebe bzw. Funktionsstörungen (z.B. bei der Bluthirnschranke) zu detektieren. Allgemein werden Positivkontrastmittel mit einer signalverstärkenden (aufhellenden) Wirkung und Negativkontrastmittel mit einem signalmindernden Effekt unterschieden. Positivkontrastmittel wie beispielsweise Gadolinium-haltige Verbindungen besitzen die Eigenschaft die T_1 -Relaxationszeit ihres umgebenden Mediums zu verkürzen, während Eisenoxid-Nanopartikel durch ihre T_2 -verkürzende Wirkung im Allgemeinen als Negativkontrastmittel dienen. Die Relaxivitätsrate eines Kontrastmittels $r_{1,2} = 1/T_{1,2}$ bezogen auf den Eisengehalt der Probe ergibt die Relaxivität R_1 bzw. R_2 (üblicherweise angegeben in $\text{mmol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$) und erlaubt damit eine vergleichende Bewertung der Kontrastmittel.¹⁴⁸ Die T_2 -verkürzende Wirkung von Eisenoxid-Nanopartikel-basierenden Kontrastmitteln beruht auf der Diffusion von Wassermolekülen in das inhomogene Magnetfeld in unmittelbarer Umgebung des Partikels und steht mit der Kristall-Anisotropie und mit der Néel-Relaxation in Zusammenhang.¹⁸⁰ Für den Einsatz in der Medizin ist neben den Kontrasteigenschaften auch das Biodistributionsprofil des Kontrastmittels von entscheidender Bedeutung. So sind beispielsweise Gadolinium-haltige Kontrastmittel entwickelt worden, welche sehr schnell (bereits nach wenigen Stunden) aus dem Blutkreislauf eliminiert werden, um Langzeittoxizität zu verhindern. Eisenoxid-haltige Kontrastmittel besitzen eine deutlich geringere Toxizität. Die Biodistribution ist stark von der Partikelgröße und Oberflächenbeschichtung abhängig. Eisenoxid-basierte Kontrastmittel werden im Allgemeinen für die Magnet-Resonanztomographie von Leber und Milz eingesetzt, da sie dort bevorzugt akkumulieren.¹⁴⁸

2.4.5 Magnetic Particle Imaging (MPI)

Magnetic Particle Imaging (MPI) ist eine relativ neue tomographische Methode, die 2005 von Gleich und Weizenecker erstmals vorgestellt wurde.¹⁸¹ Dieses bildgebende Verfahren basiert - wie der Name impliziert - auf magnetischen Partikeln und zeichnet sich durch eine sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung gepaart mit sehr hoher Empfindlichkeit aus. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode wurde bereits 2009 am Mausmodell

demonstriert. Dabei wurden nach einer Bolus-Injektion von $10 \mu\text{mol}(\text{Fe}) \text{kg}^{-1}$ 3D-*In-Vivo*-Aufnahmen vom schlagenden Mäuseherz gezeigt.¹⁸² Diese neue Bildgebungsmethode soll künftig auch beim Menschen beispielsweise in der Diagnostik zur Darstellung von kleinsten Blutgefäßen oder zur Verfolgung von markierten Wirkstoffträgersystemen eingesetzt werden. Gegenüber komplementären Verfahren (z.B. CT, PET, SPECT) würden Patienten bei einer MPI-Untersuchung nicht mit gefährlicher Strahlung belastet. Auch sind die Kontrastmittel aus Eisenoxid-Nanopartikeln ungefährlich, da sie nach der Untersuchung von der Leber abgebaut werden können.

Das Messprinzip beruht auf der nicht-linearen Magnetisierung von superparamagnetischen Nanopartikeln (SPIO) (Abb. 1.21).¹⁸¹ Das Verfahren nutzt hierbei zwei überlagernde Magnetfelder, zum einen ein statisches Selektionsfeld und zum anderen ein dynamisches Wechselfeld.

Werden magnetische Nanopartikel in das dynamische, sinusoidale Wechselmagnetfeld gebracht, führt dies zu einer messbaren Änderung ihrer Magnetisierung (Abb. 2.21). Das gemessene Signal enthält auf Grund des nicht-linearen Magnetisierungsverhaltens neben der Grundfrequenz f_0 des Wechselfeldes auch höhere Harmonische (also ganzzahlige Vielfache von f_0), welche als Frequenzspektrum sichtbar werden. Die Konzentration der Nanopartikel kann nach Separation der Harmonischen von der Grundfrequenz ermittelt werden, da die Signalstärke der Harmonischen sich in ausreichender Näherung linear zur Partikelkonzentration verhält. Das statische Selektionsfeld ermöglicht durch die Erzeugung eines feldfreien Punktes (FFP) eine örtliche Kodierung. Befindet sich magnetisches Material in der Position des feldfreien Punktes, so wird ein Signal generiert, das höhere Harmonische enthält. Nur magnetische Partikel im FFP antworten auf das Wechselfeld, alle anderen Partikel außerhalb des FFP verbleiben in magnetischer Sättigung.

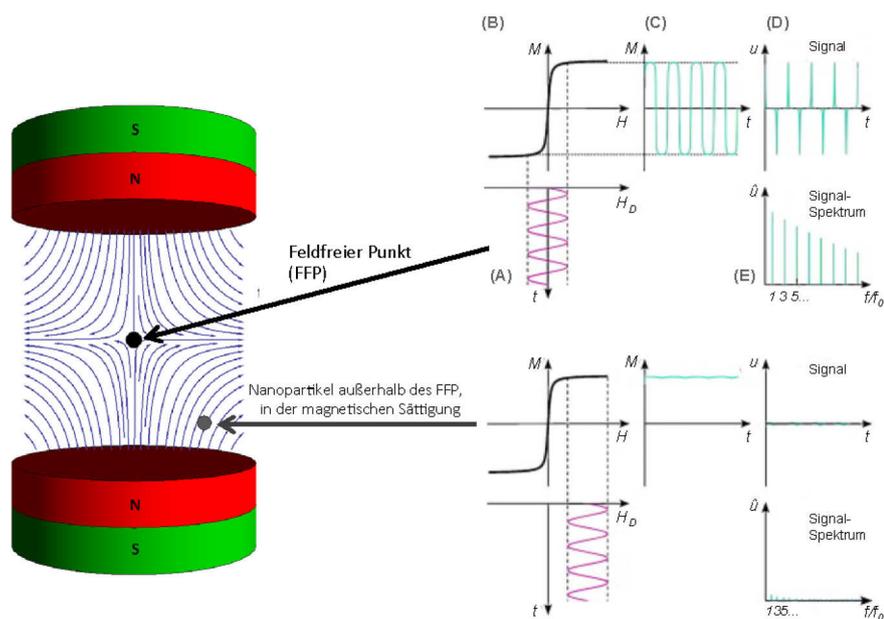


Abb. 2.21: Prinzip des Magnetic Particle Imaging (MPI):¹⁸¹ Befinden sich magnetische Nanopartikel in einem oszillierenden magnetischen Feld mit der Anregungsfrequenz f_0 (A), so wird eine charakteristische Magnetisierungsänderung (C) erzeugt. Auf Grund des nicht-linearen Magnetisierungsverhaltens (B) der magnetischen Nanopartikel enthält das gemessene Signal $u(t)$ (D) neben der Anregungsfrequenz auch höhere Harmonische welche durch einer Fourier-Transformation im Signalspektrum sichtbar werden (E). Nanopartikel außerhalb des feldfreien Punktes (im sog. Selektionsfeld) befinden sich in einem Zustand der magnetischen Sättigung und antworten daher nicht auf das oszillierende Feld. Um ein tomographisches Bild zu erzeugen, wird die Zielregion gescannt, indem der feldfreie Punkt mit Hilfe zusätzlicher Felder durch das entsprechende Volumen bewegt wird.

Magnetic Particle Imaging ermöglicht somit die lokale Konzentration von magnetischen Nanopartikeln quantitativ, mit hoher Empfindlichkeit und sehr guter räumlicher Auflösung (< 1 mm) in Echtzeit darzustellen.^{181, 182} Der große Vorteil des MPI, magnetische Partikel ohne störende Hintergrundsignale darstellen zu können, führt aber gleichzeitig auch zum Verlust von anatomischen Informationen. Daher ist eine Kombination mit einem anderen Bildgebungsverfahren wie beispielsweise MRT vorteilhaft. Der instrumentelle Aufbau eines *Hybrid MPI-MRI Imaging Systems* wurde 2013 von *Bruker BioSpin MRI GmbH* beim IWMPI in Berkley, USA, präsentiert.

Zur Charakterisierung von magnetischen Partikeln für die Anwendung als MPI-Tracer kann die *Magnetic Particle Spectrometry* (MPS) genutzt werden.¹⁸³ Dabei wird die zeitabhängige Antwort der Partikel auf ein oszillierendes Magnetfeld gemessen, jedoch ohne das Gradienten-Feld, das für die örtliche Auflösung notwendig wäre. Es handelt sich daher im Grunde um ein null-dimensionales MPI-Gerät.

Die Bildqualität im MPI wird entscheidend von den Partikeleigenschaften (Kerndurchmesser, Größenverteilung) beeinflusst. Das magnetische Moment steigt mit dem Kerndurchmesser, wodurch eine höhere Auflösung und bessere Sensitivität erreicht werden kann.¹⁸⁴ Gleichzeitig wächst mit steigender Größe die Trägheit des Kerns, so dass eine rechtzeitige Relaxation nicht mehr gegeben ist.¹⁸⁵ Optimierte Eisenoxid-basierte MPI-Partikel müssten theoretischen Berechnungen zufolge einen Kerndurchmesser von ca. 30 – 60 nm aufweisen.^{186, 187}

Generell können für das MPI-Verfahren die gleichen Eisenoxid-Nanopartikel eingesetzt werden, welche in der MRT bereits Anwendung finden. Problematisch ist jedoch die breite Größenverteilung dieser Tracer und damit verbunden der geringe Anteil an Partikeln, welcher für MPI ausreichend Signal bietet.

3 Charakterisierungsmethoden

3.1 Lichtstreuung

Die Lichtstreuung ist eine Ensemblemethode, mit deren Hilfe nano-skalige Partikel in Lösung zerstörungsfrei charakterisiert werden können. Der generelle Aufbau einer Lichtstreuapparatur ist in Abb. 3.1 dargestellt.

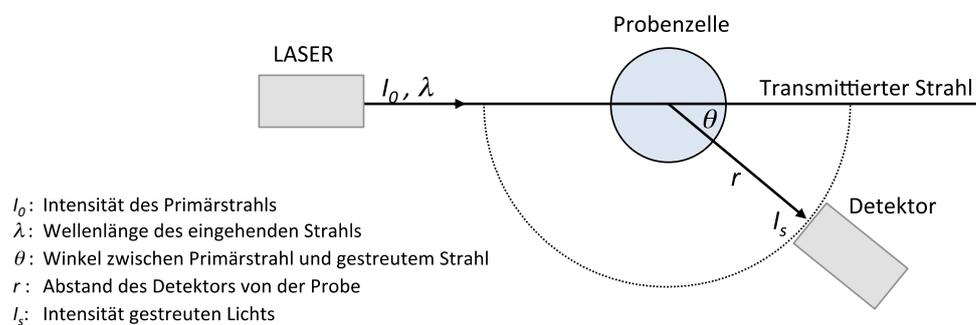


Abb. 3.1: Aufbau einer Lichtstreuapparatur

Mit Hilfe der statischen Lichtstreuung, bei der die zeitlich gemittelte, winkelabhängige Streuintensität gemessen wird, können Informationen erhalten werden über:

- die molare Masse M (Gewichtsmittel der Molmasse) der Partikel,
- den Trägheitsradius R_g , der das Volumenintegral über die Masseverteilung darstellt (als Zentrifugemittel (z-Mittel) des Trägheitsradienquadrats),
- den zweiten Virialkoeffizient A_2 des osmotischen Drucks, als Maß für Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungen.

Bei der dynamischen Lichtstreuung werden die zeitlichen Intensitätsfluktuationen der Streuintensität gemessen, indirekt also die Brown'sche Molekularbewegung der Teilchen beobachtet. Über die Stokes-Einstein-Beziehung kann dann über den Diffusionskoeffizienten der hydrodynamische Radius ermittelt werden.

Die Methode der Lichtstreuung beruht auf dem Phänomen der Rayleigh-Streuung, die nach John William Strutt, 3. Baron Rayleigh, benannt wurde. Trifft eine

elektromagnetische Welle auf ein Teilchen, so wird an dieser Stelle ein oszillierender Dipol (Hertz'scher Dipol) erzeugt. Von diesem Streuzentrum ausgehend breiten sich dann emittierte elektromagnetische Wellen kreisförmig in alle Richtungen von dem Partikel aus. Diese Streuung des einfallenden Lichts wird Rayleigh-Streuung genannt und ist für Gasmoleküle wie folgt definiert:

$$I = \frac{I_s}{I_0} = \frac{1}{r^2} \frac{16\pi^4}{\lambda_0^4} \alpha^2 N (1 + \cos^2 \theta) \quad \text{Gl. 3.1}$$

I_s : Intensität des gestreuten Lichts

I_0 : Intensität des Primärstrahls

r : Abstand des Detektors von der Probe

λ_0 : Wellenlänge des eingehenden Strahls im Vakuum

α : Polarisierbarkeit des Streuzentrums

N : Anzahl der Streuzentren

θ : Winkel zwischen Primärstrahl und gestreutem Strahl

Die Rayleigh Streuung ist stark von der Wellenlänge abhängig ($I \sim 1/\lambda^4$), wobei Licht kürzerer Wellenlänge deutlich stärker gestreut wird als längerwelliges Licht. Dies ist der Grund, warum der Himmel blau erscheint.

3.1.1 Statische Lichtstreuung

Bei der statischen Lichtstreuung wird - wie bereits erwähnt - die zeitlich gemittelte Streuintensität detektiert.

Die Streuung reiner Flüssigkeiten, die aus zufälligen Dichtefluktuationen durch thermische Bewegung der Moleküle resultiert, ist sehr gering. Die Streuintensität I_s gelöster Partikel hängt daher unter Vernachlässigung der Streuintensität des Lösungsmittel nur vom Streukontrast der gelösten Teilchen b^2 , von der Konzentration c und dem osmotischen Druck π ab.

$$I_s \sim b^2 k_B T \frac{c}{\left(\frac{\partial \pi}{\partial c}\right)_{T,N}} \quad \text{Gl. 3.2}$$

c : Konzentration

π : Osmotischer Druck

k_B : Boltzmannkonstante

T : Temperatur

N : Partikelanzahl

Nach Van't Hoff gilt für ideale bzw. reale Lösungen:

$$\left(\frac{\partial\pi}{\partial c}\right) = \frac{k_B T}{M} \quad (\text{ideal}) \quad \text{Gl. 3.3}$$

M : Molmasse der gelösten Partikel

$$\left(\frac{\partial\pi}{\partial c}\right) = k_B T \left(\frac{1}{M} + 2A_2 c + \dots\right) \quad (\text{real}) \quad \text{Gl. 3.4}$$

A_2 : 2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks

Damit erhält man für ideale Lösungen, d.h. hochverdünnte, sehr kleine streuende Partikel:

$$I_s \sim b^2 c M \quad \text{Gl. 3.5}$$

Der Streukontrast b_2 ist jedoch nicht wie bei Gasmolekülen von der absoluten Polarisierbarkeit, sondern der Differenz der Polarisierbarkeiten ($\Delta\alpha$) zwischen Lösungsmittel und gelöstem Molekül abhängig.

$$\Delta\alpha = \frac{n_D^2 - n_{D,0}^2}{4\pi \frac{N}{V}} \quad \text{Gl. 3.6}$$

n_D : Brechungsindex des gelösten Teilchens

$n_{D,0}$: Brechungsindex des Lösungsmittels

N : Partikelanzahl

V : Volumen

Unter Zuhilfenahme des sogenannten Brechungsindexinkrements $\left(\frac{\partial n_D}{\partial c}\right)$ und der Avogadro-Konstante N_A ergibt sich somit für das Rayleigh-Verhältnis:

$$R = (I_s - I_{LM}) \frac{r^2}{V} = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} n_{D,0}^2 \left(\frac{\partial n_D}{\partial c}\right)^2 c M \quad \text{Gl. 3.7}$$

Experimentell wird zusätzlich zur Streuintensität der Probe zunächst die Streuintensität des Lösungsmittels I_{LM} sowie die Streuintensität eines Standards I_{std} (typischerweise Toluol) gemessen. Mit Hilfe des aus Tabellenwerken zu entnehmenden Wertes für das absolute Rayleigh-Verhältnis des Standards $R_{std,abs}$ kann das Rayleigh-Verhältnis dann unabhängig von den experimentellen Bedingungen wie Abstand der Probe zum Detektor und Streuvolumen ausgedrückt werden:

$$R = \frac{I_s - I_{LM}}{I_{std}} R_{std,abs} \quad \text{Gl. 3.8}$$

Der Streukontrast b^2 kann zur Vereinfachung zu K zusammengefasst werden:

$$b^2 = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} n_{D,0}^2 \left(\frac{\partial n_D}{\partial c} \right)^2 = K \quad \text{Gl. 3.9}$$

Damit ergibt sich aus Gleichung 3.7 unter Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen gelösten Molekülen und Lösungsmittel (in Form des zweiten Virialkoeffizienten A_2) für sehr kleine Teilchen, die keine intrapartikulären Interferenzen aufweisen (sogenannte Punktstreuer):

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \quad \text{Gl. 3.10}$$

Für größere Partikel, die mehrere Streuzentren aufweisen, kann es auf Grund des größeren Gangunterschiedes auch zur teilweisen Auslöschung der gestreuten Wellen, d.h. destruktiven intrapartikulären Interferenzen kommen. Aus diesem Grund ist die gemessene Intensität abhängig vom Beobachtungswinkel.

Die Winkelabhängigkeit der Streuintensität wird durch den Partikelformfaktor $P(q)$ als Funktion des Betrags des Streuvektors q ausgedrückt (Abb. 3.2):

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} \langle R_g \rangle^2 q^2 + \dots \quad \text{Gl. 3.11}$$

mit

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi n_{D,0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad \text{Gl. 3.12}$$

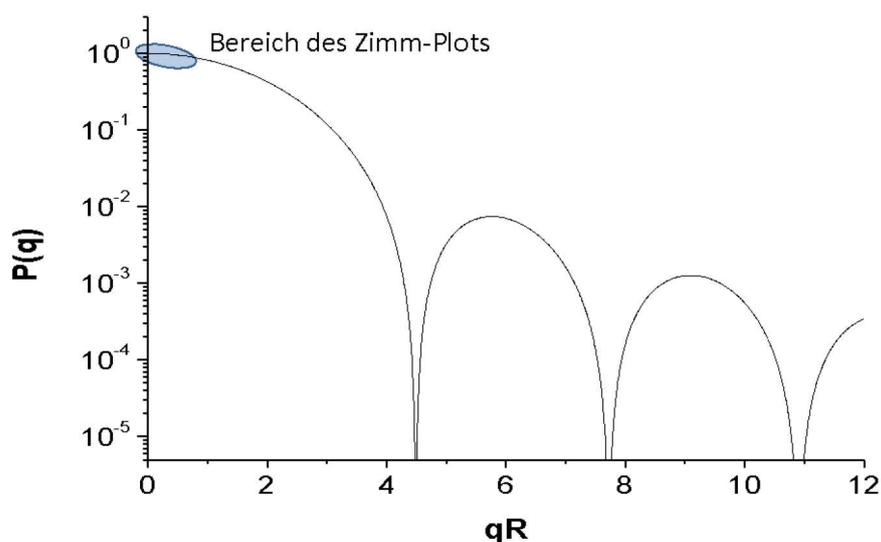


Abb. 3.2: Auftragung des Partikelformfaktors $P(q)$ für monodisperse Kugeln mit dem Radius R gegen die normierte Längenskala qR in logarithmischer Auftragung.¹⁸⁸

Unter Berücksichtigung des Formfaktors ergibt sich

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{MP(q)} + 2A_2c + \dots \quad \text{Gl. 3.13}$$

und mit Gl. 3.11 für $q^2 \langle R_g^2 \rangle \ll 1$ lässt sich dann die Zimm-Gleichung ableiten:

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle \right) + 2A_2c \quad \text{Gl. 3.14}$$

Die Auswertung mit Hilfe des sogenannten Zimm-Plots (Abb. 3.3) wird durch eine besondere Vorgehensweise erleichtert. Dabei wird $\frac{Kc}{R}$ auf der Ordinate und $q^2 + kc$ auf der Abszisse aufgetragen, wobei die Konstante k lediglich die Datenauftragung so anpasst, dass eine doppelte Extrapolation auf $c = 0$ und $\theta = 0^\circ$ (bzw. $q = 0$) möglich wird. Der gemeinsame y-Achsenabschnitt entspricht damit $1/M$ und aus den Steigungen der beiden Geraden lassen sich der Trägheitsradius $\langle R_g^2 \rangle$ und der 2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks A_2 ermitteln.

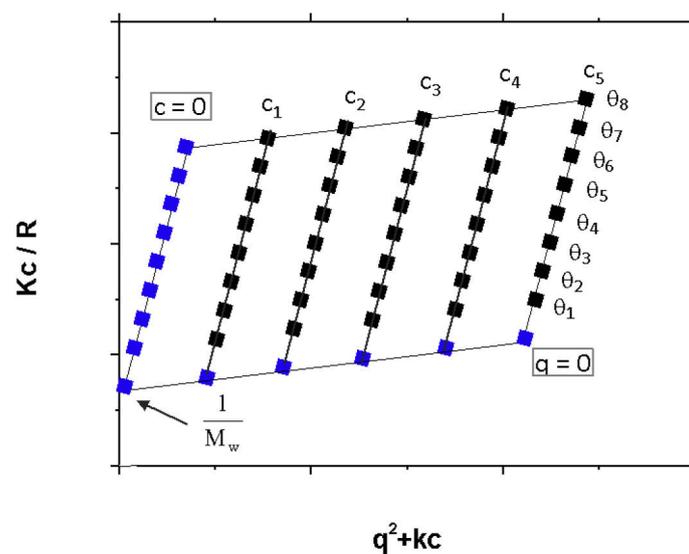


Abb. 3.3: Zimm-Plot: ■ symbolisiert die gemessenen Daten aus dem statischen Lichtstreu-Experiment, ■ extrapolierte Punkte für $q \rightarrow 0$ und $c \rightarrow 0$. Der gemeinsame y-Achsenabschnitt stellt $1/M_w$ dar und aus den Steigungen der Geraden lassen sich A_2 und R_g ermitteln.¹⁸⁹

Hierzu sei noch angemerkt, dass insbesondere synthetische Systeme meist uneinheitlich in ihrer Größe sind, d.h. eine gewisse Polydispersität aufweisen. Die Zimm-Gleichung dient daher nur der Bestimmung von mittleren molekularen Größen, nämlich dem Gewichtsmittel M_w und dem z-Mittel des Trägheitsradienquadrat $\langle R_g^2 \rangle_z$, welche wie folgt definiert sind:

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i M_i}{\sum N_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i} \quad \text{Gl. 3.15}$$

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \langle S^2 \rangle_z = \frac{\sum N_i M_i^2 S_i^2}{\sum N_i M_i^2} \quad \text{Gl. 3.16}$$

N_i bezeichnet die Gesamtzahl an Partikeln der Sorte i mit dem identischen Molekulargewicht M_i und c_i die jeweilige Konzentration.

3.1.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird nun nicht mehr die zeitlich gemittelte Streuintensität gemessen, sondern die zeitliche Fluktuation der Streuintensität, welche auf den interpartikulären Interferenzen sich bewegender Partikel beruht. Da sich kleinere Partikel auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung schneller bewegen als große Teilchen, kann die zeitliche Fluktuation der Streuintensität Aufschluss über den Diffusionskoeffizienten geben. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung kann die hydrodynamische Partikelgröße erlangt werden.

Diese zeitlichen Intensitätsfluktuationen können mit Hilfe der sogenannten Autokorrelationsfunktion g_2 dargestellt werden. Dazu wird die Streuintensität zu einem Zeitpunkt t mit der detektierten Streuintensität zum Zeitpunkt $(t + \tau)$ korreliert und über alle τ innerhalb eines Zeitraumes t gemittelt. (Abb. 3.4 links).¹⁸⁸

$$g_2(q, \tau) = \langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle_\tau \quad \text{Gl. 3.17}$$

Mit zunehmender Korrelationszeit fällt die normierte Autokorrelationsfunktion von $\langle I^2 \rangle$ auf den Wert $\langle I \rangle^2$ ab (Abb. 3.4 rechts). Dieser Abfall der Autokorrelationsfunktion ist dabei für kleine Teilchen, deren Intensitäts-Signal schneller fluktuiert, deutlich steiler als für größere Teilchen, welche eine längere Korrelationszeit aufweisen.

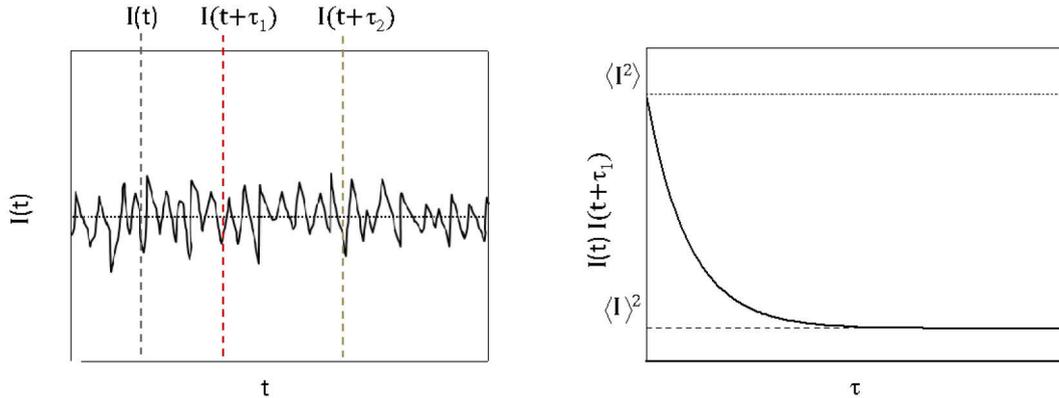


Abb. 3.4: Prinzip der dynamischen Lichtstreuung: Fluktuation der Streuintensität (links) und korrespondierende Autokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ (rechts).¹⁸⁸

Die Siegert-Relation überführt die gemessene Intensitätskorrelation g_2 in die normierte Amplitudenkorrelationsfunktion g_1 , welche als exponentiell abklingende Funktion beschrieben werden kann.

$$g_1(\tau) = \sqrt{\frac{\langle I(q,t)I(q,t+\tau) \rangle}{\langle I(q,t) \rangle^2}} - 1 = \exp(-q^2 D \tau) \quad \text{Gl. 3.18}$$

Bei logarithmischer Auftragung ergibt sich daraus für monodisperse, monomodale Partikel eine Gerade mit der Steigung $-q^2 D$ (mit q Betrag des Streuvektors und D Diffusionskoeffizient). Für polydisperse, aber monomodale Proben stellt $g_1(\tau)$ eine Überlagerung verschiedener Exponentialfunktionen dar.

$$g_1(\tau) = \sum n_i M_i^2 P_i(q) * \exp(-q^2 D \tau) = \sum a_i * \exp(-q^2 D \tau) \quad \text{Gl. 3.19}$$

Der Wichtungsfaktor a beziehungsweise $n_i M_i^2 P_i(q)$ entspricht dabei dem Beitrag der Partikelfraktion i zur mittleren Streuintensität und somit dem relativen Anteil an der Amplitudenkorrelationsfunktion. Für größere Teilchen, die intrapartikuläre Interferenzen aufweisen, ergibt sich daraus auf Grund des q -abhängigen Wichtungsfaktor $P(q)$ nur ein apparenter Diffusionskoeffizient. Für die Extrapolation $q \rightarrow 0$ (und damit $P(q) = 1$) wird dann aus D_{app} das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten $\langle D \rangle_z$ (Abb. 3.5).

$$D_{\text{app}}(q) = \frac{\sum n_i M_i^2 P_i(q) D_i}{\sum n_i M_i^2 P_i(q)} \quad \text{Gl. 3.20}$$

für $q \rightarrow 0$

$$\langle D \rangle_z = \frac{\sum n_i M_i^2 D_i}{\sum n_i M_i^2} \quad \text{Gl. 3.21}$$

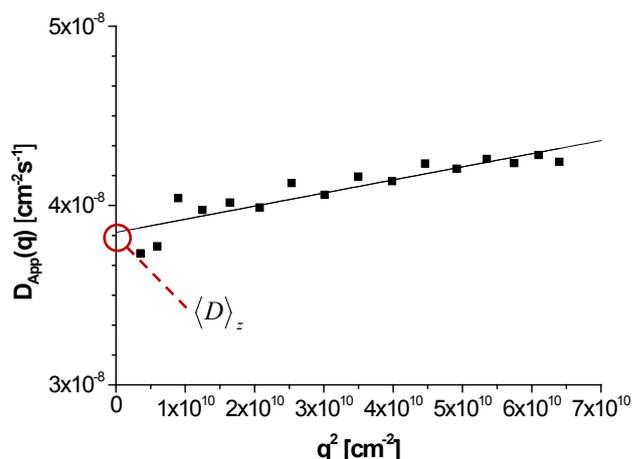


Abb. 3.5: Bestimmung des z -gemittelten Diffusionskoeffizienten durch Extrapolation von $D_{\text{app}}(q)$ für $q \rightarrow 0$

Über die Stokes-Einstein-Beziehung ergibt sich dann aus $\langle D \rangle_z$ der hydrodynamische Radius als reziprokes z -Mittel:

$$R_h \equiv \left(\frac{1}{R_h} \right)_z^{-1} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 \langle D \rangle_z} \quad \text{Gl. 3.22}$$

k_B : Boltzmann-Konstante
 T : Absolute Temperatur
 η_0 : Viskosität des Lösungsmittels

Die Exponential-Funktion $g_1(\tau)$ kann auch mit Hilfe des sogenannten *Kumulanten-Verfahrens* (Taylor-Reihen-Entwicklung) angenähert werden:

$$\ln g_1(\tau) = -\kappa_1 \tau + \frac{1}{2!} \kappa_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \kappa_3 \tau^3 + \dots \quad \text{Gl. 3.23}$$

Der erste Kumulant $\kappa_1 = \langle D \rangle q^2$ liefert dabei den mittleren Diffusionskoeffizienten, woraus über die Stokes-Einstein-Beziehung auch der mittlere hydrodynamische Radius ermittelt werden kann.

Der zweite Kumulant κ_2 kann als Maß für die Polydispersität der Probe angesehen werden:

$$\kappa_2 = (\langle D^2 \rangle - \langle D \rangle^2) q^4 \quad \text{Gl. 3.24}$$

Dabei ist die Verteilungsfunktion des Diffusionskoeffizienten σ_D wie folgt definiert:

$$\sigma_D = \frac{\sqrt{\langle D^2 \rangle - \langle D \rangle^2}}{\langle D \rangle} = \sqrt{\frac{\kappa_2}{\kappa_1^2}} = \sqrt{\mu_2} \quad \text{Gl. 3.25}$$

Unter Annahme, dass die Verteilungsfunktion der Partikelgrößen einer Gaußverteilung entspricht, ergibt sich für die Polydispersität des Radius:

$$\sigma_R = \frac{\sqrt{\langle R_h^2 \rangle - \langle R_h \rangle^2}}{\langle R_h \rangle} \quad \text{Gl. 2.26}$$

Für μ_2 -Werte bei 90° von $< 0,05$ kann damit eine vergleichsweise niedrige Polydispersität des Radius von ca. 25 % angenommen werden.

Polymodale Proben, d.h. Proben, die verschiedene Größenfraktionen enthalten, können mittels DLS nur dann getrennt aufgelöst werden, wenn die Teilchenfraktionen jeweils relativ monodispers sind und sich die Abklingkonstanten und damit die Radien mindestens um den Faktor 3 unterscheiden. Im lin-log Plot der $g_1(\tau)$ Funktion ist dann ein stufenähnliches Abklingverhalten erkennbar. In Abb. 3.6 ist ein Beispiel für $g_1(\tau)$ einer bimodalen Probe gezeigt.

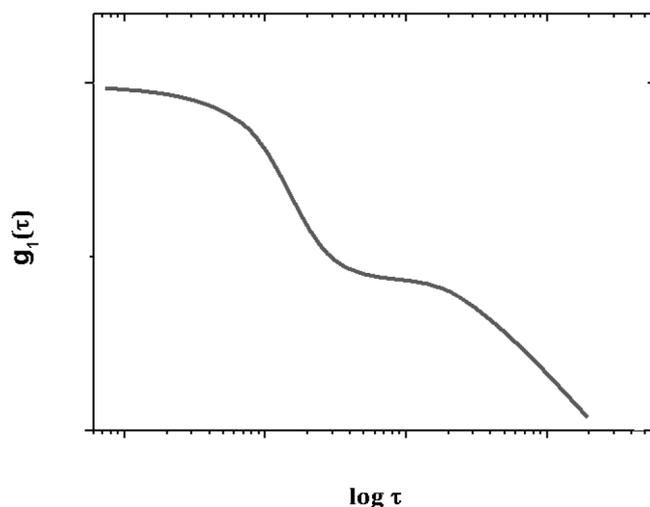


Abb. 3.6: Korrelationsfunktion einer bimodalen Probe in lin-log Darstellung¹⁸⁸

3.1.3 Das ρ -Verhältnis

Das ρ -Verhältnis erlaubt es, mit experimentellen Daten aus statischer und dynamischer Lichtstreuung, Aussagen über die Geometrie der untersuchten Makromoleküle zu machen. Das ρ -Verhältnis ist wie folgt durch den Trägheitsradius R_g und den kugeläquivalenten hydrodynamischen Radius R_h definiert:

$$\rho = \frac{\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}}{\left(\langle \frac{1}{R_h} \rangle_z\right)^{-1}} \quad \text{Gl. 3.27}$$

Tab. 3.1 enthält eine Liste von theoretischen Werten für verschiedene Teilchengometrien, welche zum Vergleich mit den experimentellen Daten herangezogen werden können. Es sei dazu angemerkt, dass eine Auswertung des ρ -Verhältnis für polydisperse Proben schwierig ist, da die Mittelwerte für R_g und R_h unterschiedlich gebildet werden.

Tab. 3.1: ρ -Verhältnis für Partikel unterschiedlicher Geometrie¹⁸⁸

Homogene harte Kugel	0,775
Hohlkugel	1
Polymerknäuel (ideal)	1,505
Starre Stäbchen	>2

3.1.4 Lichtstreuung an Multikomponentensystemen

Die Lichtstreuung an Multikomponentensystemen kann beispielsweise zur Beurteilung der Protein-Partikel-Wechselwirkung in physiologischer Umgebung herangezogen werden. Rausch et al. beschrieben 2010 ein Verfahren, um das Aggregations- bzw. Agglomerationsverhalten von Nanopartikeln im Blutserum zu untersuchen.¹⁹⁰ Die Proteine humanen Blutserums lassen sich grob in drei Größenfraktionen aufteilen.¹⁹⁰ Daher lässt sich Blutserum (Index s) durch einen triexponentiellen Abfall der Autokorrelationsfunktion $g_{1,s}$ ausreichend genau beschreiben:

$$g_{1,s}(\tau) = a_{1,s} * \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{1,s}}\right) + a_{2,s} * \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{2,s}}\right) + a_{3,s} * \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{3,s}}\right) \quad \text{Gl. 3.28}$$

mit a_i Amplitude, τ_i Abklingzeiten nach $\tau_i = 1/q^2 D_i$ der verschiedenen Komponenten i .

Die Autokorrelationsfunktionen der meisten Nanopartikelsysteme ($g_{1,np}$) lassen sich auf Grund relativ geringer aber dennoch signifikanter Polydispersität über eine Summe aus zwei Exponentialfunktionen annähern:

$$g_{1,np}(\tau) = a_{1,np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,np}}\right) + a_{2,np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,np}}\right) \quad \text{Gl. 3.29}$$

Nachdem sowohl Nanopartikel als auch Serum getrennt voneinander in der DLS gemessen wurden, können anschließend die Nanopartikel in Anwesenheit von Serum-Proteinen erneut gemessen und analysiert werden.

Findet keine oder nur vernachlässigbare Wechselwirkung der Nanopartikel mit den Serumproteinen statt, so kann die Autokorrelationsfunktion dieser Mischung $g_{1,m}$ durch eine Summe der beiden individuellen Korrelationsfunktionen aus den vorherigen Messungen beschrieben werden. Dabei werden alle Fit-Parameter konstant gehalten und nur der Anteil der Intensitäten f_s und f_{np} der jeweiligen Fit-Funktionen angepasst.

$$g_{1,m}(\tau) = f_s g_{1,s}(\tau) + f_{np} g_{1,np}(\tau) \quad \text{Gl. 3.30}$$

Kommt es zur Agglomeration der Nanopartikel im Blutserum, so kann die Autokorrelationsfunktion mit der oben genannten Funktion nicht ausreichend beschrieben werden, was an einer signifikanten Abweichung des Fit-Residuums von Null sichtbar wird (Abb. 3.7 links).

Mit der Ergänzung einer weiteren Exponentialfunktion $f_{agg} g_{1,agg}(\tau)$ kann auch die Größe der resultierenden Agglomerate angenähert werden:

$$g_{1,m}(\tau) = f_s g_{1,s}(\tau) + f_{np} g_{1,np}(\tau) + f_{agg} g_{1,agg}(\tau) \quad \text{Gl. 3.31}$$

Diese Annäherung gilt nur unter der Voraussetzung, dass der Anteil der Serumproteine, die an der Agglomeration beteiligt sind, vernachlässigbar ist, die Messung also in einem Überschuss an Serum-Proteinen stattfindet. Ist dies gegeben, kann Gl. 3.31 zur Anpassung der Autokorrelationsfunktion durch Variation der Intensitätsanteile genutzt werden und so die Größe der Agglomerate ermittelt werden (Abb. 3.7 rechts). Eine Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche wird dabei vernachlässigt.

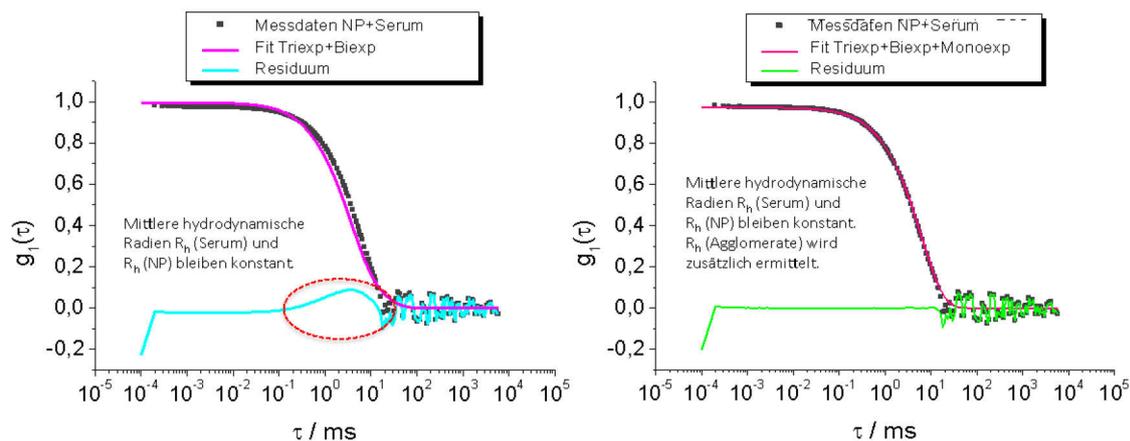


Abb. 3.7: Autokorrelationsfunktion einer Mischung aus Nanopartikeln und Serumproteinen. Es ist leichtes Agglomerationsverhalten zu erkennen. Der Fit aus der Summe der Einzelkomponenten passt nicht ausreichend und es kommt zu einer sichtbaren Abweichung des Residuums von null (rot markiert). Die Anpassung (nach Rausch et al. 2010)¹⁹⁰ mit der Ergänzung einer weiteren Exponentialfunktion zur Fit-Funktion kann ebenfalls die Agglomerate anpassen und führt zu einem Residuum von null. (rechts).

3.2 Zeta-Potenzial

Informationen über die Oberflächenladung von Nanopartikeln in Dispersion können über das Zeta-Potenzial erlangt werden. Dazu wird die elektrophoretische Mobilität mittels Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt und daraus nachfolgend das Zeta-Potenzial berechnet.¹⁹¹

Die Oberflächenladung eines Partikels in Lösung wird durch Anlagerung von Ionen aus dem umgebenden Medium kompensiert, wodurch eine elektrochemische Doppelschicht aufgebaut wird. Die innere Schicht besteht aus Gegenionen, die stark an die Partikeloberfläche gebunden sind. Diese Schicht wird Stern-Layer genannt und ist von einer weiteren diffusen Schicht von weniger stark gebundenen Ionen umgeben. Diese diffuse Schicht besitzt bei einer bestimmten Distanz von der Partikeloberfläche eine Grenze, ab welcher bei Bewegung des Partikels die gebundenen Ionen auf Grund von Scherkräften nicht mehr folgen. Damit ist die Ladung des Partikels nicht mehr ausgeglichen und es resultiert ein elektrisches Potenzial an dieser Grenze, welches Zeta-Potenzial genannt wird (Abb 3.8).

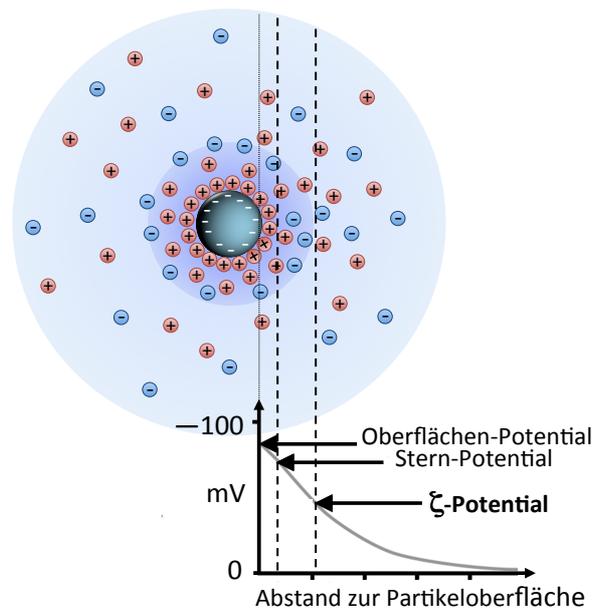


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Zeta-Potenzials am Beispiel eines negativ geladenen Partikels.¹⁹¹ Zu sehen ist die innere stark gebundene Schicht (Stern-Layer) und die diffuse Schicht mit der Grenze, ab welcher bei Bewegung des Partikels die gebundenen Ionen auf Grund von Scherkräften nicht mehr folgen und definitionsgemäß das Zeta-Potenzial darstellt.

Das Zeta-Potenzial kann über eine elektrokinetische Messung ermittelt werden. Die geladenen Partikel werden durch Anlegen einer Spannung in Bewegung gesetzt. Hierbei ist die Geschwindigkeit der Partikel in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode abhängig von der Viskosität, der Dielektrizitätskonstante des Mediums, der Stärke des elektrischen Feldes und dem Zeta-Potenzial der Partikel. Sobald sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, bewegen sich die Partikel mit konstanter Geschwindigkeit, welche als elektrokinetische Mobilität definiert ist und mittels Laser-Doppler-Anemometrie gemessen werden kann. Der Eingangsstrahl wird durch einen Strahlteiler in zwei Strahlen gesplittet, welche in der Messkammer wieder zusammengelenkt werden. Im Kreuzungsbereich entsteht ein Interferenzmuster. Wird der Laserstrahl an einem Partikel gestreut, kommt es zu einer Frequenzverschiebung (Doppler-Verschiebung), welche proportional zur Geschwindigkeit der Partikel ist. Mit Hilfe dieser gemessenen elektrokinetischen Mobilität μ kann schließlich über die Henry-Gleichung das Zeta-Potenzial ermittelt werden.¹⁹¹

$$\mu = \frac{2\varepsilon\xi f(\kappa a)}{3\eta} \quad \text{Gl. 3.32}$$

ε : Dielektrizitätskonstante des Mediums

ξ : Zeta-Potenzial

$f(\kappa a)$: Henry-Funktion (abhängig von der Dicke der diffusen Schicht κ^{-1} und dem Partikelradius a)

η : Viskosität des Mediums

Die *Henry-Funktion* lässt sich durch verschiedene Näherungen beschreiben. Für große Partikel ($> 0,2 \mu\text{m}$) in einem Medium mit hoher Ionenstärke kann die *Smoluchowski-Näherung* (mit $f(\kappa a) = 1,5$) verwendet werden. Für kleinere Partikel in einem Medium mit niedriger Dielektrizitätskonstante wird $f(\kappa a) = 1$ nach der *Hückel-Näherung*.

3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Elektronenmikroskopie ermöglicht die Darstellung sehr kleiner Objekte im Mikro- und Nanometer-Bereich. Beschleunigte Elektronen haben eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht. Diese kann nach de Broglie über den Welle-Teilchen-Dualismus als $\lambda = h/mv$ (mit h Plancksches Wirkungsquantum, m Masse, v Geschwindigkeit) beschrieben werden.¹⁶³ Da das Auflösungsvermögen eines Mikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist, können mit Hilfe der Elektronenmikroskopie deutlich kleinere Objekte abgebildet werden als mit der konventionellen Lichtmikroskopie. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie ist die Auflösung auf ca. 0,2 nm beschränkt.

Der prinzipielle Aufbau eines TEM ähnelt dem eines Lichtmikroskops, jedoch sind die Glaslinsen durch elektromagnetische Linsen ersetzt (Abb. 3.9).¹⁶³ Als Elektronenquelle können thermische Emitter (Wolframdraht, LaB₆-Kristall) oder Feldemissionskathoden zum Einsatz kommen. Die Elektronen werden von der Kathode zur Anode beschleunigt. Dazu werden Spannungen in der Größenordnung von 10^5 Volt oder mehr angelegt.¹⁹²

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie werden die Elektronen zur Abbildung genutzt, welche das Objekt durchstrahlt haben. Die Abbildung erfolgt auf einem Leuchtschirm mit einer Szintillator-Schicht oder durch eine CCD-Kamera.

Im Elektronenmikroskop muss ein ausreichend hohes Vakuum herrschen, damit keine Interaktion der Elektronen mit Gasmolekülen auftritt, wodurch diese zusätzlich abgelenkt würden. Als Objektträger dienen runde Netzchen (grids) aus Kupfer (selten auch Gold oder Nickel), welche zusätzlich mit einem dünnen Kohlefilm beschichtet werden. Die Probe wird auf diese beschichteten Netzchen gegeben und erst nach vollständiger Trocknung gemessen.

Um Trocknungsartefakte zu vermeiden oder um auszuschließen, dass gemessene Proben im trockenen Zustand nicht stabil sind, kann Kryo-TEM Anwendung finden. Bei dieser Variante der Transmissionselektronenmikroskopie wird die wässrige Probe auf das Kupfergitter aufgegeben und nach Abtupfen in flüssigem Propan schockgefroren, so dass es zu keiner Wasserkristallbildung kommen kann. Diese Methode kann somit für Untersuchungen von Nanopartikeln in ihrer „natürlichen“ Umgebung genutzt werden.

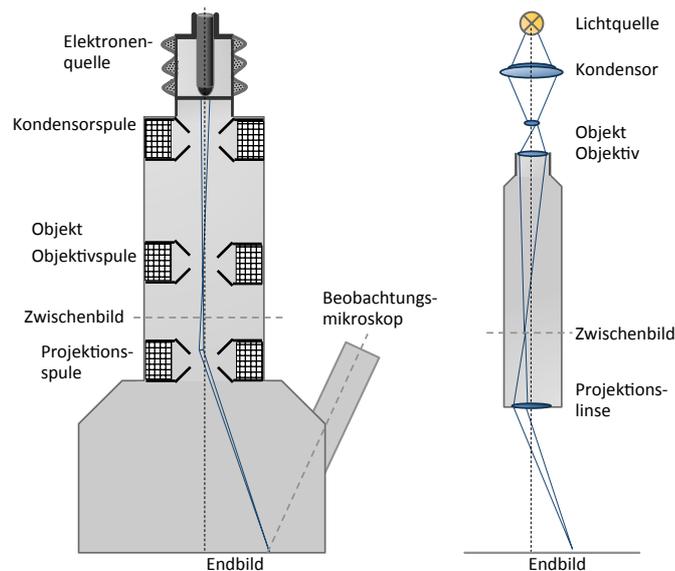


Abb. 3.9: Schematische Darstellung eines Elektronenmikroskops im Vergleich zu einem konventionellen Lichtmikroskop.¹⁶³

3.4 Zytotoxizitätstests

Insbesondere für biomedizinische Anwendungen ist die Evaluation der Zytotoxizität der Nanopartikel notwendig. Sowohl die Unbedenklichkeit des Wirkstoffträgers an sich als auch die therapeutische Wirkung eines beladenen Wirkstoffträgers sind dabei von Interesse. Um erste Informationen über die Wirkung auf Zellen zu erhalten, werden im Allgemeinen *in vitro* Zytotoxizitätstests durchgeführt. Es gibt eine Reihe von Methoden, die jeweils unterschiedliche Vital-Funktionen der Zellen untersuchen. Fluoresceindiacetat ist ein farbloses Derivat des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein. In stoffwechselaktiven Zellen wird Fluoresceindiacetat durch kurzlebige zytoplasmatische Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert. Über die fluorometrische Quantifizierung des Fluoresceins lässt sich die relative Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmen.¹⁹³ Beim häufig genutzten MTT-Assay wird das wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid von metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in dunkelblaue, wasserunlösliche Formazan-Salze umgesetzt.¹⁹⁴ Nach Beendigung der Beobachtungszeit werden die Tetrazoliumsalze in den Zellen durch Zugabe von DMSO gelöst und photometrisch quantifiziert. Das Zellüberleben wird wiederum relativ zu einer unbehandelten Kontrolle über die gemessene Formazan-Bildung ermittelt.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (auch FACS, *fluorescent activated cell sorting*) ist eine leistungsstarke Methode, um ganze Zellpopulationen in sehr kurzer Zeit (~1000 Zellen/s) zu analysieren.¹⁹² Die Zellen fließen einzeln durch eine Messkammer, wo ein Laser-Strahl auf sie trifft (Abb. 3.10). Das resultierende Streulicht wird in zwei unterschiedlichen Winkeln detektiert. Das Vorwärtsstreulicht gibt dabei Aufschluss über die Größe der Zellen und das Seitwärtsstreulicht (Messung im 90° Winkel) lässt Aussagen über die Granularität und somit über den Zustand der Zellen zu. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Detektors können markierte Zellen detektiert werden. Beispielsweise ist zur Untersuchung der Zellbindung oder Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln die Durchflusszytometrie eine gute Methode um quantitative Aussagen zu erhalten. Die Fluoreszenz wird direkt mit einem Ereignis, d.h. einer einzelnen Zelle in der Kammer, detektiert. Somit ergibt sich ein Histogramm aus Fluoreszenzintensität versus Ereignisse (gemessene Zellzahl).

Für komplexere biologische Untersuchungen können die Zellen abhängig von ihrer Markierung mit fluorochromen Antikörpern funktionell getrennt und analysiert werden. Dazu besitzt ein FACS-Instrument hinter der Messkammer eine Ladungselektrode, um die markierten Zellen kurzzeitig aufzuladen und über eine Ablenkplatte in die jeweiligen Sammelröhrchen zu lenken.

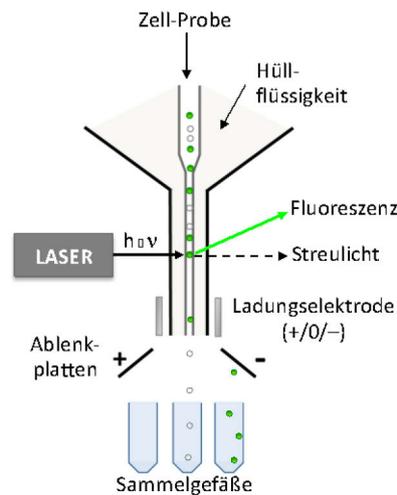


Abb. 3.10: Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers.¹⁹² Die Zellen einer Zellsuspension werden mit Hilfe einer Hüllflüssigkeit fokussiert einzeln durch die Messzelle geleitet. Dort wird sowohl das Streulicht als auch die Fluoreszenz detektiert. Über eine Ladungselektrode und die entsprechenden Ablenkplatten können nachfolgend die Zellen gemäß ihrer Markierung sortiert werden.

3.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) ermöglicht durch eine hohe räumliche Auflösung die Abbildung von morphologischen Details von Geweben bis hin zur subzellulären Ebene. Die konfokalen optischen Schnitte im zellulären Bereich sind im Ergebnis vergleichbar mit computertomographischen Bildern in der Medizin.

Wie ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop verfügt ein konfokales LSM über einen dichroitischen Spiegel, der das anregende Licht zur Probe lenkt und gleichzeitig das Licht der Emissionswellenlänge zum Detektor leitet (Abb. 3.11).¹⁹² Die Anregung erfolgt mit einem Laser, wobei das Licht über ein Objektiv auf einen Punkt in der zu untersuchenden Ebene der Probe fokussiert wird. Mit Hilfe einer konfokalen Blende (pinhole), welche in konjugierter Ebene über dem Fokuspunkt liegt, wird lediglich Licht aus der Fokusebene

im Detektor gesammelt und Streulicht, das ober- und unterhalb emittiert wird, wirksam ausgeschlossen. Galvanometrische Scanspiegel helfen, das Laserlicht sequenziell durch die Probe zu schicken, sodass punktgenaue Anregung und Emission rasterartig „Punkt für Punkt“ einen hochauflösten optischen Schnitt durch die Probe ergibt. Auf diese Weise kann eine laterale Auflösung von $0,25\ \mu\text{m}$ (oder z.T. höher) erreicht werden. Durch schrittweises Verschieben der Fokusebene werden verschiedene Bildschnitte erzeugt, die im Nachhinein zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammengesetzt werden können.

Diese Technik ermöglicht beispielsweise eine genaue Lokalisierung von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln, welche von Zellen aufgenommen wurden. Es kann damit unterschieden werden, ob sich die Nanopartikel tatsächlich innerhalb der Zelle befinden oder lediglich außen an der Zellmembran haften.

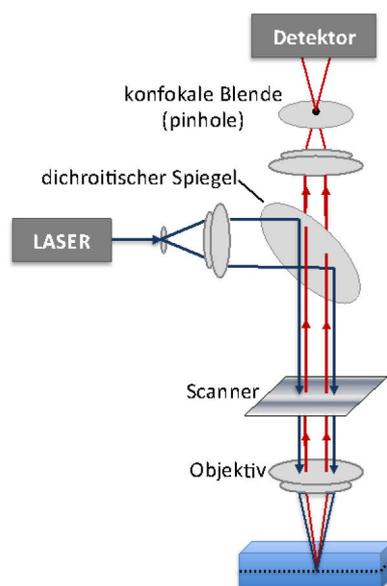


Abb. 3.11: Prinzipieller Aufbau eines Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops¹⁹²

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Grundlegende Untersuchungen von Nanostrukturen aus Poly(1,2-butadien)-*block*-poly(ethylenoxid)

Das amphiphile Blockcopolymer Poly(1,2-butadien)-*block*-poly(ethylenoxid), kurz PB-*b*-PEO, wurde für diese Arbeit als Modellsystem gewählt. Der hydrophile Block besteht aus dem häufig in biomedizinischen Anwendungen eingesetzten PEO (oder PEG). Daher bieten Nanostrukturen aus diesem Blockcopolymer mit einer hydrophilen PEO-Oberfläche die Möglichkeit, relevante Untersuchungen bezüglich der Wechselwirkung mit Proteinen und Zellen durchzuführen. Der hydrophobe Block aus Polybutadien bietet durch die verbleibenden Doppelbindungen die Möglichkeit einer Gammastrahlen-induzierten Vernetzung und dadurch eine Fixierung der selbstorganisierten supramolekularen Strukturen. Dadurch können TEM-Analysen auch im trockenen Zustand durchgeführt werden, ohne dass es der Kryo-TEM-Technik bedarf.

Im Folgenden werden nun die Herstellung und Charakterisierung unterschiedlicher PB-*b*-PEO-Nanostrukturen vorgestellt sowie die Untersuchung der Wechselwirkungen mit Zellen und Proteinen in Abhängigkeit von Form, Größe und Oberflächenladung der jeweiligen Aggregatstruktur diskutiert.

4.1.1 Kontrollierte Selbstorganisation von PB-*b*-PEO-Polymeren

Amphiphile PB-*b*-PEO-Blockcopolymere können sich in einem selektiven Lösungsmittel (in diesem Fall z.B. Wasser) in verschiedene supramolekulare Strukturen zusammenlagern (Abschnitt 2.3.3.2). Aus dieser Selbstorganisation resultieren dispergierte Mikrophasen, bestehend aus Domänen von abgeschirmten hydrophoben Ketten im Inneren der Struktur, sowie hydrophile Polymerketten, welche sich in Richtung des umgebenden Wassers orientieren. Die Größe und Form der supramolekularen Strukturen wird dabei überwiegend durch die Komposition des Blockcopolymeren, also dem Verhältnis von hydrophobem zu hydrophilem Block sowie dem Gesamtmolekulargewicht bestimmt. Nach dem Modell von Israelachvili besteht ein Zusammenhang zwischen der bevorzugten Aggregationsmorphologie (z.B. Kugel,

Zylinder oder lamellare Struktur) und der Molekülgeometrie des Amphiphils (Abschnitt 2.2).⁷⁶ Die Molekülgeometrie resultiert dabei aus einer Kombination aus Grenzflächeneffekten, d.h. der Minimierung energetisch ungünstiger Wechselwirkungen zwischen den Teilblöcken sowie zwischen dem hydrophoben Block und der wässrigen Umgebung, der Abstoßung der Kopfgruppen untereinander und aus dem Entropieverlust auf Grund der geordneten Zusammenlagerung der hydrophoben Ketten.⁸¹

Thermodynamisch betrachtet spielt zudem die Entropie des Wassers bei der Selbstorganisation der Amphiphile eine entscheidende Rolle. Bei temperaturabhängigen Versuchen wurde festgestellt, dass das Lösen von apolaren Molekülen in Wasser mit vergleichsweise hohen Entropieverlusten einhergeht. Nach dem *Iceberg-Modell* wird dieser sogenannte *hydrophobe Effekt* durch eine „erzwungene“ Strukturierung der Wassermoleküle in der unmittelbaren Umgebung des apolaren Stoffes erklärt.^{195,196}

Für die Selbstorganisation bedeutet die Vermeidung des Kontakts zwischen hydrophoben Ketten mit dem umgebenden Wasser somit neben der Verhinderung enthalpisch ungünstiger Wechselwirkungen auch, dass die Anordnungsfreiheit des Wassers weitestgehend gewahrt wird und so ein Entropieverlust vermieden werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden PB-*b*-PEO-Blockcopolymerer verschiedener Masse und Komposition verwendet. Diese wurden von Michael Maskos und Oliver Rheingans synthetisiert und charakterisiert zur Verfügung gestellt.^{79, 197}

In Tab. 4.1 sind die wichtigsten Kenndaten der verwendeten Blockcopolymerer zusammengestellt. Die Vorhersage der bevorzugten Struktur in Wasser ohne Zusatz eines Co-Lösungsmittels basiert auf experimentellen Daten von Maskos & Harris 2001, Maskos 2006, Jain & Bates 2004 und Bates 2002 (Vgl. Abb. 2.11, Abschnitt 2.3.3.2).^{79, 111, 112, 198}

Tab. 4.1: Beschreibung der verwendeten PB-*b*-PEO-Blockcopolymeren⁷⁹

Probenname	MALDI-TOF MS		N _{PB}	% PEO (w/w)	Endgruppe	Bevorzugte Morphologie
	M _n (g/mol)	M _w /M _n				
PB ₁₃₀ PEO ₆₆ -OH	10.800	1,05	130	29	Hydroxyl	Lamelle (Vesikel)
PB ₁₃₀ PEO ₆₆ -COOH	11.000	1,05	130	29	Carboxyl	Lamelle (Vesikel)
PB ₁₃₀ PEO ₁₂₀ -OH	13.100	1,06	130	43	Hydroxyl	Zylinder
PB ₁₃₀ PEO ₁₂₀ -COOH	13.200	1,06	130	43	Carboxyl	Zylinder
PB ₃₂ PEO ₂₉ -OH	3130	1,03	32	43	Hydroxyl	Zylinder, Vesikel
PB ₃₂ PEO ₂₉ -COOH	3315	1,03	32	43	Carboxyl	Vesikel, Zylinder

Die gezielte Strukturbildung der PB-*b*-PEO-Polymeren kann neben der Polymerkomposition maßgeblich durch die Präparationsmethode beeinflusst werden. Bei Anwendung der einfachsten Methode, der Rehydratation in Wasser, welche entweder direkt aus dem Bulkmaterial oder ausgehend von einem dünnen Polymerfilm auf einer Oberfläche erfolgt (vgl. Abschnitt 2.3.1), wird im Allgemeinen die thermodynamisch bevorzugte Aggregat-Morphologie erzeugt. Wird die Strukturbildung ausgehend von einer Polymerlösung in einem guten Lösungsmittel für beide Blöcke mit Hilfe der Co-Lösungsmittelmethode induziert, so spielen weitere Wechselwirkungseffekte, insbesondere auch zwischen Co-Lösungsmittel und dem hydrophoben sowie dem hydrophilen Block, eine Rolle.¹⁹⁹ Wird der Anteil des selektiven Lösungsmittels (Wasser) sukzessive erhöht, erniedrigt sich die Löslichkeit des hydrophoben Blocks bis der Wasseranteil einen kritischen Punkt erreicht, bei welchem die Aggregation einsetzt. Eine weitere Erhöhung des Wasseranteils führt schließlich auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit des hydrophoben Blocks zur Verhinderung freier Diffusion einzelner Polymerketten, so dass der dynamische Prozess der Strukturbildung gestoppt wird. Erfolgt eine plötzliche Erhöhung des Wasseranteils bevor die thermodynamisch bevorzugte Struktur gebildet wurde, können gegebenenfalls auch kinetisch gefangene Strukturen erhalten werden.²⁰⁰

Der kritische Gehalt, ab welchem die Strukturbildung einsetzt, ist sowohl von dem eingesetzten Polymer als auch von dem Lösungsmittel und Co-Lösungsmittel abhängig. Für PB-*b*-PEO-Polymeren eignet sich THF als Co-Lösungsmittel, da es ein gutes

Lösungsmittel sowohl für den hydrophilen PEO als auch für den hydrophoben PB-Block ist und uneingeschränkt mit Wasser als selektivem Lösungsmittel mischbar ist. Zudem hat es den Vorteil, dass es sich nachträglich durch Evaporation entfernen lässt.

Eine Studie basierend auf den Diblockcopolymeren PB₅₇-*b*-PEO₁₈₃ und PB₅₇-*b*-*d*PEO₁₆₇ in THF/Wasser-Gemischen zeigte mit Hilfe von Streumethoden und Kryo-TEM Messungen das Einsetzen von Strukturbildungen bereits ab einem Anteil von 50 % Wasser.¹⁹⁹ Bei einem Wasseranteil über 70 % wurden keine freien Polymerketten mehr detektiert. Auf Grund des sehr hydrophoben PB-Blocks und der damit verbundenen sehr geringen kritischen Aggregationskonzentration kann daher angenommen werden, dass bei einem Wasseranteil über 70 % keine nennenswerte Dynamik in der Strukturbildung von PB-*b*-PEO-Polymeren mehr stattfindet. Unabhängige Experimente von Waltraut Müller im Rahmen ihrer Dissertation mit PB₁₃₀-PEO₆₆ bestätigten diesen Schwellenwert. Erst ab einem THF-Anteil von mehr als 38 Gew.-% THF (< 62 % Wasser) konnten Strukturveränderungen hergestellter Polymervesikel in Wasser mittels DLS detektiert werden.²⁰¹

Für die Herstellung von Nanostrukturen aus PB-*b*-PEO-Polymeren mit der Co-Lösungsmittelmethode wurde daher stets auf einen minimalen THF-Endgehalt von über 27 Gew.-% (30 Vol.-%) geachtet, um die Stabilität der erzeugten Polymerstrukturen zu gewährleisten.

Im Folgenden soll nun die Herstellung unterschiedlicher Nanostrukturen aus in Tab. 4.1. genannten PB-*b*-PEO-Polymeren in Abhängigkeit der Polymerkomposition sowie der Präparationsmethode vorgestellt und diskutiert werden.

4.1.1.1 PB₁₃₀-PEO₆₆

Wegen ihres relativ geringen hydrophilen PEO-Anteils (29 % (w/w)) tendieren sowohl das PB₁₃₀PEO₆₆-OH- als auch das PB₁₃₀PEO₆₆-COOH-Polymer zur Bildung von Vesikelstrukturen in Wasser. Polymervesikel aus diesen Polymeren können durch direkte Rehydratation oder auch mit der Co-Lösungsmittel-Methode erhalten werden. Erfolgt die Vesikelherstellung mit Hilfe der Filmrehydrierung, werden im Allgemeinen relativ große (mit Durchmessern bis zu mehreren μm), uneinheitliche mono- als auch multischalige Vesikel erhalten.²⁰¹ Zur Vereinheitlichung und verbesserten Größenkontrolle bedarf es einer Nachbehandlung z.B. durch Extrusion. Letztere ist zum einen sehr zeitaufwändig,

da es oftmals mehr als 50 Extrudierschritte benötigt, um eine zufriedenstellend enge Größenverteilung zu erhalten, und zum anderen mit Materialverlust durch Adsorption an der Extrudiermembran verbunden. Die Co-Lösungsmittelmethode liefert generell kleinere, enger verteilte Vesikel und ermöglicht zudem in eingeschränktem Maße eine Größenkontrolle durch die Regulation der Zutropfgeschwindigkeit des selektiven Lösungsmittels.²⁰¹

Die Weiterentwicklung der Co-Lösungsmittel-Methode mittels Mikromischer-Technologie erweitert die Kontrollmöglichkeit über die Strukturbildung durch variierbare Mischparameter (Abschnitt 2.3.2). Umfassende Untersuchungen zur Strukturbildung von PB₁₃₀PEO₆₆ in Mikromischern in Abhängigkeit von verschiedenen Mischparametern wie z.B. Gesamtflussrate, Mischverhältnis und Polymerkonzentration wurden von Raphael Thiermann im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.¹⁰⁷

Der Einfluss der jeweiligen Parameter auf die Strukturbildung soll nachfolgend kurz erläutert und die Kontrollmöglichkeiten diskutiert werden.

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1. erwähnt, konnte mit Hilfe der Simulationsmethode *Dissipative Partikel Dynamik* (DPD) der Prozess der Selbstorganisation von Amphiphilen in drei Phasen beschrieben werden.⁸⁶

Zuerst bilden sich sehr schnell Mizellen (1), diese wachsen an und organisieren sich nachfolgend zu Doppelschichten (2). Mizellen und Doppelschichtfragmente diffundieren und fusionieren zu größeren Lamellen, bis es zur Schließung der Membranen in Vesikelstrukturen kommt (3).

Bei diesem Prozess spielt die Polymerkonzentration eine entscheidende Rolle. Je höher die Konzentration ist, desto schneller wachsen Mizellen zu Doppelschichten an und desto frühzeitiger können Vesikel gebildet werden. Bei höheren Konzentrationen werden entsprechend größere Vesikel im Vergleich zu geringerer Polymerkonzentration gebildet.

In Übereinstimmung mit der Simulation wurde diese Konzentrationsabhängigkeit experimentell auch im Mikromischer bestätigt.¹⁰⁷ Mit abnehmender Polymerkonzentration wurden die Vesikel kleiner. Bei Unterschreitung einer bestimmten Polymerkonzentration wurden ausschließlich Mizellen erhalten, obwohl die Vesikelstruktur für dieses Polymer thermodynamisch bevorzugt ist. Offenbar befand sich in diesem Fall nicht genügend Material in der Umgebung einer Mizelle, sodass diese nicht weiter anwachsen konnte. In einem sehr engen Konzentrationsbereich, der nahe der

minimalen Konzentration lag, bei welcher noch Vesikel gebildet wurden, konnten zudem scheibenförmige Doppellagen in Kryo-TEM-Aufnahmen visualisiert werden.¹⁰⁷ Diese Zwischenstufe deutet auf den Vesikel-Bildungsmechanismus hin, welcher ausgehend von der Kugelmizelle über anwachsende Doppelschichten schließlich in der Vesikelstruktur endet.

Die Strukturbildung im Mikromischer erfolgt mit zunehmender Konzentration an selektivem Lösungsmittel innerhalb drei aufeinanderfolgender Bereiche entlang der Mischstrecke (Vgl. Abb. 2.9, Abschnitt 2.3.2.2):

- Die Polymerketten liegen molekular vor. Das Lösungsmittelgemisch ist unselektiv.
- Die Polymeraggregation startet. Das Lösungsmittelgemisch ist selektiv, Diffusion einzelner Unimere ist jedoch möglich.
- Der Abbruch der Selbstorganisation bzw. das Einfrieren der Aggregatstruktur erfolgt, sobald der Anteil an selektivem Lösungsmittel die Diffusion einzelner Unimere verhindert.

Durch Variation verschiedener Mischparameter können die Grenzen zwischen den einzelnen Bereichen innerhalb der Mischkammer verschoben und damit die Selbstorganisation kontrolliert beeinflusst werden.

Vormischung:

Wird der Wasseranteil in der Polymer-Startlösung erhöht, so kann der Beginn der Selbstorganisation in Richtung Mischkammer-Eingang verschoben werden. Auf diese Weise wird der Bereich erweitert, in dem das Lösungsmittelgemisch selektiv ist, die Diffusion der Polymerketten aber noch möglich ist. Folglich bleibt dem System mehr Zeit zur Selbstorganisation, wodurch ähnlich wie bei einer Erhöhung der Polymerkonzentration größere Vesikel gebildet werden können. Der Wasseranteil in der Vormischung ist auf einen maximalen Wert beschränkt, bei welchem noch keine Strukturbildung einsetzen darf. Dieser liegt für PB-*b*-PEO-Polymere, wie zuvor erwähnt, bei maximal 50 % Wasser in der Polymer-Startlösung.¹⁹⁹ Wird hingegen auf eine Vormischung verzichtet, so müssen asymmetrische Flussraten gewählt werden, damit am Mischer-Ausgang die THF-Konzentration unterhalb der für den Abbruch notwendigen 30 % liegt. Unter diesen asymmetrischen Flussbedingungen wurden vorwiegend

Kugelmizellen gebildet, was vermutlich durch verkürzte Mischzeiten auf Grund von vermehrt auftretenden Turbulenzen am Mischkammer-Eingang zurückzuführen ist.¹⁰⁷

Flussratenabhängigkeit:

Analog zur Vesikelherstellung im Batch mit der Co-Lösungsmittelmethode, bei welcher mit zunehmender Eintropfgeschwindigkeit des selektiven Lösungsmittels die Vesikelgröße abnimmt, wird auch durch Erhöhung der Gesamtflussrate die Größe der Vesikel verringert. Die kontrollierte Herstellung sehr einheitlicher PB₁₃₀-PEO₆₆-Vesikel unterschiedlicher Größe wurde im Mikromischersystem bereits erfolgreich realisiert.¹⁰⁸ Bei variierenden Gesamtflussraten von 0,2 mL/min bis 9,6 mL/min und ansonsten konstanten Mischbedingungen (Vormischung: 50 % THF/Wasser (w/v)), 4g/L Polymer-Startkonzentration, Mischverhältnis 1:1) wurden Vesikel mit hydrodynamischen Radien zwischen 47 nm und 28 nm mit engen Größenverteilungen ($\mu_2 < 0,05$) erhalten (μ_2 als Maß der Polydispersität, vgl. Abschnitt 3.1.2). Bei sehr hohen Flussraten über 9,6 mL/min lassen sich im Mikromischersystem sehr kurze Mischzeiten realisieren, welche offenbar in der Größenordnung der Selbstorganisation des PB₁₃₀PEO₆₆-Polymers liegen (Abschnitt 2.3.2). Auf diese Weise wird auch die Herstellung von Kugelmizellen als eine Vorstufe der Vesikel ermöglicht.

Zusammengefasst lassen sich vereinfacht allgemeine Tendenzen erkennen, in welcher Weise mit den jeweiligen Mischparametern auf die Strukturbildung Einfluss genommen werden kann (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Einfluss verschiedener Parameter auf die Herstellung von PB₁₃₀-PEO₆₆-Vesikeln

Parameter	min	max	Vesikelgröße	Kugelmizellen
Polymerkonzentration ↑	0,7 g/L	4 g/L	↑	Ja bei min
Wasseranteil in Polymer-Startlösung ↑	0 %	50 %	↑	Ja bei min
Gesamtflussrate ↑	0,2 mL/min	10 mL/min	↓	Ja bei max
↑↓Allgemeine Tendenz bei sonst vergleichbaren Mischparametern				

Die Mikromischer-Technologie ermöglicht damit, aus PB₁₃₀-PEO₆₆ sowohl vesikuläre als auch kugelmizellare Strukturen in kontrollierter Weise herzustellen.

Eine Übersicht sämtlicher Nanostrukturen der verschiedenen verwendeten PB-*b*-PEO-Polymere befindet sich in Tab. 4.4 am Ende dieses Abschnitts.

Abb. 4.1 zeigt TEM-Aufnahmen von zwei Proben, die aus PB₁₃₀PEO₆₆-OH mit Hilfe des Mikromischers hergestellt und zur Fixierung mittels Gammastrahlung nachträglich vernetzt wurden. Dieses Vorgehen zur Vernetzung der Nanostrukturen hat nachweislich keinen maßgeblichen Einfluss auf die Struktur.¹¹²

Auf Ergebnissen aus Vorexperimenten beruhend wurden für die Vesikelherstellung symmetrische Flussbedingungen gewählt, da diese die besten Resultate im Hinblick auf eine möglichst enge Größenverteilung geliefert hatten. Wie bereits erwähnt, wird ein ausreichend hoher Anteil des selektiven Lösungsmittels am Mischerausgang benötigt, um stabile Nanostrukturen zu erhalten. Folglich sollte die Polymer-Startlösung bereits einen gewissen Anteil an selektivem Lösungsmittel enthalten. Bei einer Vormischung von THF/H₂O (50/50 %v/v) und unter symmetrischen Mischbedingungen wurden Vesikel (3 g/L Polymer, Gesamtflussrate 1,2 mL/min) und, mit einer Erhöhung der Flussrate (9,6 mL/min) sowie einer verringerten Polymer-Startkonzentration (0,7 g/L) auch Kugelmizellen aus dem bevorzugt vesikelbildenden Polymer erhalten.

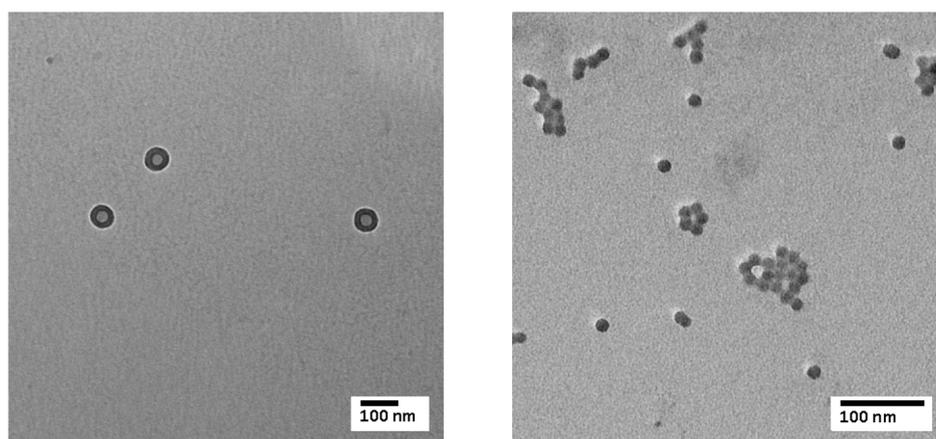


Abb. 4.1: TEM-Aufnahmen vernetzter Proben von Kugelmizellen (links) und Vesikeln (rechts) aus PB₁₃₀PEO₆₆-OH: Die Proben wurden mit dem Raupenmischer CPMM-R300 hergestellt: Mischverhältnis Wasser/Polymerlösung 1:1, Polymerlösung in THF/H₂O (50/50 %v/v), Gesamtflussrate für Mizellenbildung 9,6 mL/min mit Polymerkonzentration 0,7 g/L und 1,2 mL/min mit 3 g/L Polymerkonzentration für die Vesikelherstellung.

Die Analyse der hergestellten Vesikel mittels dynamischer Lichtstreuung ergab einen mittleren hydrodynamischen Radius von 45 nm ($\mu_2 = 0,05$). Die Kugelmizellen wiesen einen mittleren hydrodynamischen Radius von 17 nm auf. Nach Bermudez et al. besteht mit $d \sim M_h^b$ (mit $b = 0,5$ bis $0,66$) ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht des hydrophoben Blocks und der Dimension der Vesikelmembran.²⁰² Daraus würde sich für PB₁₃₀PEO₆₆-Vesikel eine Membrandicke (hydrophobe Schicht) von 14,9 nm ergeben, welche mit den TEM-Aufnahmen in guter Übereinstimmung steht. Gleichzeitig würde die Membrandicke damit der minimalen Größe einer Kugelmizelle entsprechen. Addiert man dazu die PEO-Schicht, welche ca. 4 nm auf beiden Seiten ausmacht, ergibt sich für die Gesamtmembrandicke 22,9 nm.²⁰¹ Übertragen auf die Kugelmizelle würde dies somit im TEM einem Durchmesser (hydrophober Kern) von 14,9 nm entsprechen und einen minimalen hydrodynamischen Durchmesser von 22,9 nm ($R_h = 11,5$ nm) ergeben. Beide Werte für die hergestellten Kugelmizellen sind jedoch etwas größer als erwartet. Jain & Bates zeigten bereits ähnliche Beobachtungen im Bezug auf die Dimensionen von PB-*b*-PEO-Nanostrukturen.¹¹¹ Dabei waren bei gleicher hydrophober Blocklänge die gemessenen Durchmesser von Mizellen im Vergleich zur Membrandicke von Vesikeln größer. Zylindrische Mizellen aus PB-*b*-PEO-Polymeren gleicher hydrophober Blocklänge wiesen Durchmesser auf, welche zwischen dem entsprechender sphärischer Mizellen und der Membrandicke vesikulärer Strukturen lagen. Jain & Bates erklärten diesen Zusammenhang über die eingeschränkte Dynamik sphärischer Mizellen in Bezug auf die thermodynamische Optimierung ihrer Dimension. Zylindrische Mizellen beispielsweise können ihre Durchmesser verringern, indem sie in die Länge wachsen, wodurch sie ihre Dimensionen und somit den Grad der Polymerstreckung mit der Grenzflächenenergie ins Gleichgewicht bringen. Vesikuläre Strukturen können ihre Größe spontan anpassen, jedoch nur unter der Voraussetzung, dass Wasser aus dem inneren Lumen hinaus oder Wasser von außen über die Membran ins Innere des Vesikels diffundieren kann. Ein weiterer dynamischer Prozess kann auch über den sogenannten „*Flip-Flop*“-*Mechanismus* gegeben sein, welcher den Transfer einzelner Moleküle von einer Seite zur anderen beschreibt. Jedoch setzt dies einen gewissen Grad an Fluidität der Doppellage und eine hohe Beweglichkeit der amphiphilen Moleküle voraus.

Die Herstellung von Vesikeln und Kugelmizellen aus dem carboxylierten Polymer PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH erfolgte prinzipiell analog. Der mittlere hydrodynamische Radius der kleinsten Mizellen, welche hergestellt werden konnten, betrug ebenfalls 17 nm. Unter gleichen Mischbedingungen, aber mit einer Erhöhung der Polymerkonzentration in der Startlösung von 0,7 g/L auf 2 g/L wurden weiterhin überwiegend Mizellen hergestellt, welche jedoch im mittleren hydrodynamischen Radius auf 22 nm ($\mu_2 = 0,16$) anwuchsen. Die Analyse mittels TEM zeigte vereinzelt (< 1 : 1000) auch Vesikelstrukturen. Die Auswertung der TEM-Messungen der vernetzten, getrockneten Probe ergab einen mittleren Durchmesser des hydrophoben Kerns der Mizellen von 18 ± 5 nm. Zur Ermittlung des Molgewichts der Aggregatstruktur wurde auch statische Lichtstreuung durchgeführt. In Abb. 4.2 sind der Zimm-Plot und eine TEM-Aufnahme der getrockneten Probe nach Vernetzung gezeigt.

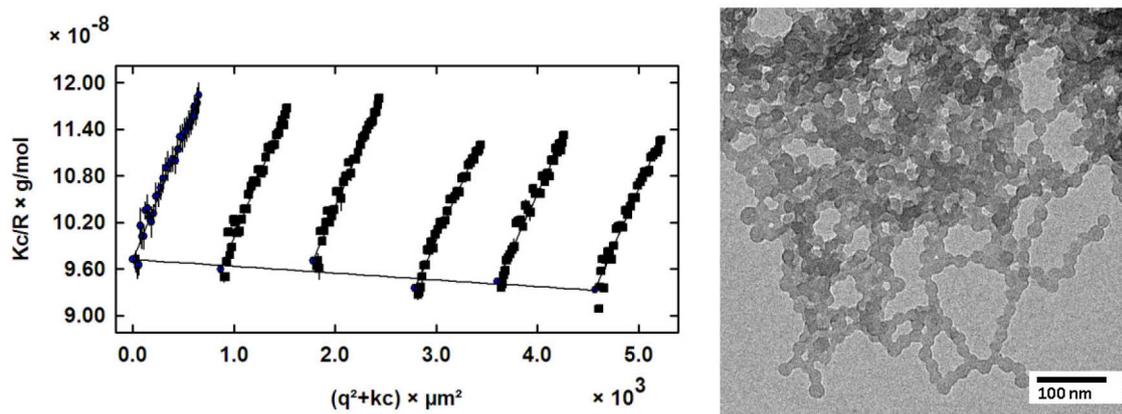


Abb. 4.2: Analyse von Kugelmizellen aus PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH: Statische Lichtstreuung wurde bei folgenden Konzentrationen gemessen: $c_1 = 24,65$ mg/L, $c_2 = 19,45$ mg/L, $c_3 = 15,03$ mg/L, $c_4 = 9,61$ mg/L, $c_5 = 4,69$ mg/L. Aus dem Zimm-Plot (links) wurde das Gewichtsmittel der Molmasse $M_w = 1,027 \cdot 10^7$ g/mol (y-Achsenabschnitt), der Trägheitsradius $\langle R_g \rangle = 31$ nm (als $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}$) und der 2. Virialkoeffizient A_2 mit $-8,1 \cdot 10^{-8}$ mol dm^3/g^2 ermittelt. Die TEM-Aufnahme (rechts) zeigt die getrocknete Probe der Kugelmizellen (0,5 g/L Polymer) nach Vernetzung durch γ -Strahlung. Ausmessungen ergaben einen mittleren Durchmesser (hydrophober Kern) von 18 ± 5 nm.

Aus dem gemessenen Gewichtsmittel der Molmasse von $M_w = 1,027 \cdot 10^7$ g/mol lässt sich die Aggregationszahl $\langle Z \rangle$ berechnen. Mit 11000 g/mol für das PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH-Blockcopolymer ergibt sich damit $\langle Z \rangle \approx 934$ Blockcopolymere pro Kugelmizelle. Diese relativ hohe Aggregationszahl könnte auf die starke Selektivität des Wassers und die damit hohe Grenzflächenenergie zwischen hydrophobem Block und umgebendem Wasser zurückzuführen sein. Damit strebt das System in Richtung weniger, größerer Aggregate, um ungünstige Grenzflächeneffekte möglichst zu minimieren. Die ermittelte

Aggregationszahl bzw. das Gewichtsmittel der Molmasse steht zudem in Einklang zu früheren Messungen von Vesikeln des gleichen Polymers (Tab.4.3).

Neben dem mittleren Molekulargewicht kann aus der statischen Lichtstreuung auch der Trägheitsradius R_g ermittelt werden. Zusammen mit dem hydrodynamischen Radius aus der dynamischen Lichtstreuung können über das sogenannte ρ -Verhältnis R_g/R_h in gewissem Maße auch Aussagen über die Partikelgeometrie gemacht werden. Der theoretische Wert für das ρ -Verhältnis von Hohlkugeln liegt bei 1. Wie in Tab. 4.3 gezeigt, ergaben sich für die Polymervesikel verschiedener Größen jeweils Werte um $\rho = 1$ und entsprechen demnach den Erwartungen.

Für die gemessene Probe aus Kugelmizellen ergibt sich für das ρ -Verhältnis ein Wert von 1,41. Dieser Wert liegt damit zwischen dem theoretischen ρ -Verhältnis für homogene harte Kugeln (0,775) und dem eines idealen Polymerknäuels, welcher 1,505 ist (vgl. Tab. 3.1, Abschnitt 3.1.3).¹⁸⁸ Das ρ -Verhältnis ist sensitiv für das Dichteprofil der Mizelle. So unterscheiden sich beispielsweise sogenannte *crew-cut* Mizellen, bei welchen der hydrophobe Kern sehr viel größer ist als die hydrophile Korona, von *star-like* Mizellen, bei welchen das Verhältnis von Kern und Korona genau umgekehrt ist. Für erstgenannte liegt das ρ -Verhältnis im Allgemeinen näher an 0,775 und für letztgenannte kann das ρ -Verhältnis auch über 1 liegen.^{81, 203} Die relativ hohe Aggregationszahl lässt zudem vermuten, dass es sich nicht mehr um vollständig sphärische Mizellen handelt, sondern dass sich auf Grund der erhöhten Polymerkonzentration bereits kurze Stäbchen oder kleinere scheibenförmige Mizellen gebildet haben. Das Vorhandensein anisotroper Strukturen könnte sowohl für das ρ -Verhältnis (für starre Stäbchen $R_g/R_h > 2$) als auch für die relativ hohe Polydispersität ($\mu_2 = 0,16$) eine Erklärung sein. Der vergleichsweise hohe μ_2 -Wert kann auch auf das Vorhandensein vereinzelter Vesikelstrukturen zurückzuführen sein. Diese wurden, wie bereits erwähnt, in sehr geringer Anzahl auch in der TEM-Analyse nachgewiesen. Die bimodale Verteilung würde demnach ebenfalls den recht hohen Wert für das ρ -Verhältnis erklären.

Aus dem ZIMM-Plot lässt sich zudem der 2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks ermitteln. Der A_2 -Wert für die gemessene Probe ist negativ (Steigung der unteren Geraden). Dies weist auf leichte attraktive Wechselwirkungen zwischen den Kugelmizellen untereinander hin. Möglicherweise spielt dabei die Konformation der EO-Segmente eine Rolle (vgl. 4.1.4). Eine Konformationsänderung kann die Hydrophilie des

PEO-Blocks verringern, wodurch die Qualität des Lösungsmittels (Wasser) abnimmt und interpartikuläre Wechselwirkungen verstärkt werden. In Abschnitt 4.1.4 wird nochmals Bezug auf die mögliche Konformationsänderung der EO-Segmente genommen und der Einfluss auf die Wechselwirkungen mit Proteinen und Zellen diskutiert.

Tab. 4.3: Analyse verschiedener Nanostrukturen aus PB₁₃₀PEO₆₆-COOH mittels SLS und DLS

M _w (g/mol)	<R _h > (nm)	<R _g > (nm)	μ ₂	Morphologie	ρ = R _g /R _h
1,0·10 ⁷	22	31	0,16	Kugelmizelle	1,41
2,6·10 ⁷	30	28	0,05	Vesikel	0,93
7,8·10 ⁷	44	47	0,08	Vesikel	1,07
2,4·10 ⁸	65	64	0,05	Vesikel	0,98

dn/dc wurde über das Massenverhältnis der Blöcke gewichtet mit dn/dc = 0,185 abgeschätzt
 <R_g>: Wurzel des z-Mittels des Trägheitsradienquadrats <R_g²>_z^{1/2} aus statische Lichtstreuung;
 <R_h>: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels <1/R_h>_z aus dynamischer Lichtstreuung
 Die Daten der drei aufgeführten Vesikelproben wurden aus der Dissertation von Waltraut Müller entnommen.²⁰¹

4.1.1.2 PB₁₃₀-PEO₁₂₀

Das PB₁₃₀PEO₁₂₀-OH unterscheidet sich von dem zuvor diskutierten PB₁₃₀PEO₆₆-Polymer lediglich durch den längeren PEO-Block ($f_{PEO} = 0,29 \rightarrow 0,43$). Nach dem auf experimentellen Daten basierenden Phasendiagramms (vgl. Abb 2.11, Abschnitt 2.3.3.2) bildet PB₁₃₀PEO₁₂₀ zylindrische Mizellen als thermodynamisch bevorzugte Morphologie in Wasser.^{79, 111, 198} Um die thermodynamisch bevorzugte Struktur zu erhalten, werden die Blockcopolymere im Allgemeinen direkt in Wasser dispergiert. Auf Grund des relativ großen hydrophoben Blockes ist dieses Verfahren jedoch sehr zeitaufwändig und würde kontinuierliches Rühren über mehrere Tage (> 5) bedeuten.¹⁹⁸ Demzufolge wurde eine zeiteffizientere Herstellung von Nanostrukturen aus diesem Polymer angestrebt.

Beim Design des Mischereperiments sind die gleichen Grundsätze wie zuvor beschrieben von Gültigkeit. Um die thermodynamisch bevorzugte Struktur zu erhalten,

muss demnach zum einen eine ausreichend hohe Polymerkonzentration vorliegen und zum anderen dem System genügend Zeit bleiben, um sich selbst orientieren zu können.

Abb. 4.3 zeigt TEM-Aufnahmen von im Mikromischer hergestellten zylindrischen Mizellen. Die Enden der Zylinder sind auf Grund der starken Krümmung relativ instabil.²⁰⁴ Dadurch wird das Längenwachstum der zylindrischen Mizellen bevorzugt, sodass Filament-Längen von mehreren μm gebildet werden können. Die fadenförmigen Mizellen enden im Allgemeinen in kugelmizellaren Strukturen, was zu einer energetisch begünstigten Vergrößerung des Krümmungsradius führt. Des Weiteren sind zum Teil Verzweigungen innerhalb einer Fadenstruktur zu erkennen. Die Tendenz zur Ausbildung von Netzwerkstrukturen wurde insbesondere für PB-*b*-PEO-Blockcopolymer mit hohem Molekulargewicht bereits beschrieben.¹¹¹

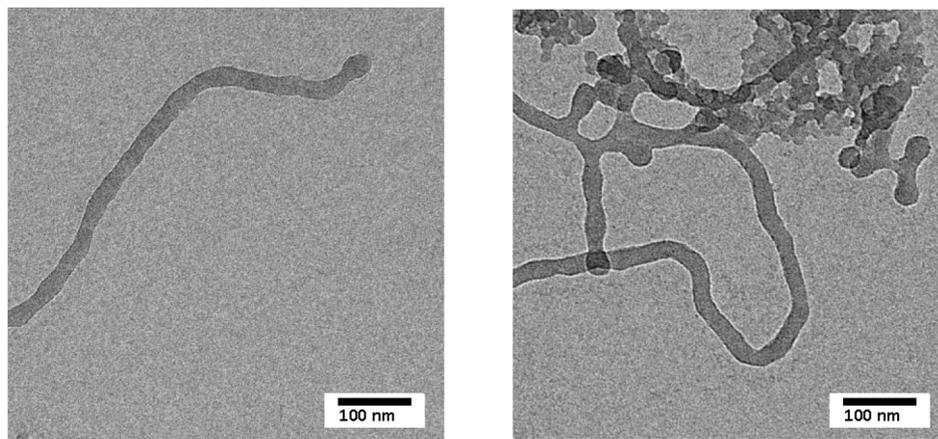


Abb. 4.3: TEM-Aufnahmen einer getrockneten Probe aus PB₁₃₀PEO₁₂₀-OH nach Vernetzung durch γ -Strahlung: Die Probe wurden mit dem Raupenmischer CPMM-R300 hergestellt: Mischverhältnis Wasser/Polymerlösung 1:1, Polymerlösung in THF/H₂O (70/30 %v/v), Gesamtflussrate von 1 mL/min mit 7,3 g/L Polymerkonzentration. Es bildeten sich bevorzugt zylindrische Mizellen (links), welche z.T. Verzweigungen aufweisen und mit Kugelmizellen verschmelzen (rechts).

Die Mikromischertechnologie ermöglicht auch aus PB₁₃₀PEO₁₂₀-OH die Herstellung sphärischer Mizellen. Eine Erhöhung der Flussrate (9,6 mL/min) bei gleichzeitiger Verringerung der Polymerkonzentration (0,7 g/L) unter Beibehaltung der weiteren Mischparameter führt zur Bildung von Kugelmizellen aus dem bevorzugt Zylinderstrukturen bildenden Polymer (Abb 4.4 links). Die Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung ergab für die hergestellten Kugelmizellen einen mittleren hydrodynamischen Radius von 16 nm. Die Probe zeigte kaum Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten und mit $\mu_2 = 0,1$ eine vergleichsweise geringere

Polydispersität. Die Zylindermizellen hingegen wiesen in der dynamischen Lichtstreuung starke Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten (Abb. 4.4 rechts) und hohe Polydispersität ($\mu_2 > 0,2$) auf. Die starke Winkelabhängigkeit ist dabei nicht nur ein Ergebnis der vergleichsweise hohen Polydispersität, sondern vielmehr auch durch den Einfluss des Partikelförmfaktors begründet. So zeigt beispielsweise das Tabakmosaikvirus, welches oftmals als monodisperses Modellsystem eines idealen Stäbchens in der Lichtstreuung verwendet wird, eine ähnliche charakteristische Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten.²⁰⁵ Die Analyse flexibler zylindrischer Mizellen in der dynamischen Lichtstreuung ist damit wesentlich komplexer als für sphärische Partikel. Für anisotrope Brown'sche Partikel wird die Fluktuation der Streuintensität nicht nur durch translatorische, sondern auch durch rotatorische Bewegungen der Partikel bedingt. Es gibt verschiedene Modelle, welche den Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizienten und Stäbchengeometrie beschreiben. Die translatorische Diffusion von stäbchenförmigen Teilchen setzt sich aus zwei unterschiedlichen Prozessen zusammen; eine schnellere Diffusion parallel zur Stab-Achse und eine langsamere Bewegung senkrecht zur Achse. Die rotatorische Bewegung kann für sehr lange Stäbchen im DLS-Experiment auf Grund der vergleichsweise langen Diffusionsdistanz vernachlässigt werden. Ein auf den Berechnungen von Broersma 1960 basierendes, vereinfachtes Modell beschreibt den translatorischen Diffusionskoeffizienten starrer Stäbchen wie folgt:^{188, 206}

$$D_t = \frac{k_B T \ln\left(\frac{L}{d}\right)}{3\pi\eta L} \quad \text{Gl. 4.1}$$

k_B : Boltzmann-Konstante

T : absolute Temperatur

$\frac{L}{d}$: Aspektverhältnis (L Länge, d Querschnitts-Durchmesser)

η : Viskosität

Für die Zylindermizellen mit einem angenommen Querschnitts-Durchmesser von 32 nm (Durchmesser der hydrophoben Schicht von 22 nm addiert mit der umrundende PEO-Schicht von 5 nm), ergibt sich damit aus der dynamischen Lichtstreuung eine mittlere Fadenlänge von 352 nm. Zylindermizellen dieses Polymers können durchaus Filament-Längen von bis zu mehreren μm aufweisen. Dazu sei angemerkt, dass es sich bei dem verwendeten Modell, um die Beschreibung von steifen Stäbchen handelt. Auf Grund der

hohen Flexibilität der Polymerfäden könnte es daher zu einer Unterbestimmung der Filament-Länge in der Lichtstreuung kommen.²⁰⁷

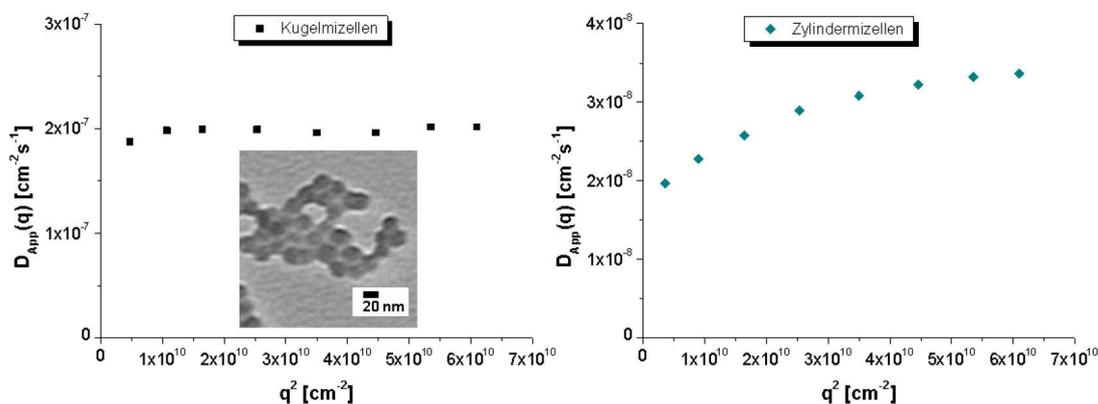


Abb. 4.4: Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten aus der dynamischen Lichtstreuung von Kugel- und Zylindermizellen aus dem Blockcopolymer PB₁₃₀PEO₁₂₀-OH. Aus der DLS-Analyse der Kugelmizellen lässt sich aus $\langle D \rangle_z$ ($= D_{\text{app}}$ für $q \rightarrow 0$) über die Stokes-Einstein-Gleichung mit $D = k_B T / (6 \pi \eta R_h)$ ein mittlerer hydrodynamischer Radius von $\langle 1 / R_h \rangle_z^{-1} = 16$ nm ermitteln. Die TEM-Aufnahme (links) zeigt Kugelmizellen mit einem mittleren Durchmesser des hydrophoben Kerns von 22,5 nm. Demnach würde in wässriger Umgebung die PEO-Hülle der Mizelle eine Schichtdicke von ca. 5 nm aufweisen. Die Länge L der Zylindermizellen wurde mit $D = k_B T \ln(L/d) / (3 \pi \eta L)$ ^{188, 206} und $d = 32$ nm auf 352 nm bestimmt (rechts).

4.1.1.3 PB₃₂PEO₂₉

Die deutlich kürzeren Blockcopolymere PB₃₂PEO₂₉-OH bzw. PB₃₂PEO₂₉-COOH sind, abhängig von der Präparationsmethode, in der Lage, Nanostrukturen verschiedener Morphologie zu bilden: sowohl sphärische und zylindrische Mizellen als auch Vesikel. Die thermodynamisch bevorzugte Struktur liegt mit 43 % PEO und $N_{\text{PB}} = 32$ an der Grenze zwischen Lamelle (Vesikel) und zylindrischer Mizelle (vgl. Abb 2.11, Abschnitt 2.3.3.2). Die Endgruppe, Hydroxyl- oder Carboxylgruppe, beeinflusst dabei maßgeblich die resultierende Strukturbildung. Das Hydroxyl-Polymer tendiert in der Selbstorganisation in Richtung zylindrischer Mizellen, während die geladene Kopfgruppe des Carboxyl-Polymers das System in Richtung vesikulärer Strukturen als bevorzugte Morphologie verschiebt. Diese veränderte Selbstorganisation von Hydroxyl- zu Carboxyl-PEO-Endgruppe wurde bereits von Maskos et al. 2006 beschrieben.⁷⁹ Die geladene Endgruppe kann auf Grund von Wechselwirkungen (pH-abhängig) zwischen der Carboxylgruppe und der Polyethylenoxid-Kette zu einer Streckung des hydrophilen

Blocks führen.²⁰⁸ Dadurch wird die eingenommene Fläche der Kopfgruppe im Vergleich zur ungeladenen Endgruppe verringert. Auf diese Weise verändert sich die Form des Moleküls und damit die bevorzugte Strukturbildung (vgl. Abschnitt 2.2).

Nach direktem Dispergieren des Polymers in Wasser und Rühren über mehrere Tage, kann von der Annäherung an ein thermodynamisches Gleichgewicht ausgegangen werden. Dies führt für das PB₃₂PEO₂₉-OH Polymer nahezu ausschließlich zur Bildung von Zylindermizellen, während sich das PB₃₂PEO₂₉-COOH Polymer vorwiegend in vesikuläre Strukturen organisiert, neben welchen nur vereinzelt Zylindermizellen vorkommen.⁷⁹ Wird das Dispergieren durch erhöhten Energieeintrag mittels Ultraschall beschleunigt und die erhaltene Dispersion anschließend durch eine Polycarbonatmembran extrudiert, so werden aus beiden Polymeren vesikuläre Strukturen erhalten (Abb 4.5).

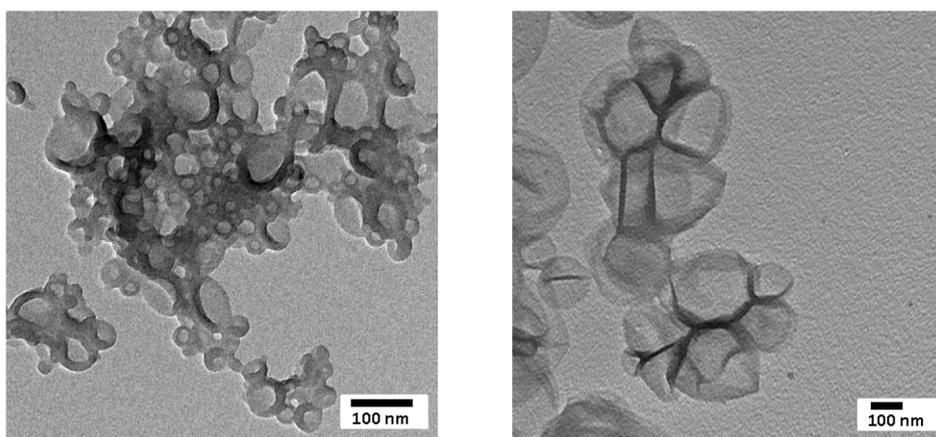


Abb. 4.5: TEM-Aufnahme vernetzter, getrockneter Proben von Polymervesikeln aus PB₃₂PEO₂₉-OH (links) und PB₃₂PEO₂₉-COOH (rechts). Je 5 g/L Polymer wurden in Wasser im Ultraschallbad dispergiert und anschließend 50 mal durch eine Polycarbonatmembran extrudiert (Porengröße 100 nm).

Das Carboxyl-Polymer bildet dabei auch nach 50-facher Extrusion durch Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 100 nm generell etwas größere Vesikelstrukturen ($R_h = 69$ nm, $\mu_2 = 0,11$) im Vergleich zu den gebildeten Hydroxyl-Vesikeln ($R_h = 63$, $\mu_2 = 0,14$). Die Ursache dafür ist vermutlich in der unterschiedlichen Ausgangsstruktur vor der Extrusion zu finden. Das Carboxyl-Polymer liegt in der Ausgangsdispersion bereits größtenteils in Vesikelstrukturen vor, daher dient die Extrusion überwiegend einer Zerteilung in kleinere Vesikel. Das Hydroxyl-Polymer bildet hingegen vorwiegend Zylindermorphologie in der Ausgangsdispersion aus. Des

Weiteren führt wie bereits erwähnt die Carboxylgruppe zu einer Streckung des hydrophilen Blocks und damit zu einer Verkleinerung der Fläche, welche die Kopfgruppe beansprucht. Dadurch ist die Tendenz zur Lamellenbildung im Vergleich zum Hydroxyl-Polymer verstärkt und die Ausbildung größerer Vesikel begünstigt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das längere PB₁₃₀-PEO₆₆ im Mikromischer beobachtet. So bildete das carboxylierte Polymer tendenziell etwas größere Vesikelstrukturen als das den gleichen Mischbedingungen ausgesetzte Hydroxyl-Polymer.¹⁰⁷

Im Mikromischer konnten aus den kurzkettigen PB-*b*-PEO-Polymeren keine vesikulären Strukturen erhalten werden. Auch im Batch-Experiment mittels Co-Lösungsmittelmethode wurde keine Vesikelbildung erzielt. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Interaktion des Co-Lösungsmittels mit dem Blockcopolymer die Strukturbildung entscheidend beeinflusst. Das Co-Lösungsmittel THF führt demnach wahrscheinlich zu einer erhöhten Quellung des PEO-Blocks. Daraus resultiert eine Änderung der Volumenverhältnisse der beiden Segmente, was wiederum zu einer Verschiebung der bevorzugten Aggregationsmorphologie von lamellaren Strukturen (Vesikel) in Richtung kugelmizellarer Strukturen führt. Abhängig von der Flussrate und der Polymerkonzentration wurden aus den PB₃₂PEO₂₉-Polymeren Kugelmizellen und zylindrische Mizellen im Mischer hergestellt (Abb. 4.6).

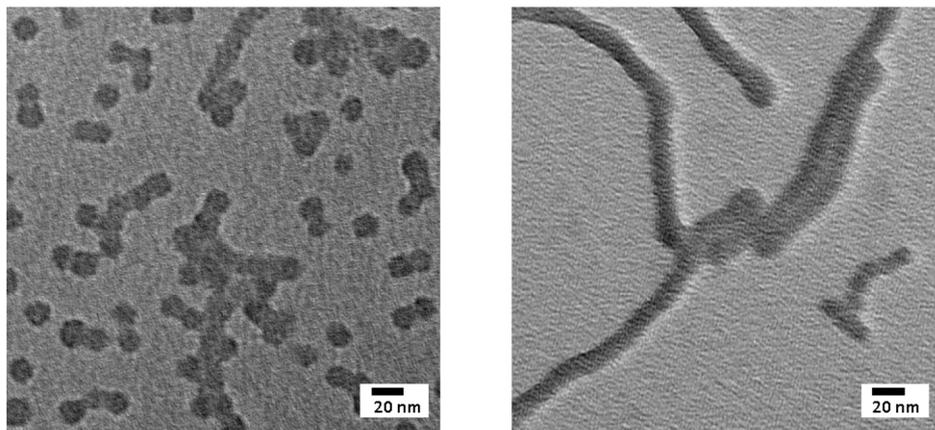


Abb. 4.6: TEM-Aufnahmen getrockneter vernetzter Proben von Nanostrukturen aus PB₃₂PEO₂₉: Kugelmizellen (links) und Zylindermizellen (rechts). Die Proben wurden mit dem Raupenmischer CPMR-R300 hergestellt: Mischverhältnis Wasser/Polymerlösung 1:1, PB₃₂PEO₂₉-OH Polymerlösung in THF/H₂O (30/70 %v/v), Gesamtflussrate von 1 mL/min mit 7,3 g/L Polymerkonzentration ergab vorwiegend zylindrische Mizellen, sphärische Mizellen wurden mit 3,6 mL/min und einer Polymerkonzentration von 1,5 g/L hergestellt (hier gezeigt PB₃₂PEO₂₉-COOH).

In Tab 4.4 ist eine Übersicht aller hergestellten Nanostrukturen aus den unterschiedlichen PB-*b*-PEO-Blockcopolymeren gegeben.

Tab. 4.4: Zusammenfassung der PB-*b*-PEO-Nanostrukturen mit ihren Dimensionen

Polymer	Morphologie	f_{PEO}	M_{PB} (g/mol) ^a	$d(\text{nm})^b$	Hydrodynamische Größe (nm) ^c Radius/Länge (Zylinder)
PB ₁₃₀ PEO ₆₆ -OH	Vesikel	0,29	7020	15±3 (14,9)	45 ($\mu_2=0,05$)
	Kugelmizelle	0,29	7020	17±4	17 ($\mu_2=0,16$)
PB ₁₃₀ PEO ₆₆ -COOH	Vesikel	0,29	7020	15±3 (14,9)	47 ($\mu_2=0,06$)
	Kugelmizelle	0,29	7020	18±5	22 ($\mu_2=0,16$)
PB ₁₃₀ PEO ₁₂₀ -OH	Zylindermizelle	0,43	7020	22±3	352 ($\mu_2=0,21$)
	Kugelmizelle	0,43	7020	23±5	16 ($\mu_2=0,2$)
PB ₁₃₀ PEO ₁₂₀ -COOH	Zylindermizelle	0,43	7020	22±4	368 ($\mu_2=0,22$)
	Kugelmizelle	0,43	7020	23±5	17 ($\mu_2=0,2$)
PB ₃₂ PEO ₂₉ -OH	Vesikel	0,43	1730	8±2 (7,9)	63 ($\mu_2=0,14$)
	Zylindermizelle	0,43	1730	13±3	356 ($\mu_2=0,23$)
	Kugelmizelle	0,43	1730	14±4	13 ($\mu_2=0,13$)
PB ₃₂ PEO ₂₉ -COOH	Vesikel	0,43	1730	9±3 (7,9)	69 ($\mu_2=0,11$)
	Kugelmizelle	0,43	1730	14±4	13 ($\mu_2=0,13$)

^a Molekulares Gewicht des hydrophoben Blocks
^b Dimension d des hydrophoben Anteils: Durchmesser für Kugeln und Zylinder, Wanddicke für Vesikel. Die angegebenen Werte sind Abschätzungen aus TEM-Messungen. Werte in Klammern wurden berechnet nach Bermudez et al. 2002 mit $d \sim M_{\text{PB}}^b$, $b = 0,5$ bis $0,66$.²⁰²
^c Hydrodynamische Größe bestimmt mittels DLS, Radius R_h für Kugelmizellen und Vesikel basierend auf der Stokes–Einstein Gleichung: $D = k_B T / (3\pi\eta R_h)$ und Länge L_{eff} für Zylindermizellen mit $D = k_B T \ln(L/d) / (3\pi\eta L)$.^{188, 206}
 μ_2 als Maß für die Polydispersität mit $\mu_2 = 0,05$ bei 90° Streuwinkel entspricht Polydispersität im Radius von ca. 25%.^{209, 210}

Die angegebenen Dimensionen basieren auf Abschätzungen aus TEM-Aufnahmen und repräsentieren nahezu ausschließlich den hydrophoben Anteil der Struktur, da die PEO-Schicht im trockenen Zustand um die hydrophoben Bereiche kollabiert vorliegt.

Die bevorzugte Strukturbildung wird, wie bereits erwähnt, maßgeblich durch die Polymerkomposition bestimmt. Dennoch lässt sich durch die Präparationsmethode Einfluss auf die Strukturbildung nehmen und so auch thermodynamisch ungünstige Aggregatstrukturen erzeugen. Die Strukturumwandlung geht mit einer Änderung der

Molekülgeometrie einher. Die durch die Kopfgruppe eingenommene Fläche nimmt von der Kugelmizelle über die Zylindermizelle bis zum Vesikel ab. Gleichzeitig verringert sich auch die Streckung der hydrophoben Kette in gleicher Abfolge.²¹¹ Daher zeigten Kugelmizellen in TEM-Aufnahmen im Allgemeinen einen größeren Durchmesser als die Zylinderstrukturen des identischen Polymers. Dies ist besonders deutlich an den Enden der Zylinderstrukturen zu erkennen, welche dort in sphärische Strukturen übergehen (Abb. 4.6 rechts).

Alle PB-*b*-PEO-Nanoaggregate blieben in Größe und Morphologie über mehrere Monate stabil, auch wenn diese nicht der thermodynamisch bevorzugten Strukturen entsprachen. Es wurden generell keine Veränderungen bezüglich der Trübung der Dispersionen beobachtet. Beispielsweise würde eine Umwandlung von Kugelmizellen in vesikuläre Strukturen auf Grund der stärkeren Streuung großer Aggregate durch verstärkte Trübung erkennbar sein. Zusätzlich wurden Lichtstreuexperimente durchgeführt, welche ebenfalls über die Zeit keine Veränderung anzeigten. Diese fehlende Dynamik bzw. sehr langsame Austauschkinetik kann auf die Eigenschaften des PB-*b*-PEO-Polymers zurückgeführt werden. Die positiven Werte des *Flory-Huggins*-Interaktionsparameters mit $\chi_{\text{PB,Wasser}} \approx 3,5$ und $\chi_{\text{PB,PEO}} \approx 0,4$ ($\chi_{\text{PEO,Wasser}} \approx 0,65$)²¹² weisen darauf hin, dass die beiden Blöcke stark segregiert vorliegen und in die hydrophoben Domänen der Aggregatstruktur weder PEO-Ketten noch Wassermoleküle vordringen.¹⁹⁸ Mit zunehmendem Molekulargewicht des hydrophoben Blocks nimmt die Tendenz zur Aggregatbildung stark zu. Gleichzeitig verlängert sich die Verweildauer einer Polymerkette in der Aggregatstruktur. Letztere wird durch die freie Energie der Mizellenbildung bestimmt. Publierte Werte für die Mizellenbildung einer vergleichbaren Kohlenstoffkette mit $\Delta G_{\text{mic}}(-\text{CH}_2-) = -2,85 \text{ kJ/mol}$ und $\Delta G_{\text{mic}}(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-) = +0,8 \text{ kJ/mol}$ bei 25 °C zeigen, dass die freie Diffusion einzelner Polymerketten auf Grund der hohen Energiebarriere verhindert werden kann und so die Aggregatstruktur kinetisch gefangen bleibt.²¹³ Die kritische Aggregationskonzentration fällt dabei exponentiell mit steigender Blocklänge.²¹³

Zeitaufgelöste SANS-Messungen (*small angle neutron scattering*) zur Dynamik von PB-*b*-PEO-Polymeren in Wasser mit Mizellen sphärischer und zylindrischer Morphologie bestätigten zumindest für die Dauer von acht Tagen, dass die Strukturen in Wasser nach ihrer Bildung vollständig erhalten bleiben, ohne dass ein Austausch einzelner Polymerketten stattfindet.²¹⁴ Zudem bewiesen Jain & Bates mit Kryo-TEM-Studien die Stabilität von PB-*b*-PEO Strukturen für PB-Molekulargewichte ab 2000 g/mol über

mehrere Monate.¹¹¹ Das hier verwendete kurzkettige PB₃₂-PEO₂₉ liegt mit $M_{PB} \approx 1700$ g/mol noch etwas unterhalb dieser Marke, dennoch wurden auch hierbei keine merklichen Strukturveränderungen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde eine gewisse Dynamik für Polybutadien in anderen Polymersystemen beobachtet. So berichteten beispielsweise Walther und Müller über die Ausbildung von hydrophoben Polybutadien-Brücken zwischen Mizellen aus Mikroarm-Sternpolymeren aus Polystyrol, Poly(2-vinylpyridin) und Polybutadien in wässriger Umgebung.²¹⁵ Welche Triebkräfte zur Bildung einer solchen thermodynamisch äußerst ungünstigen PB-Wasser-Grenzfläche führen, ist jedoch bislang ungeklärt.

4.1.2 *In-Situ*-Beladung vesikulärer PB-*b*-PEO-Nanostrukturen

Im Hinblick auf die Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen wurde neben der reinen Strukturbildung auch die Möglichkeit der *In-Situ*-Beladung dieser polymeren Nanosysteme untersucht. *In-Situ*-Beladung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Nanostruktur in Gegenwart des Cargos gebildet wird, so dass dieser während der Selbstorganisation eingebaut werden kann. Vesikelstrukturen bieten im Vergleich zu den anderen hergestellten Nanoaggregaten den Vorteil, dass sie sowohl eine hydrophile Beladung in ihrem inneren wassergefüllten Lumen erlauben als auch über die Möglichkeit des Einbaus hydrophober Komponenten in der Vesikelmembran verfügen.

4.1.2.1 Beladung des Vesikellumens mit Phloxin B

Die Beladung mit dem hydrophilen, pH-sensitiven Fluoreszenz-Farbstoff Phloxin B soll zum einen mit Hilfe der pH-Sensitivität Aufschluss über die Membranbeschaffenheit der verschiedenen Vesikel geben und zum anderen die Verfolgung der Polymervesikel über ihre Fluoreszenz *in vitro* beispielsweise bei Zellbindungsstudien ermöglichen. Die Verkapselung von Phloxin B in Vesikelstrukturen aus PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH im Batch-Verfahren wurde von Waltraut Müller im Rahmen ihrer Dissertation bereits erfolgreich durchgeführt.²⁰¹ Die verhältnismäßig dicke Vesikelmembran stellt offenbar eine ausreichend starke Barriere für Protonen dar, so dass der pH-sensitive Farbstoff im Inneren des Vesikels über mehrere Stunden in saurer Umgebung (pH = 1,5) stabil bleibt.¹¹⁶ Auf diesen Experimenten basierend wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Beladungsversuche der vesikulären Strukturen aus dem kürzeren Polymer PB₃₂-PEO₂₉-COOH durchgeführt. Da die Verkapselung bei der hydrophilen Beladung der

Polymersome im Allgemeinen nicht zu 100 % erfolgt, muss der verbleibende freie Farbstoff in der wässrigen Umgebung der Vesikel abgetrennt werden. Für den reinen Nachweis der erfolgreichen Beladung lässt sich die Emission des Farbstoffes außerhalb der Vesikel im sauren pH-Bereich nahezu vollständig löschen und aus der verbleibenden Fluoreszenz Aufschluss über die Beladung des Vesikellumens erhalten.¹¹⁶ Zum Einsatz des hydrophilen Farbstoffes als Marker in Zellexperimenten muss jedoch der freie Farbstoff vollständig entfernt werden. Die Aufreinigung der beladenen Vesikel mittels Dialyse ist für dieses System leider ungeeignet, da der Farbstoff eine sehr hohe Affinität zu verschiedenen Dialysemembranen aufweist und dadurch nicht ausreichend aus dem Inneren des Dialysebeutels herausdiffundieren kann.²⁰¹ Aus diesem Grund wurden präparative Einweg-Gelfiltrationssäulen zur Abtrennung des freien Farbstoffes gewählt.

Die Vesikelbeladung erfolgte für das PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH im Mikromischer durch Zugabe des Farbstoffes in das Wasserreservoir (0,05 mg/mL Farbstoffkonzentration) bei unveränderten Mischparametern. Die DLS-Analyse mit $\langle R_h \rangle = 48$ nm, $\mu_2 = 0,05$ (im Vergleich zu $\langle R_h \rangle = 47$ nm, $\mu_2 = 0,06$ für unbeladene Vesikel) zeigte keinen signifikanten Einfluss des Farbstoffes auf die Vesikelbildung. Die Beladung der Vesikelstrukturen aus PB₃₂-PEO₂₉-COOH erfolgte mittels Filmrehydrierung und anschließender Extrusion mit gleicher Farbstoffkonzentration im Wasser.

Fluoreszenzmessungen nach Abtrennung des freien Farbstoffes über Größenausschlusschromatographie bestätigten die erfolgreiche Beladung der verschiedenen Vesikel, zeigten jedoch auch deutliche Unterschiede in der Vesikelpermeabilität (Abb 4.7). Während Vesikel aus PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH nahezu undurchlässig für Protonen sind, wurde bei den Vesikeln aus dem kürzeren Polymer PB₃₂-PEO₂₉-COOH eine erhebliche Fluoreszenzintensitätsabnahme bei Absenkung des pH-Wertes der umgebenden Lösung schon nach wenigen Sekunden beobachtet. Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit freiem Farbstoff durchgeführt. Dieses zeigt in vergleichbarer Konzentration nahezu keine Restfluoreszenz (< 0,05 %) nach HCl-Zugabe. Kontrollexperimente mit Zugabe von Wasser anstelle der Säure zeigten keine signifikante Fluoreszenzintensitätsabnahme. Daher kann ein Verdünnungseffekt als Ursache für die Fluoreszenzlöschung ausgeschlossen werden.

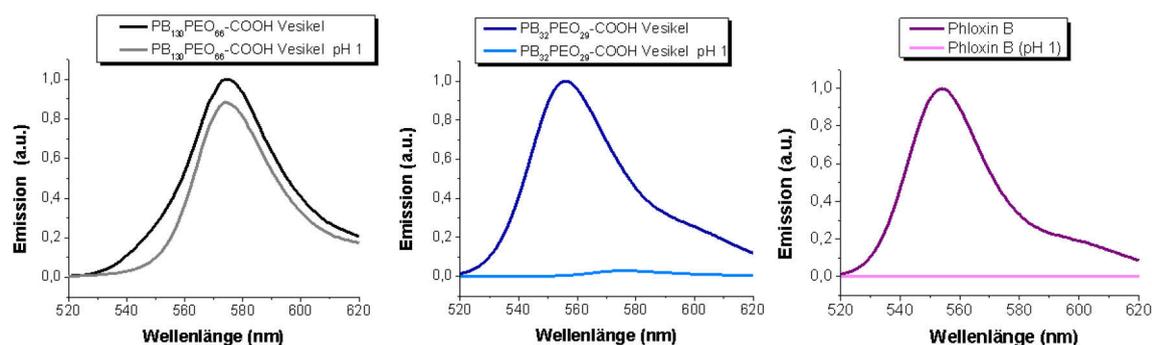


Abb. 4.7: Fluoreszenzemission von farbstoffbeladenen Polymervesikeln und freiem Phloxin B in Wasser und saurer Umgebung ((pH = 1) im Vergleich: Die Polymervesikel (1 g/L Polymer) beladen mit Phloxin B (0,05 g/L) wurden mittels Gelfiltration zunächst von dem freien Farbstoff getrennt. Die Fluoreszenzmessungen wurden bei 23 °C und einer Anregungswellenlänge von 490 nm durchgeführt. Zur Absenkung des pH-Wertes wurde 1 M HCl zugegeben. Vesikel aus PB₁₃₀PEO₆₆-COOH wiesen bei pH 1 noch 89 % der Fluoreszenzintensität auf (links), während Vesikel aus PB₃₂PEO₂₉-COOH nur noch ca. 3 % Restfluoreszenz zeigten (Mitte). Die Farbstoffkontrolle wurde nahezu vollständig gelöscht bzw. die Restfluoreszenzintensität lag unter 0,05 % (rechts).

Die protektive Wirkung der Vesikelmembran des PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH Polymers auf den verkapselten pH-sensitiven Farbstoff wurde bereits von Müller et al. gezeigt und entspricht daher den Erwartungen.¹¹⁶ Bei den Vesikeln des kürzeren PB₃₂-PEO₂₉-COOH-Polymers wurden keine Zeichen von Präzipitation oder andere Hinweise auf eine Zerstörung der Vesikelstruktur festgestellt. Die Stabilität der Vesikelstruktur bei pH 1 wurde zudem mittels Kryo-TEM-Analyse bestätigt (TEM-Aufnahme im Anhang, Abb. 9.1). Daher ist die verstärkte Protonen-Durchlässigkeit der Vesikelmembran offenbar auf das geringere Molekulargewicht des hydrophoben Blocks zurückzuführen. Wie zuvor bereits erwähnt, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht des hydrophoben Blockes und der resultierenden Membrandicke.²⁰² Damit ergibt sich für Vesikel aus PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH eine hydrophobe Membrandicke von ca. 14,9 nm und für das kürzere PB₃₂-PEO₂₉-COOH Polymer nur 7,9 nm. Gleichzeitig nimmt mit abnehmendem Molekulargewicht des hydrophoben Blockes für Vesikel aus PB-*b*-PEO auch die mechanische Belastbarkeit der Membran ab und die Permeabilität wächst exponentiell an.^{115, 202} Experimente an Phospholipid-Vesikeln zeigten für Protonen ($10^{-3} - 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$) im Vergleich zu anderen Ionen ($10^{-12} - 10^{-14} \text{ cm s}^{-1}$) eine um Größenordnungen höhere Permeabilität.²¹⁶ Diese Beobachtung kann als Indiz für das Vorhandensein von kurzlebigen Wasserfäden in der Membran angesehen werden, welche nach dem sogenannten *Grotthuß-Mechanismus* diese stark erhöhte Protonendurchlässigkeit erklären könnte. Untersuchung mit Vesikeln

aus PB₄₆-*b*-PEO₂₆ bestätigten zwar die Membranintegrität für kleine hydrophile Moleküle wie Saccharose, wiesen aber gleichzeitig auch mit Hilfe von Osmose-Experimenten die Membran-Durchlässigkeit für Wasser nach.²¹⁷ Demzufolge könnte die vergleichsweise hohe Protonenpermeabilität für Vesikel aus dem hier untersuchten PB₃₂-PEO₂₉-COOH ebenfalls auf das Vorhandensein von kurzlebigen Wasserporen zurückzuführen sein. Die Membranintegrität für den verkapselten Farbstoff ist offenbar gegeben, da auch nach einigen Tagen noch keine Farbstofffreisetzung beobachtet wurde. Eine kürzlich erschienene Publikation bestätigte die Membranintegrität von Vesikeln eines noch kürzeren Polymers PB₂₂-PEO₁₄ für Carboxyfluorescein.²¹⁸ Die Farbstofffreisetzung lag hier auch nach einigen Tagen noch deutlich unterhalb 10 %, während Lipidvesikel im Vergleich im gleichen Zeitraum bereits 50 % Farbstofffreisetzung aufwiesen. Des Weiteren demonstrierten die Autoren dieses Artikels, dass sich durch Mischung der Lipide mit dem kurzkettigen PB-*b*-PEO-Blockcopolymer das Freisetzungverhalten in einem gewissen Rahmen anpassen lässt. Insbesondere für Anwendungen als Wirkstoffträgersystem ist die Steuerung eines kontrollierten Freisetzungprofils eine wichtige Voraussetzung, deshalb könnte eine Mischung mit Lipiden auch für das hier beschriebene PB₃₂-PEO₂₉-Polymer von Interesse sein. Zudem könnte eine Mischung mit schaltbaren z.B. thermoresponsiven Polymeren erweiterte Kontrollmöglichkeiten bieten.

4.1.2.2 Hydrophile und hydrophobe Beladung mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln

Zusätzlich zu Phloxin B wurden auch hydrophile und hydrophobe Eisenoxid-Nanopartikel als potenzieller Cargo für die Polymervesikel untersucht. Eisenoxid-Nanopartikel haben vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin; dazu zählen die Kontrasteigenschaften für die medizinische Bildgebung wie der Magnet-Resonanztomographie, potenzielle Hyperthermie-Behandlungen oder auch die Möglichkeit, Wirkstoffträger mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes an ihren Wirkort zu lenken, das sogenannte *magnetische Targeting* (vgl. Abschnitt 2.4). Insbesondere die Kombination eines Wirkstoffträgersystems mit der Möglichkeit, gleichzeitig diagnostische Verfahren durchzuführen, die sogenannte *Theranostik*, erfreut sich auf Grund ihres hohen Potenzials für vielfältige biomedizinische Anwendungen derzeit besonderen Forschungsinteresses.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war zunächst das Ziel, die Beladung von Vesikelstrukturen sowohl mit hydrophilen als auch mit hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikeln zu realisieren und den Einfluss auf die Strukturbildung zu untersuchen. Auf Grund des hohen Kontrastes der Eisenoxid-Nanopartikel im Elektronenmikroskop lassen sich diese direkt visualisieren und im Vesikellumen oder in der Schale lokalisieren.^{99, 219, 220}

Hydrophile Beladung

Die eingesetzten hydrophil-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel wurden mittels Co-Präzipitation von Christoph Hönnscheidt hergestellt und für Beladungsversuche zur Verfügung gestellt.²²¹ Zur Stabilisierung dieser hydrophilen Partikel wurde das Flavonoid Rutin eingesetzt. Diese hydrophil-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel wiesen Kerndurchmesser von ca. 2 – 7 nm auf (Abb. 4.8 links). Die DLS-Analyse ergab einen mittleren hydrodynamischen Radius von $\langle R_h \rangle = 14,8$ nm. Die große Differenz zwischen Kerndurchmesser und hydrodynamischer Größe ist offenbar auf die Bildung von Aggregaten in Wasser zurückzuführen. Aggregate aus mehreren Eisenoxid-Kernen wurden in Kryo-TEM-Untersuchungen visualisiert (Abb. 4.8 rechts) und wiesen ca. 8 – 30 nm im Durchmesser auf.

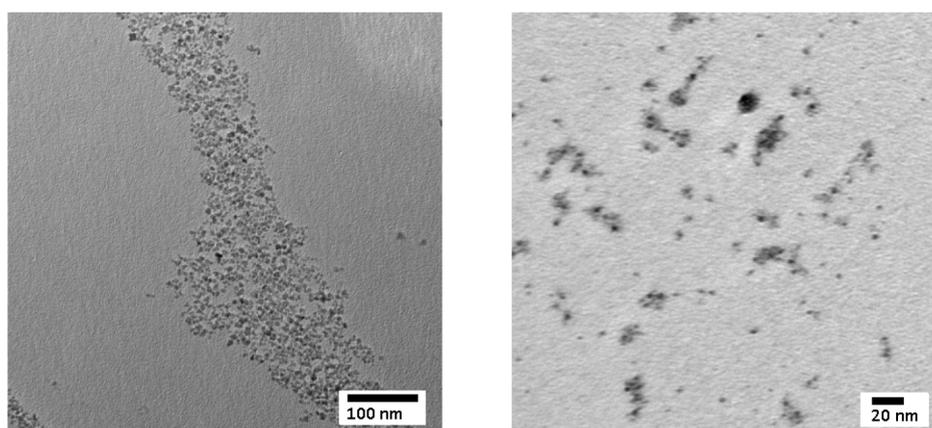


Abb. 4.8: TEM-Aufnahmen Rutin-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel. Die getrocknete Probe (links) zeigt relativ einheitliche Partikel mit Kerndurchmessern von ca. 2 – 7 nm. In der Kryo-TEM-Aufnahme (rechts) ist die Bildung von Aggregaten mehrerer Eisenoxid-Kerne in Wasser zu sehen, welche ca. 8 – 30 nm im Durchmesser aufweisen.

Die *In-Situ*-Beladung von PB₁₃₀PEO₆₆-COOH-Vesikeln erfolgte zunächst im Batch-Experiment mit Hilfe der Co-Lösungsmittelmethode. Die Polymerlösung in THF wurde in einem Rundkolben vorgelegt und die Eisenoxid-Nanopartikel in wässriger Lösung zugetropft, bis der Wasseranteil deutlich oberhalb von 70 % lag und die Strukturbildung beendet war. Verbleibendes THF wurde durch Abdampfen entfernt, die Probe mittels Gammastrahlung vernetzt und in getrocknetem Zustand im TEM analysiert. Die TEM-Aufnahmen zeigen die erfolgreiche Verkapselung der hydrophil-stabilisierten Eisenoxidnanopartikel (Abb 4.9). Jedoch weist die Probe eine relativ breite Größenverteilung (DLS: $R_h = 45$ nm, $\mu_2 = 0,1$) auf. Zudem ist nur ca. jedes zehnte Vesikel mit Eisenoxid-Nanopartikeln im Lumen beladen. Des Weiteren ist auffällig, dass in den TEM-Aufnahmen der getrockneten Probe keine freien Eisenoxid-Nanopartikel zu sehen sind. Da es sich bei dieser gemessenen Probe um eine mittels Gammastrahlung vernetzte Probe handelt, könnte das Fehlen von freien Eisenoxid-Nanopartikeln auf Präzipitation als Folge der Probenbehandlung zurückzuführen sein.

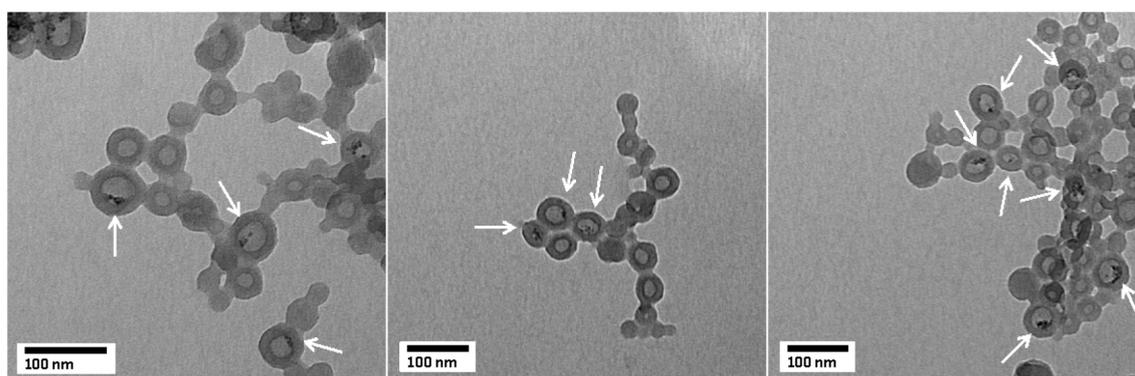


Abb. 4.9: TEM-Aufnahmen einer vernetzten, getrockneten Probe von Vesikeln aus PB₁₃₀PEO₆₆-COOH beladen mit hydrophil-stabilisierten Eisenoxid-Partikeln. Die Probe wurde im Batch-Experiment hergestellt: Polymerlösung mit 4 g/L Polymer in THF wurde vorgelegt, mit 9,9 mL/min wurden die Eisenoxid-Nanopartikel in Wasser (2 g/L, Rutin-stabilisiert) unter Rühren zugegeben, bis der Wassergehalt deutlich über 70 % lag. Verbleibendes THF wurde durch Abdampfen entfernt. Eingebaute Eisenoxid-Nanopartikel im Vesikellumen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

Ein vergleichbares Experiment zur Verkapselung hydrophiler Eisenoxid-Nanopartikel wurde im Mikromischer durchgeführt. Der Mikromischer-Versuch lieferte ähnliche Ergebnisse bezüglich des Anteils an beladenen Vesikeln, jedoch eine deutliche Verbesserung im Hinblick auf die Größenverteilung ($R_h = 46$ nm, $\mu_2 = 0,05$). In Abb. 4.10 sind TEM-Aufnahmen dieser Probe gezeigt. Ausmessungen ergaben Durchmesser von ca. 100 nm, was sehr gut mit den Ergebnissen aus der DLS übereinstimmt.

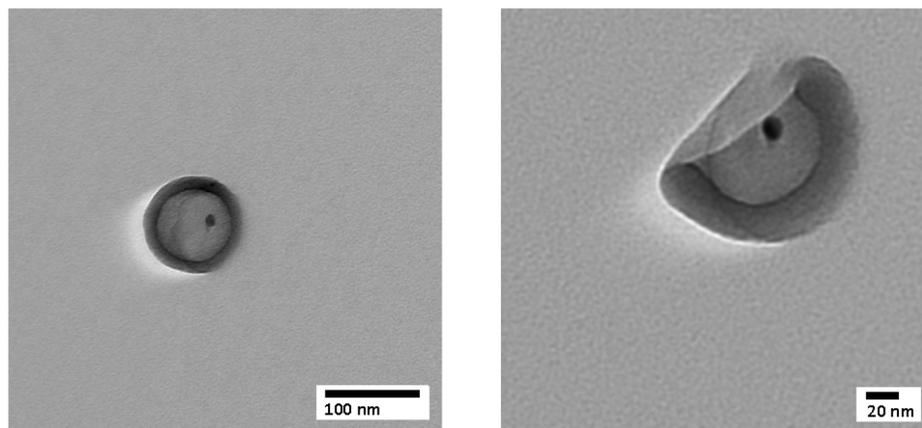


Abb. 4.10: TEM-Aufnahmen von kontinuierlich hergestellten Vesikeln aus $\text{PB}_{130}\text{PEO}_{66}\text{-COOH}$ beladen mit hydrophilen Eisenoxid-Partikeln. Die Proben wurden mit dem Raupenmischer CPMM-R300 hergestellt: Mischverhältnis Wasser/Polymerlösung 1:1, Polymerlösung mit 2 g/L Polymer in THF/ H_2O (50/50 %v/v), Gesamtflussrate von 1 mL/min, die Eisenoxidkonzentration im Wasserreservoir betrug 1 g/L.

Grundsätzlich hat die Beladung der Vesikel offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die Strukturbildung, da weder Veränderungen in der Größe noch in der Morphologie im Vergleich zu der unbeladenen Probe eingetreten sind. Der Erfolg der Verkapselung, also die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Vesikelbildung ein oder mehrere Nanopartikel eingeschlossen werden, hängt mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Partikel in unmittelbarer Umgebung des Polymers zusammen und somit mit der Nanopartikelkonzentration. Eine Erhöhung der Nanopartikelkonzentration würde demnach die mittlere Anzahl von eingeschlossenen Partikeln im Vesikellumen anheben. Zusätzlich sollte jedoch beachtet werden, dass das Volumen der Vesikelinnenräume in Relation zum Umgebungsvolumen nur sehr klein ist. So würde beispielsweise das Verhältnis zwischen Vesikelinnenraum und Umgebungsvolumen für eine Vesikelprobe mit 2 g/L Polymerkonzentration (mittlerer hydrodynamischer Radius von 45 nm, geschätzte Gesamtmembrandicke von 23 nm, einem Innenradius von 22 nm und einem Molekulargewicht von $7,8 \cdot 10^7$ g/mol) in etwa 1 : 1500 entsprechen. Damit ist die Verkapselungseffizienz (Menge an eingeschlossenen Eisenoxid-Nanopartikeln im Verhältnis zu der gesamten eingesetzten Menge) unter Annahme homogen verteilter Partikel während der Vesikelbildung generell gering. Zudem müssten zur Aufreinigung zunächst die nicht eingeschlossenen Nanopartikel entfernt werden. Auf Grund der starken Größendifferenz von < 30 nm für die Magnetpartikel bzw. Aggregate und ca. 100 nm für die Polymervesikel wäre beispielsweise eine Separation mittels asymmetrischer Feld-Fluss-

Fraktionierung denkbar. Anschließend müssten dann zusätzlich die beladenen von den unbeladenen Polymervesikeln getrennt werden. Dies könnte mit Hilfe einer magnetischen Säule realisiert werden, wie sie beispielsweise auch für die Zellseparation eingesetzt wird, oder gegebenenfalls auch kontinuierlich in einem mikrofluidischen Magnetseparations-System.²²²

Hydrophobe Beladung

Die Beladung der Vesikelschale mit hydrophoben Nanopartikeln erfordert den Transfer der Nanopartikel aus einer organischen Dispersion in die hydrophobe Membranschicht einer wässrigen Vesikeldispersion. Auf Grund des enormen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses von Nanopartikeln spielen Grenzflächeneffekte eine große Rolle. Der direkte Kontakt hydrophober Nanopartikel mit der wässrigen Umgebung führt daher im Allgemeinen schnell zur Phasenseparation und folglich zur Präzipitation der Partikel. Eine Möglichkeit, diese Phasenseparation beim Transfer der Partikel in die Polymerphase zu vermeiden, ist die Anwendung der Filmrehydratation. Hierbei werden Polymer und hydrophobe Nanopartikel in einem organischen Lösungsmittel gelöst und gut gemischt. Anschließend wird ein dünner Film auf einer Glasoberfläche aufgebracht und nach Abdampfen des Lösungsmittels durch Zugabe von Wasser und ausreichendem Energieeintrag, z.B. durch Ultraschall, die Vesikelbildung eingeleitet. Hydrophobe Nanopartikel, welche sich bereits in der Polymerphase befinden, können so von den hydrophoben Kohlenstoffketten weitestgehend vom Kontakt mit Wasser abgeschirmt und direkt in die Vesikelschale eingebaut werden. Auf diese Weise wurden hydrophobe Quantum-Dots mit Kerndurchmessern von ca. 6 nm bereits erfolgreich in Vesikelstrukturen aus PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH eingebaut.⁹⁴

Im Rahmen dieser Arbeit sollten hydrophob-stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel in die Vesikelschale eingebaut werden. Für die Beladungsversuche wurden kommerziell erhältliche Ölsäure-stabilisierte Nanopartikel verwendet. Diese wurden in einem Mineralöl geliefert und mussten daher zunächst in ein geeignetes Lösungsmittel überführt werden. Zu diesem Zweck wurden die hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel mit THF verdünnt und anschließend mehrfach gegen THF dialysiert bis das Dialysemedium keine Schlieren mehr zeigte und völlig farblos war. Die Größenanalyse der gereinigten Probe im TEM ergab einen mittleren Kerndurchmesser von 7,5 nm (Abb. 4.11).

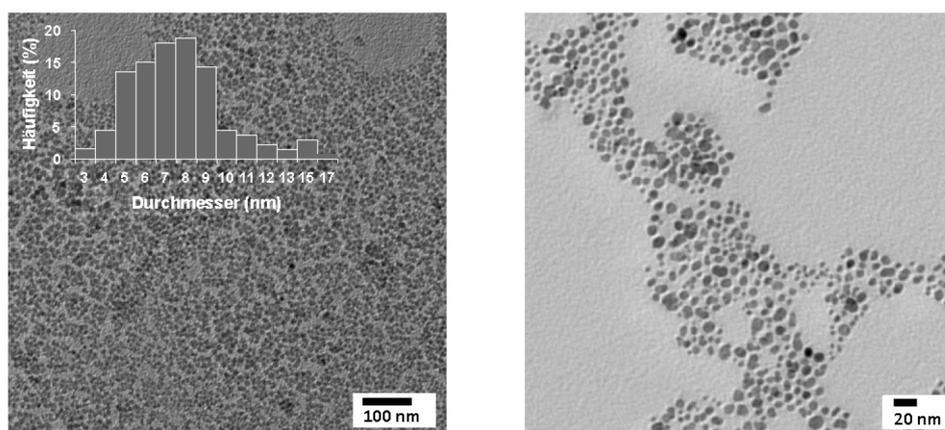


Abb. 4.11: TEM-Aufnahmen einer getrockneten Probe von aufgereinigten hydrophoben Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Das Größenhistogramm (links) basiert auf TEM-Ausmessungen von 300 Partikeln.

Da die hydrophobe Beladung mittels Filmrehydratation zum einen relativ zeitaufwändig und zum anderen auf wenige Milligramm Polymer pro Ansatz beschränkt ist, sollte möglichst eine kontinuierliche Beladung im Mikromischer realisiert werden. Die kontrollierte Strukturbildung des $\text{PB}_{130}\text{-PEO}_{66}\text{-COOH}$ im Mikromischer wurde wie bereits beschrieben erfolgreich durchgeführt.¹⁰⁸ Wird dabei auf eine Vormischung mit Wasser verzichtet und das Polymer in THF erst im Mischer mit Wasser in Kontakt gebracht, sind asymmetrische Flussraten notwendig. Unter diesen Mischbedingungen werden jedoch vorwiegend Kugelmizellen und keine oder nur sehr kleine Vesikel gebildet (vgl. Abschnitt 4.1.1).¹⁰⁷ Zum Einbau hydrophober Eisenoxid-Nanopartikel in die Vesikelschale wurden daher zwei unterschiedliche Strategien angewendet. Im ersten Versuch wurde ein 2-Stufen-Prozess durchgeführt. Dazu wurden sowohl das Polymer als auch die Eisenoxid-Nanopartikel in THF gelöst. Im Mischerversuch wurde dann mit stark asymmetrischen Flussraten (Wasser/THF 10 : 1, Gesamtflussrate 10 mL/min) gearbeitet, um eine möglichst schnelle Stabilisierung der Eisenoxid-Nanopartikel in Polymermizellen zu erzielen. Im zweiten Schritt wurde weiteres Polymer in THF zu den gebildeten Eisenoxid-Mizellen zugeben, sodass eine Vormischung mit 30 % Wasser und 4 g/L Polymer als Startlösung für einen weiteren Mischprozess eingesetzt werden konnte. In dieser zweiten Stufe sollte der Einbau der Polymer-stabilisierten Eisenoxide in die Vesikelmembran erfolgen. Diese wurde unter symmetrischen Flussbedingungen und einer Gesamtflussrate von 1,8 mL/min durchgeführt. Die TEM-Analyse der erhaltenen Probe ist in Abb. 4.12 links dargestellt. Da es sich auch hier um eine vernetzte und getrocknete

Probe handelt, bei welcher die gebildeten Nanostrukturen sehr nahe beieinander liegen, ist die genaue Lokalisation der Eisenoxid-Nanopartikel schwierig. Kugelmizellen und Vesikelstrukturen liegen nebeneinander vor. Die Eisenoxid-Nanopartikel sind vermehrt in der unmittelbaren Umgebung der Vesikelstrukturen zu sehen und weniger in den hydrophoben Bereichen der Kugelmizellen. Dennoch konnte der erfolgreiche Einbau in die Vesikelschale mit Hilfe der TEM-Analyse nicht eindeutig gezeigt werden. Zudem sollten ausschließlich Vesikelstrukturen hergestellt werden, daher entspricht das Vorliegen von Kugelmizellen neben beladenen Vesikeln nicht den Zielvorgaben.

Um einheitliche Vesikelstrukturen im Mikromischer herzustellen, ist eine Vormischung der Polymerlösung mit Wasser notwendig (vgl. Abschnitt 4.1.1). Auf Grund der stark hydrophoben Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel ist die Toleranz gegenüber Wasser sehr gering. Nur wenn ausreichend Polymer zur Stabilisierung zur Verfügung steht, kann eine sofortige Präzipitation kurzfristig verhindert werden. Der maximal mögliche Gehalt an Eisenoxid in der Polymerstartlösung mit 20 % Wasseranteil wurde auf 0,08 Gew.-% (entspricht 4 % bezogen auf die Polymerkonzentration) ermittelt. Bei symmetrischen Flussbedingungen und einer Gesamtflussrate von 1,8 mL/min wurden in der Größe relativ einheitliche Vesikel erhalten (DLS-Analyse: $R_h = 45$ nm, $\mu_2 = 0,06$). Die TEM-Analyse zeigt zudem die erfolgreiche Beladung der Vesikelschale mit den hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel (Abb. 4.12 rechts). Zum Teil sind kleinere Aggregate von Eisenoxid-Kernen in der Schale zu erkennen (gekennzeichnet durch die weißen Pfeile im linken, oberen Bereich der TEM-Aufnahme). Der hohe Kontrast an der Innenseite der Schale einiger Polymervesikel weist zudem auf eine relativ homogene Beladung mit kleinen Eisenoxid-Nanopartikeln hin, welche nicht mehr einzeln aufgelöst werden können. Der Einbau der hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel hat offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die Strukturbildung. Dies gilt zumindest in der hier eingesetzten verhältnismäßig geringen Partikelkonzentration. Vergleichbare Experimente mit einem ähnlichen Polymer (PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH) und hydrophoben Quantum-Dots gleicher Massekonzentration (bezogen auf die Polymerkonzentration) zeigten hingegen eine starke Veränderung der Strukturbildung.¹⁰⁷ Auf Grund der geringeren Dichte der Quantum-Dots im Vergleich zu den Eisenoxid-Nanopartikeln lag jedoch eine deutlich höhere Partikelkonzentration vor. Dieser hohe Anteil an hydrophoben Partikeln führte zur Fusionierung mehrerer Vesikel und der Ausbildung größerer Aggregatstrukturen mit mehreren hydrophilen Kompartimenten.

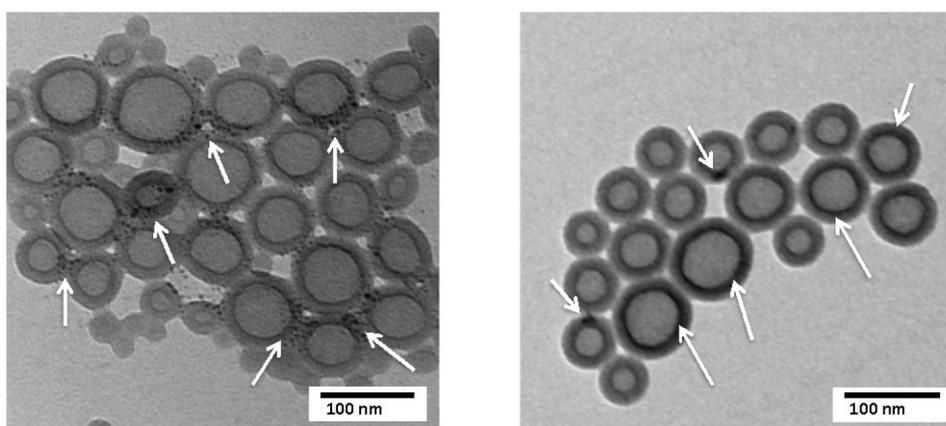


Abb. 4.12: Hydrophobe Beladung von Vesikeln aus PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH. Die Proben wurden mit dem Raupenmischer CPM-M-R300 hergestellt und für die TEM-Analyse vernetzt und getrocknet: **Links:** 2-stufige Herstellung: 1. Stufe: Mischverhältnis Wasser/Polymerlösung 10:1, Polymerlösung 20 g/L in THF mit 10 Gew.-% Eisenoxid, Gesamtflussrate 10 mL/min. 2. Stufe: Zugabe von PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH Copolymer in THF resultierend in einer Gesamtpolymerkonzentration von 4 g/L und (Wasser/THF 30/70 %v/v), Mischverhältnis 1:1, Gesamtflussrate 1,8 mL/min. **Rechts:** Mischverhältnis Wasser/Polymerlösung 1:1, Polymerlösung in THF/H₂O (80/20 %v/v), Gesamtflussrate 1,8 mL/min mit Polymerkonzentration 2 g/L, 4 Gew.-% Eisenoxid bezogen auf die Polymerkonzentration.

Das kürzere PB₃₂-PEO₂₉-COOH Polymer bildet Vesikel mit einer deutlich dünneren Membran von nur ca. 7,9 nm (hydrophobe Schicht) aus (vgl. Abschnitt 4.1.1). Die in dieser Arbeit eingesetzten hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel weisen einen mittleren Kerndurchmesser von 7,5 nm auf. Ziel war nun zu prüfen, ob der Einbau der hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel auch in die verhältnismäßig dünne Vesikelschale möglich ist und inwiefern die Strukturbildung durch die Partikel beeinflusst wird. Das PB₃₂-PEO₂₉-COOH Polymer bildet auf Grund seiner Komposition im wässrigen bevorzugt Vesikel aus, dennoch war die Herstellung von Vesikeln mittels Co-Lösungsmittelmethode im Mikromischer nicht möglich (vgl. Abschnitt 4.1.1.3). Aus diesem Grund wurden die Versuche zur hydrophoben Beladung der PB₃₂-PEO₂₉-COOH Vesikel mittels Filmrehydratation durchgeführt. In Abb. 4.13 ist die Kryo-TEM-Analyse der hergestellten Probe gezeigt. Die Beladung der dünnen Vesikelschale mit hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikeln ist offenbar möglich, jedoch erfolgt die Beladung nicht homogen. Es liegen beladene Vesikel neben leeren Vesikeln vor. Außerdem existieren auch multischalige Vesikel (Abb. 4.13 links oben im Bild). Auf Grund des schwachen Kontrasts des Polymers im Wasserfilm sind unbeladene Vesikel in Kryo-TEM-Aufnahmen nur im Unterfokus sichtbar. Daher erscheinen die beladenen Vesikel als kontrastreichere Objekte bei gleicher Fokussierung unscharf und sind deshalb nicht eindeutig als beladene Vesikel zu identifizieren. Deutlich zu sehen ist der erfolgreiche

Einbau der Eisenoxid-Nanopartikel in der Vesikelschale in Abb. 4.13 rechts. Hierbei ist auch eine Verformung der Hohlkugelstruktur des Vesikels zu erkennen. Die inhomogene Verteilung der Nanopartikel auf die Polymervesikel ist möglicherweise Ursache eines nicht ausreichend dünnen Polymerfilms vor der Rehydratation oder auf eine unzureichende Durchmischung der Eisenoxid-Nanopartikel mit dem Polymer zurückzuführen. Außerdem könnte das Aggregationsverhalten der magnetischen Nanopartikel eine Rolle spielen, welche eine homogene Verteilung auf Grund von attraktiven Wechselwirkungen zusätzlich erschwert.

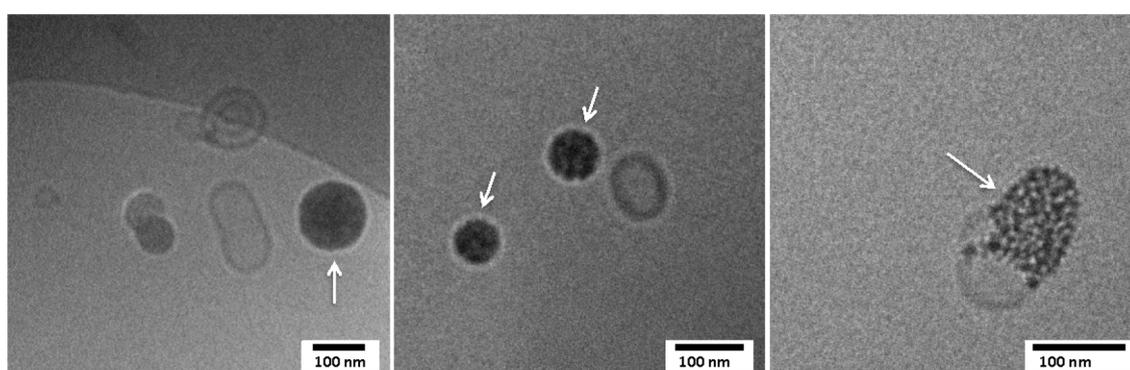


Abb. 4.13: Kryo-TEM-Aufnahme hydrophob beladener PB_{32} - PEO_{29} - $COOH$ Vesikel. Die Herstellung und Beladung erfolgte mittels Filmrehydratation. Eingesetzt wurden 20 Gew.-% Eisenoxid-Nanopartikel bezogen auf die Polymerkonzentration. Beladene Polymervesikel sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

In diesem Abschnitt wurden die Ergebnisse grundlegender Untersuchungen zur Strukturbildung und Beladung von PB - b - PEO -Polymerstrukturen vorgestellt. Es konnte die erfolgreiche Herstellung von Strukturen unterschiedlicher Morphologie gezeigt werden. Durch den Einsatz der Mikromischertechnologie ist es zudem möglich auch thermodynamisch nicht-favorisierte Aggregatstrukturen zu erhalten. Auf diese Weise kann aus dem identischen Polymer wahlweise eine vesikuläre oder kugelmizellare Struktur hergestellt werden. Durch Variation der Blocklänge des hydrophoben Blocks können zudem die Dimensionen der Aggregatstrukturen verändert werden und so durch Einstellung der Membrandicke eines Vesikels u.a. auch deren Permeabilität kontrolliert werden. Die kontrollierte Herstellung verschiedener Nanostrukturen eröffnet so die Möglichkeit spezifischer Untersuchungen wie beispielsweise zum Einfluss von Größe und Form nanoskaliger Objekte in Wechselwirkungen mit Proteinen oder Zellen.

Mit Hilfe von TEM-Aufnahmen wurden sowohl hydrophile Partikel im Vesikellumen als auch hydrophobe Nanopartikel in der Vesikelschale lokalisiert. Die Herstellung solcher Hybrid-Polymersome könnte nicht nur für biomedizinische Anwendungen interessant sein, sondern bietet auch für die Grundlagenforschung definierte Modellsysteme. Beispielsweise könnten so magnetische Eigenschaften von Partikeln vergleichbarer Größe in Abhängigkeit ihrer direkten Umgebung untersucht werden. Die Fixierung in der Vesikelschale im Vergleich zur freien Beweglichkeit im Vesikellumen, eine hydrophobe oder hydrophile Umgebung sowie das Vorhandensein von losen oder eher festen Aggregaten vergleichbar großer Eisenoxid-Kerne könnte eventuell Einfluss auf das magnetische Verhalten der Hybridstruktur haben.

4.1.3 Zytotoxizität verschiedener PB-*b*-PEO-Nanostrukturen

Im Hinblick auf potenzielle (bio)medizinische Anwendungen polymerer Nanopartikel wurden Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität durchgeführt. In der Nanotechnologie spielen, neben reinen Materialeigenschaften wie beispielsweise der chemischen Zusammensetzung, auch größenspezifische Eigenschaften eine entscheidende Rolle. So haben Nanopartikel ein enormes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis und sind in ihren Dimensionen so klein, dass sie von Zellen aufgenommen werden können. Für die Zellaufnahme sind verschiedene Parameter wie Größe, Form und Oberfläche von zentraler Bedeutung.²²³⁻²²⁶ Die exakte Größe kann sich in physiologischer Umgebung, bedingt durch hohe Salzkonzentrationen und die Anwesenheit von Proteinen, von der bestimmten Partikelgröße direkt nach der Synthese stark unterscheiden. Die Oberflächenbeschaffenheit, welche die Ladung und Rauheit beinhaltet, sowie die Form der Partikel können die Zellinternalisierung ebenfalls beeinflussen.

Nanostrukturen aus den hier vorgestellten PB-*b*-PEO-Blockcopolymeren bieten den großen Vorteil, dass sich Aggregate unterschiedlicher Morphologie aus exakt dem gleichen Polymer herstellen lassen. Damit ist es möglich, einen Parameter – nämlich die Form unabhängig von anderen Parametern wie beispielsweise der genauen chemischen Zusammensetzung – zu betrachten.

Bei PB-*b*-PEO-Blockcopolymeren handelt es sich um ein inertes, nicht-toxisches Material. Dennoch ist die Zellviabilität bei der Exposition mit nicht-bioabbaubaren Materialien eine Frage der Dosis. Abb. 4.14 zeigt eine Zusammenfassung der

konzentrationsabhängigen Zytotoxizität von Strukturen verschiedener Morphologie aus dem kürzeren Polymer PB₃₂PEO₂₉. Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigten Vesikelstrukturen keine signifikanten toxischen Effekte auf die hier inkubierten HeLa-Zellen. Die Oberflächenladung, genauer die Endgruppen Hydroxyl- bzw. Carboxylgruppen hatten dabei offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität. Im Gegensatz zu den Polymervesikeln wurden für zylindrische und sphärische Mizellen im gleichen Konzentrationsbereich zum Teil stark zytotoxische Effekte beobachtet. Während bei den sphärischen Mizellen noch der nicht-toxische Konzentrationsbereich erreicht wurde, lag die Überlebensrate der HeLa-Zellen bei Inkubation mit polymeren fadenförmigen Mizellen auch bei höchster Verdünnung unter 5 %.

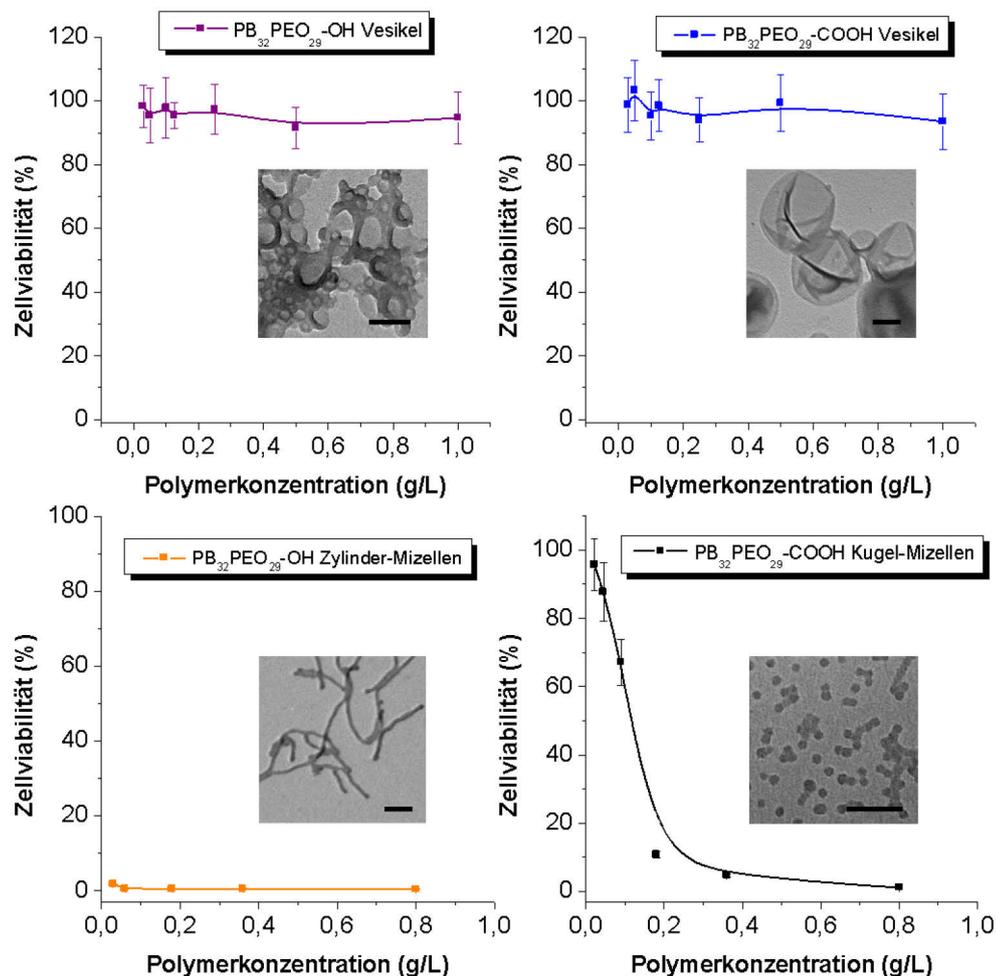


Abb. 4.14: Zytotoxizitätsstudie mit verschiedenen polymeren Nanostrukturen aus PB₃₂-PEO₂₉ an HeLa-Zellen. Die Inkubation erfolgte 48 h in DMEM-Medium mit 10 % FCS. Die Verbindungsline zwischen den Messpunkten dient der optischen Orientierung und stellt keine Fit-Funktion dar. Die Größenskala in den TEM-Aufnahmen ist jeweils 100 nm.

In dieser Studie wurden Aggregatstrukturen unterschiedlicher Morphologie bei gleicher Polymer-Massekonzentration verglichen. Wird die Zytotoxizität nicht auf die Polymerkonzentration, sondern auf die Anzahl der Partikel, mit denen die Zellen inkubiert wurden, bezogen, ergibt sich zumindest für die sphärischen Mizellen ein anderes Bild. Vergleicht man das Volumen einer Mizelle mit einem hydrodynamischen Radius von $R_h = 13$ nm mit einem Vesikel des Radius $R_h = 69$ nm und einer Wanddicke von 13 nm (abgeschätzt ca. 8 nm hydrophober PB-Anteil, je zweimal 2,5 nm PEO-Anteil), dann ergibt sich ein um den Faktor 70 kleineres Volumen einer Mizelle im Vergleich zur Vesikelschale. Daraus resultiert, dass bei gleicher Polymerkonzentration die Partikelanzahl 70-fach höher ist für die Mizellendispersion im Vergleich zur Vesikeldispersion. Trägt man nun die Zellviabilität bezogen auf die Partikelanzahl anstelle der Polymerkonzentration auf, ergibt sich bei gleicher Partikelanzahl auch vergleichbare Zytotoxizität (Abb. 4.15 rechts). Die entsprechenden Molmassen wurden über eine Dichteabschätzung basierend auf Messungen statischer Lichtstreuung von Kugelmizellen und Vesikeln des $PB_{130}PEO_{66}-COOH$ Polymers (Daten im Anhang, Tab. 9.1) berechnet. Die Oberfläche wurde ebenfalls basierend auf den gleichen Daten für Mizellen ($R_h = 13$ nm) und Vesikel ($R_h = 69$ nm) ermittelt und ergab mit 601 m^2/g für Mizellen im Vergleich zu 234 m^2/g für Vesikel nur den Faktor 3 (Abb. 4.15 mittlere Graphik). Daher scheint im Fall dieser PEO-basierten Polymerstrukturen die Vergrößerung der Oberfläche bei Mizellen im Vergleich zu Vesikeln nur eine untergeordnete Rolle bei der Zytotoxizität zu spielen.

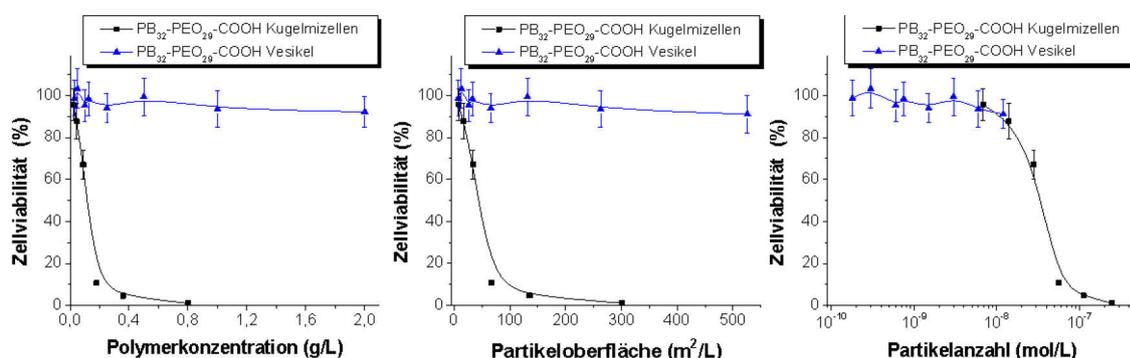


Abb. 4.15: Zytotoxizität von Mizellen und Vesikeln aus $PB_{32}-PEO_{29}-COOH$ bezogen auf die Polymerkonzentration, die Partikeloberfläche und die Partikelanzahl im Vergleich. Die Verbindungsline zwischen den Messpunkten dient der optischen Orientierung und stellt keine Fit-Funktion dar.

Größenabhängige Zytotoxizitätsstudien wurden beispielsweise auch von Kasper et al. mit sphärischen Silica-Nanopartikeln an Lungenepithelzellen durchgeführt.²²⁶ Auch hierbei führten die kleinen Partikel ($r = 15 \text{ nm}$) stärkere zytotoxische und inflammatorische Zellreaktionen hervor im Vergleich zu den größeren ($r = 150 \text{ nm}$) Partikeln bei gleicher Massekonzentration.

Die vergleichsweise hohe Toxizität der zylindrischen Mizellen lässt sich jedoch nicht über die Partikelanzahl erklären. Möglicherweise ist der Wirkmechanismus ähnlich wie bei Asbestfasern. Auch für Carbonanotubes und Carbonanofasern wurde Asbest-ähnliche Zytotoxizität beobachtet.^{227, 228} Zellen versuchen die Fäden über Endozytose aufzunehmen, können dies jedoch aufgrund der zum Teil großen Länge der zylindrischen Mizellen nicht vollständig. Wenn Zellen des Immunsystems, also Makrophagen dies tun, wird auch von der sogenannten *frustrierten Phagozytose* gesprochen. Es kommt zu einer Ausschüttung von Zytokinen, was zu weiteren Entzündungsreaktionen und schließlich zu Gewebeschädigungen führen kann. Da es sich bei den fadenförmigen Polymermizellen ebenfalls um sehr stabile supramolekulare Strukturen handelt, welche aus inertem nicht-abbaubarem Material bestehen, reagieren die Zellen auf die fadenförmigen Polymerzylinder vermutlich ähnlich wie bei anderen Faser-Materialien. Forscher um D. Discher zeigten jedoch, dass zylindrische Mizellen aus bioabbaubarem Material, mit Polycaprolactonen als hydrophobem Block, deutlich weniger zytotoxische Effekte aufweisen und durch die Möglichkeit der Hydrolyse-induzierten Wirkstofffreigabe, großes Potenzial für biomedizinische Anwendungen haben.²²⁹ Diese fadenförmigen Nanostrukturen profitieren zudem von einer verlängerten Blutzirkulationszeit *in vivo* im Vergleich zu sphärischen Nanopartikeln.^{230, 231} Daher könnten fadenförmige Wirkstoffträger nach dem Vorbild der Natur durchaus hohes Potenzial im biomedizinischen Anwendungsbereich haben. So weisen beispielsweise auch Viren wie der Grippevirus H5N1 ($1 \mu\text{m}$ Länge) und der Ebolavirus ($< 10 \mu\text{m}$ Länge) Filament-Struktur auf.²³²

Bezüglich der formabhängigen Zytotoxizität der Nanostrukturen wurde auch bei den anderen untersuchten PB-*b*-PEO-Polymeren ein ähnliches Bild erhalten. Abb. 4.16 gibt einen Überblick über die Morphologie-bezogene Zytotoxizitätsstudie. Die Ergebnisse der Größencharakterisierung der verschiedenen hergestellten Nanostrukturen sind in Tab 4.4 in Abschnitt 4.1.1 zusammengefasst. Generell induzieren Vesikelstrukturen keine signifikante Reduktion der Zellviabilität im untersuchten Konzentrationsbereich.

Kugelmizellen verringern die Zellviabilität bei gleicher Massekonzentration, was jedoch wiederum auf die deutlich höhere molare Konzentration zurückzuführen sein könnte. Für das Polymer $PB_{130}PEO_{66}-COOH$ ergibt sich beispielsweise aus den Daten der statischen Lichtstreuung ein Faktor von mindestens 24 für die Mizellenanzahl im Vergleich zur Vesikelanzahl bei gleicher Polymerkonzentration (vgl. Abschnitt 4.1.1, Tab. 4.3). Zylindrische Mizellen aus dem größeren $PB_{130}PEO_{120}-OH$ -Polymer erzeugen wie die anderen fadenförmigen Mizellen ebenfalls starke zytotoxische Effekte.

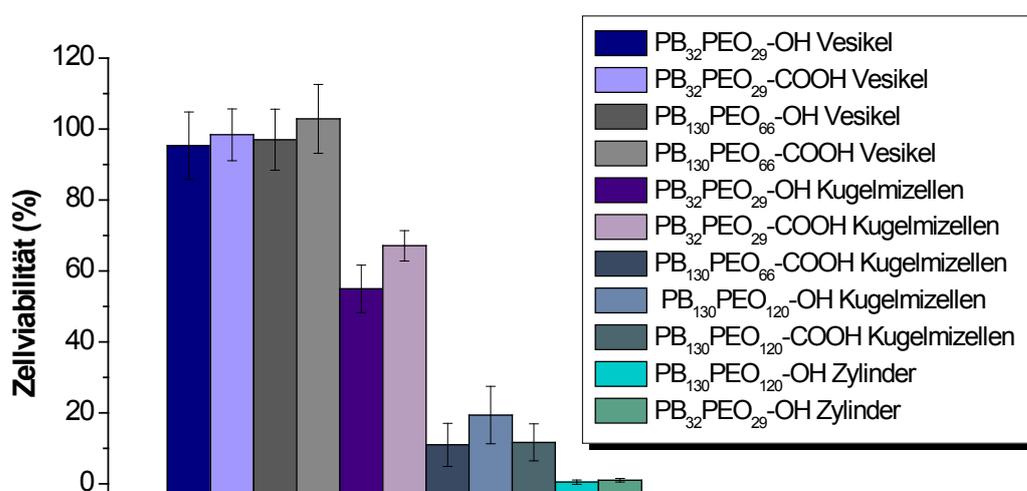


Abb. 4.16: Zusammenfassung der Zytotoxizitäts-Studie mit Polymer-Nanostrukturen verschiedener Morphologie. Die Polymerkonzentration lag jeweils bei 0,1 g/L. HeLa-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS für 48 h inkubiert.

Die starke Zytotoxizität der Kugelmizellen im Vergleich zu den Vesikeln ist möglicherweise nicht nur durch die erhöhte molare Konzentration, sondern auch durch eine größenspezifisch erhöhte Zellaufnahme begründet. Die Internalisierungsrate von Nanopartikeln ist offenbar größen- und formabhängig. So werden sphärische Partikel im Vergleich zu anisotropen Partikeln generell schneller aufgenommen.^{224, 233} Die Zellaufnahme ist zudem stark von den Dimensionen abhängig. Bei sphärischen Partikeln werden im Allgemeinen die kleineren Partikel schneller aufgenommen als die größeren Partikel. Eine Studie mit fluoreszierenden Polystyrol-Kugeln demonstrierte eine 3- bis 4-fach höhere Internalisierungsrate für Polymerpartikel mit 50 nm Durchmesser im Vergleich zu Kugeln mit 100 nm Durchmesser.²³⁴ Bei stäbchen- oder fadenförmigen Nanostrukturen steht die Zellaufnahme zumeist in negativer Korrelation zum

Aspektverhältnis, die Aufnahmerate nimmt also bei gleichem Partikelvolumen mit zunehmendem Aspektverhältnis ab.^{224, 235, 236} Für die fadenförmigen Mizellen würde das zwar eine vergleichsweise langsame Zellaufnahme bedeuten, dennoch ist dies kein Widerspruch zu der beobachteten hohen Zytotoxizität. Ist letztere tatsächlich Folge einer frustranen Endozytose, so würde ein einzelner Polymerfaden pro Zelle genügen, um deren Zelltod zu verursachen.

Weiterhin könnten auch exozytische Prozesse eine Rolle spielen. Sowohl für kürzere Nanostäbchen als auch für sphärische Nanopartikel wurde in der Literatur Exozytose beschrieben.²³³ Bei Untersuchungen mit Transferrin-beschichteten Gold-Nanopartikeln wurde dabei ein linearer Zusammenhang zwischen Größe und Exozytoserate beobachtet, wobei der Anteil an exozytierten Partikeln für die kleinste Partikelgröße (< 20 nm) am höchsten war.²³⁷ Interessanterweise war gleichzeitig der Anteil an exozytierten Partikeln bei stäbchenförmigen Nanopartikeln größer als bei sphärischen Partikeln.

Detaillierte Studien zu den Nanopartikel-Aufnahmemechanismen und Exozytose-Prozessen konnten im Rahmen dieser Studie leider nicht durchgeführt werden. Daher lassen sich in diesem Zusammenhang keine eindeutigen Aussagen über die Ursachen der Zytotoxizität treffen. Dennoch ist offenbar die Morphologie der jeweiligen Nanostrukturen für die Zellantwort ausschlaggebend. Würde beispielsweise die Wechselwirkung zwischen den amphiphilen Blockcopolymeren und den Phospholipiden der Zellmembran zytotoxische Effekte hervorrufen, so dürfte dieser Mechanismus unter Annahme vergleichbarer Stabilität der verschiedenen Nanostrukturen nicht von der jeweiligen Form der Aggregate, sondern ausschließlich von der Komposition und Konzentration der Blockcopolymeren abhängig sein. Diese Tendenz lässt sich jedoch nicht von den Beobachtungen ableiten.

Auffällig ist dennoch die vergleichsweise starke zytotoxische Wirkung der Kugelmizellen aus PB₁₃₀-PEO₆₆-Blockcopolymer im direkten Vergleich zu Kugelmizellen aus dem kürzeren PB₃₂-PEO₂₉-Blockcopolymer bei gleicher Massekonzentration (Abb 4.16). Die beiden Proben unterscheiden sich nur geringfügig im hydrodynamischen Radius, weshalb die Größe in diesem Fall nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein scheint. Berechnungen für die molare Konzentration ergaben für das kürzere Blockcopolymer (PB₃₂-PEO₂₉) eine um den Faktor 5 höhere Anzahl. Die Zytotoxizität der Kugelmizellen verhält sich jedoch kontrovers, d.h. sie war für das langkettige Blockcopolymer (PB₁₃₀-PEO₆₆) stärker. Daher stehen in diesem Fall offenbar tatsächlich die

unterschiedlichen Blocklängen der Polymere in den Kugelmizellen mit der Wirkung auf die Zelle im Zusammenhang. Der negative A_2 -Wert aus der statischen Lichtstreuung für Kugelmizellen aus PB_{130} - PEO_{66} gab bereits Hinweis auf interpartikuläre Wechselwirkungen, welche vermutlich auf eine erhöhte Hydrophobizität des vergleichsweise langen PEO-Blocks zurückzuführen ist. Konformationsänderungen einzelner EO-Segmente könnten eine steigende Hydrophobizität mit zunehmender Kettenlänge erklären.²³⁸⁻²⁴⁰ Oelmeier et al. zeigten mit Hilfe der Simulationstechnik der Molekulardynamik (MD) für PEO-Moleküle mit Molekulargewichten von 300 g/mol bis 3500 g/mol in wässriger Umgebung einen starken Einfluss der Kettenlänge auf die Oberflächencharakteristik und Lösungsmittelinteraktion der PEO-Moleküle.²⁴¹ Die mittlere Anzahl an Wasserstoffbrücken pro EO-Segment nahm dabei exponentiell mit steigender Kettenlänge ab. Die Werte für die Oberflächenhydrophobizität aus der MD-Simulation wurden experimentell mit Hilfe von einem solvatochromen Farbstoff bestätigt. Proteine adsorbieren bevorzugt an hydrophoben Oberflächen, daher kann die molekulare Konformation des Polyethylenoxids neben der Interaktion mit dem Lösungsmittel (Wasser) auch für die Wechselwirkungen mit Proteinen bestimmend sein.²⁴²

Unabhängige Studien mit verschiedenen Nanopartikeln beschreiben eine Abhängigkeit von Zellinternalisierung und der Adsorption von Serumproteinen an der Partikeloberfläche.²⁴³⁻²⁴⁶ Alle Experimente der hier beschriebenen Zytotoxizitätsstudie wurden in Zellkulturmedium, angereichert mit 10 % fetalem Rinderserum, durchgeführt. Daher könnten die Unterschiede der Zytotoxizität verschiedener Kugelmizellen ebenfalls durch adsorbierte Serumproteine bedingt sein. Vor diesem Hintergrund wurde im Folgenden die Interaktion von Serumproteinen mit Nanostrukturen gleicher Morphologie aus Blockcopolymeren unterschiedlicher Länge weitergehend untersucht.

4.1.4 Polymere Nanopartikel in Wechselwirkung mit Serumproteinen

In der Nanomedizin spielt das Verhalten eines Nanopartikels in der physiologischen Umgebung nach Eintritt in den Körper eine entscheidende Rolle (vgl. Abschnitt 1.2.4). Sobald ein Nanopartikel mit körpereigenen Stoffen wie z.B. Proteinen in Berührung gebracht wird, kommt es zu Wechselwirkungen an der sogenannten Bio-Nano-Grenzfläche, welche das Schicksal des Partikels maßgeblich beeinflussen. Bei Wirkstoffträgersystemen wird meist von einer systemischen Applikation ausgegangen. Sobald der Nanotransporter also in den Körper gelangt und über die Blutbahn transportiert wird, kommt es zu direktem Kontakt mit den Blutkomponenten wie u.a. mit den Serumproteinen.

Um Aufschluss über die Wechselwirkungen von Polymerpartikeln mit Serumproteinen zu erlangen, wurde das PB-*b*-PEO-Modellsystem in Interaktion mit fetalem Kälberserum (engl.: *fetal calf serum* FCS) als auch mit Rinderserum-Albumin (engl.: *bovine serum albumin* BSA) untersucht. Albumin ist ein Hauptbestandteil des Blutserums und stellt die größte Proteinfraction im Serum dar.

Die Methode nach Rausch et al. ermöglicht mittels dynamischer Lichtstreuung das Studium von Nanopartikeln in komplexer Umgebung wie z.B. Blutserum (Abschnitt 3.1.4).¹⁹⁰ Dabei wird zunächst die Proteinlösung, in diesem Fall das DMEM-Zellkulturmedium mit 10 % FCS (wie üblicherweise in der Zellkultur eingesetzt) gemessen. Da es sich bei Serum um eine Proteinmischung handelt, ist ein multiexponentieller Abfall der Autokorrelationsfunktion zu beobachten und es wird ein triexponentieller Fit benötigt, um eine ausreichend gute Annäherung an die gemessenen Daten zu erhalten.¹⁹⁰ Die Nanopartikel-Probe wird ebenfalls einzeln gemessen, hierbei sollte jedoch ein biexponentieller Fit genügen, um die Daten beschreiben zu können. Anschließend wird nun die Mischung aus Nanopartikeln und Proteinen in der dynamischen Lichtstreuung gemessen und bewertet. Lässt sich die Autokorrelationsfunktion aus der Summe der individuellen Korrelationsfunktionen bei konstant gehaltenen Parametern nur durch Variation der Intensitätsanteile gut beschreiben, so liegt keine nennenswerte Agglomeration der Partikel vor. Weicht jedoch der Fit von den Daten und damit das Residuum des Fits von Null ab, so ist dies durch die Formation von Agglomeraten bedingt. Durch Erweiterung der Fitfunktion um eine weitere Exponentialfunktion kann die Größe der gebildeten Agglomerate bestimmt werden. Untersucht wurden nur die vesikulären Polymerstrukturen, da diese als

Wirkstoffträgersysteme mit hydrophoben und hydrophilen Beladungsmöglichkeiten das größte Anwendungspotenzial bieten. Für Vesikel aus dem PB₁₃₀-PEO₆₆-Polymer mit Hydroxyl-Gruppen auf der Oberfläche konnte eine geringfügige Tendenz zur Agglomeration mit Serumproteinen beobachtet werden (Abb. 4.17). Die Größe der Agglomerate wurde nach winkelabhängiger Auftragung des apparenten Diffusionskoeffizienten für $q \rightarrow 0$ auf $\langle R_h(\text{Agg}) \rangle_z = 90,6 \text{ nm}$ ermittelt. Dies entspricht in etwa einer Verdopplung des Radius der Vesikel in Wasser. Dazu sollte jedoch bemerkt werden, dass diese ermittelte Agglomeratgröße im Bereich der größten Serumproteine liegt, und damit eine eindeutige Zuordnung der Partikelgröße schwierig ist.¹⁹⁰ Über die Amplitudenanteile der Mehrkomponenten-Fitfunktion können die Konzentrations-verhältnisse der einzelnen Komponenten grob abgeschätzt werden. Der Amplitudenanteil der Partikelfraktion der Größe $\langle R_h(\text{Agg}) \rangle_z = 90,6 \text{ nm}$ lag bei 0,6. Jedoch muss bei der Interpretation dieses Wertes wiederum beachtet werden, dass große Partikel bei gleicher Konzentration (und gleichem Brechungsindexinkrement) stärker streuen (Streuintensität $\sim R^6$). Aus diesem Grund wurde dieser Amplitudenanteil im vorliegenden Fall nur zum direkten Vergleich des Agglomerationsverhaltens der beiden Vesikeltypen vergleichbarer Ausgangsgröße herangezogen.

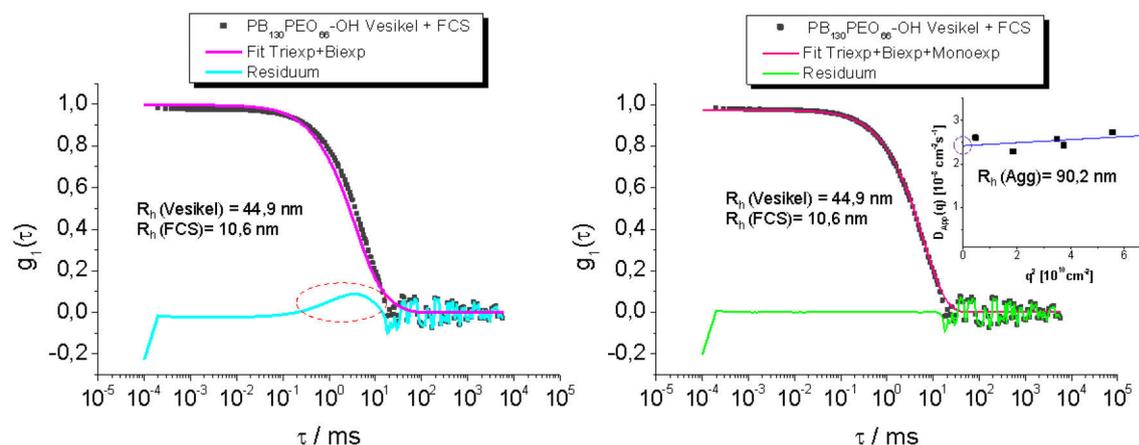


Abb. 4.17: DLS-Analyse des Agglomerationsverhaltens von Vesikeln aus PB₁₃₀PEO₆₆-OH in Wechselwirkung mit Serumproteinen. DLS-Messung mit einer Serumkonzentration von 6 mg/mL in Medium und 0,01 mg/mL PB₁₃₀PEO₆₆-OH bei 23 °C, Streuwinkel 60°, zeigt geringfügige Agglomeratbildung, erkennbar an der Abweichung des Fit-Residuums von 0 (rot markiert). Die Agglomeratgröße wurde aus fünf winkelabhängigen Messungen ermittelt. Der apparente Diffusionskoeffizient wurde jeweils aus dem kombinierten Exponential-Fit (Triexp + Biexp + Monoexp) der Autokorrelationsfunktion bestimmt. Aus der Extrapolation $q \rightarrow 0$ ergibt sich über $\langle D \rangle_z$ ein Agglomeratradius $\langle R_{\text{agg}} \rangle_z$ von 90,2 nm.

Vesikel des PB₁₃₀PEO₆₆-COOH-Polymers mit Carboxyl-Endgruppe anstelle der Hydroxylgruppe zeigten eine vergleichsweise geringe Tendenz zur Agglomeration (Abb. 4.18). Der kombinierte Exponential-Fit der Autokorrelationsfunktion weicht nur sehr gering von den gemessenen Daten ab. Ermittelt man dennoch eine Agglomeratgröße, würde diese mit $\langle R_h(\text{Agg}) \rangle_z = 91,6 \text{ nm}$ in der gleichen Größenordnung wie bei den Hydroxylvesikel liegen, mit einem Amplitudenanteil von 0,3 wäre die Konzentration der Agglomerate jedoch geringer.

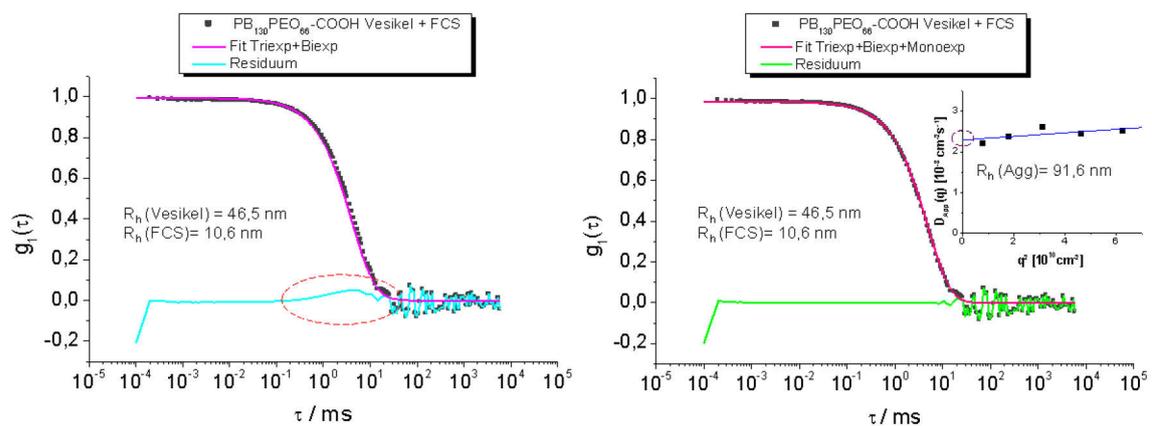


Abb. 4.18: DLS-Analyse des Agglomerationsverhaltens von PB₁₃₀PEO₆₆-COOH Vesikeln in Wechselwirkung mit Serumproteinen. DLS-Messung mit einer Serumkonzentration von 6 mg/mL in Medium und 0,01 mg/mL PB₁₃₀PEO₆₆-COOH bei 23 °C, Streuwinkel 60°, zeigt geringfügige Agglomeratbildung, erkennbar an der Abweichung des Fit-Residuums von 0 (rot markiert). Die Agglomeratgröße wurde aus fünf winkelahängigen Messungen ermittelt. Der apparente Diffusionskoeffizient wurde jeweils aus dem kombinierten Exponential-Fit (Triexp + Biexp + Monoexp) der Autokorrelationsfunktion bestimmt. Aus der Extrapolation $q \rightarrow 0$ ergibt sich über $\langle D \rangle_z$ ein Agglomeratradius $\langle R_{\text{agg}} \rangle_z$ von 91,6 nm.

Zusätzlich wurden Vergleichsexperimente mit reinem Rinderserumalbumin (BSA) anstelle von Kälberserum durchgeführt. BSA wies im Lichtstreuexperiment einen hydrodynamischen Radius von $\langle R_h \rangle_z = 3,8 \text{ nm}$ auf. Für die Mischungen aus Polymervesikeln und BSA ergab sich eine Radiusvergrößerung für die Hydroxylvesikel um 2,8 nm und für die Carboxylvesikel um 2,4 nm. Diese Ergebnisse zeigen somit bei ausschließlicher Präsenz von BSA eher die Ausbildung einer Proteinkorona in Form einer Monoschicht um die Vesikel als eine Agglomeration mehrerer Vesikel.

Die Vesikel des kürzeren PB₃₂-PEO₂₉-Polymers zeigten in der dynamischen Lichtstreuung in der Mehrkomponentenanalyse unabhängig von der Endgruppe keine Agglomeratbildung in DMEM-Medium mit 10 % FCS (Abb. 4.19). Dieses Ergebnis gibt

Hinweise darauf, dass für die proteinrepulsive Wirkung des PEO-Blocks tatsächlich die Kettenlänge entscheidend ist (vgl. Abschnitt 4.1.3).

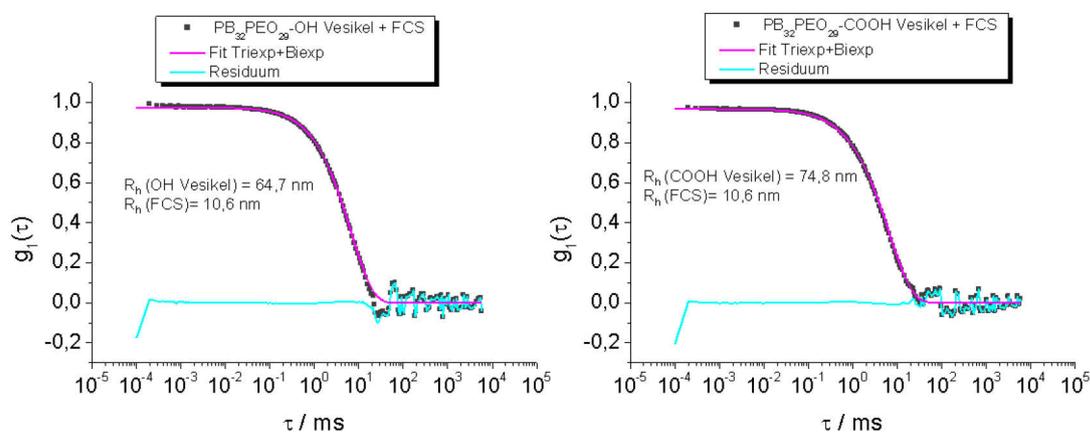


Abb. 4.19: DLS-Analyse des Agglomerationsverhaltens von Vesikeln aus $\text{PB}_{32}\text{PEO}_{29}\text{-OH}$ bzw. COOH in Wechselwirkung mit Serumproteinen. DLS-Messung mit einer Serumkonzentration von 6 mg/mL in Medium und 0,01 mg/mL $\text{PB}_{32}\text{PEO}_{29}$ bei 23 °C, Streuwinkel 60, zeigt keine Agglomeratbildung.

PEO wird im Allgemeinen als proteinrepulsiv beschrieben. Diese Wirkung von PEO-Ketten auf die Proteinadsorption auf Oberflächen wird durch die hohe Flexibilität und sterische Abwehr der hydrophilen Polymerketten erklärt. Dennoch wird die Wechselwirkung von PEO und Proteinen kontrovers diskutiert. Experimente demonstrierten beispielsweise, dass das Phasenverhalten von PEO und Wasser mit dem Molekulargewicht des Polymers variiert.^{247, 248} Außerdem wurden unterschiedliche Konformationen einzelner Ethylenoxid-Segmente beschrieben, welche zwischen polar (*gauche Konformer*) und unpolar (*trans Konformer*) wechseln können und dementsprechend auch in verschiedener Weise mit Wasser wechselwirken.²³⁸⁻²⁴¹ Gleichzeitig mit dem Interaktionsverhalten des Polymers mit Wasser könnte sich demnach auch das proteinrepulsive Verhalten in eine möglicherweise proteinadhäsive Interaktion wandeln.²⁴² Attraktive Wechselwirkungen zwischen PEO-Ketten und dem Protein Streptavidin wurde von Elfremova et al. für PEO mit Molekulargewichten von 5000 g/mol beschrieben.²⁴⁹ Experimente zu dem Adsorptionsverhalten von BSA und Polyethylenoxid (auf Polystyroloberflächen) zeigten ebenfalls proteinadhäsive Wirkung. Dabei nahm mit steigender Kettenlänge (148 – 700 EO-Segmente, entspricht 6500 – 30800 g/mol) auch die Menge an adsorbiertem Protein zu.²⁵⁰ Neben dem enthalpischen

Anteil einer schwachen hydrophoben Interaktion zwischen PEO und BSA könnten möglicherweise auch Entropieeffekte eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu frei gelösten Polymerketten können Polymerketten, welche an einer Oberfläche fixiert vorliegen, nicht von voller Konformationsfreiheit profitieren, sodass die Bildung von Komplexen mit Proteinen möglicherweise entropisch bevorzugt sein könnte.

Der Unterschied bei der Proteinadsorption der Vesikel, welche sich ausschließlich durch die Blocklängen der Polymere unterscheiden, ist daher offenbar durch die zuvor diskutierte Kettenlängen-Abhängigkeit der Protein-PEO-Interaktion zu begründen. Dieser Zusammenhang zwischen PEO-Blocklänge und Proteinadsorption könnte demnach auch eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung der Kugelmizellen aus PB₃₂-PEO₂₉ und PB₁₃₀-PEO₆₆ in den Zytotoxizitätsuntersuchungen darstellen, da - wie bereits erwähnt - die Proteinadsorption einen Einfluss auf die Zellinternalisierung von Nanopartikeln hat (Abschnitt 4.1.3).²⁴³⁻²⁴⁵

4.1.5 Polymersom-Zell-Interaktion

Ergänzend zu den Lichtstremessungen wurde auch die Wechselwirkung der Vesikel mit Zellen für unterschiedliche Oberflächenladungen untersucht. Dabei sollte insbesondere auch der Einfluss von Serumproteinen auf die Polymersom-Zell-Wechselwirkung beurteilt werden. Um die Polymer-Vesikel im Zellexperiment verfolgen zu können, wurden hier Phloxin B-beladene Vesikel verwendet (vgl. Abschnitt 4.1.2.1). Die Bindung der Polymer-Vesikel an HeLa-Zellen wurde nach Inkubation in verschiedenen Medien mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Inkubation wurde dabei entweder in PBS-Pufferlösung oder in DMEM-Zellkulturmedium mit 10 % FCS durchgeführt. Um ausschließlich die Zellbildung zu detektieren, während energieabhängige Endozytoseprozesse gehemmt sind, wurden die Zellen für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Die Zellbindung in PBS ist offenbar von der Oberflächenladung der Vesikel abhängig. PB₃₂-PEO₂₉-COOH-Vesikel mit Carboxyl-Endgruppen binden im Vergleich zu den Hydroxylvesikeln stärker an die Zellen (Abb. 4.20 oben).

Fand die Zellinkubation mit Polymersomen jedoch in Gegenwart von Serumproteinen (DMEM-Medium mit 10 % FCS) statt, konnten kaum noch Unterschiede bei der Zellbindung zwischen den Vesikeln mit verschiedenen Endgruppen gefunden werden

(Abb 4.20 unten). Zudem war die Bindung der Partikel an die Zellen insgesamt stark reduziert. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass sich auch um die Vesikel aus dem kürzeren Polymer PB₃₂-PEO₂₉ eine Proteinkorona ausbildet, welche Einfluss auf die direkte Wechselwirkung mit den Zellen hat. Reines DMEM-Medium ohne FCS-Zusatz beinhaltet neben anorganischen Salzen, auch Glukose, Aminosäuren und Vitamine. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch diese Komponenten die Polymersom-Zell-Wechselwirkung mit beeinflussen. An dieser Stelle sei noch einmal erwähnt, dass sämtliche Zytotoxizitätsuntersuchungen generell in DMEM-Medium, ergänzt mit 10 % FCS, durchgeführt wurden.

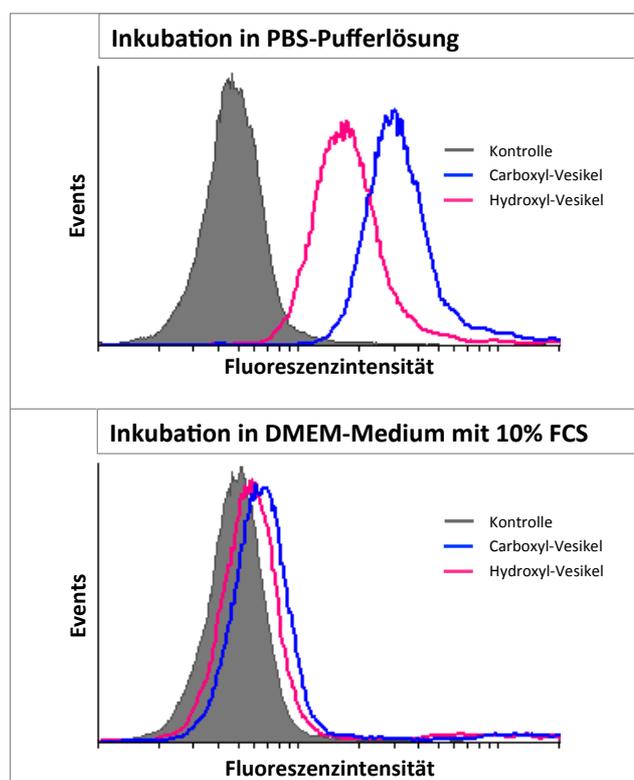


Abb. 4.20: Durchflusszytometrie: Analyse der Zellbindung in Abhängigkeit der Oberflächenladung der Polymervesikel aus PB₃₂-PEO₂₉.²⁵¹ Histogramme von HeLa-Zellen zeigen ladungsabhängige Zellaufnahme der Polymervesikel in PBS. In Zellkulturmedium, das Serumproteine enthält, ist die unspezifische Zellaufnahme stark reduziert. Die Kontrolle un behandelter Zellen ist in grau dargestellt. Die Zell-Inkubation mit Phloxin-B-beladenen Vesikeln wurde in PBS-Puffer pH 7 bzw. DMEM Medium mit 10 % FCS, 60 min bei 4 °C durchgeführt.

Die Analyse der Proteinkorona von Nanopartikeln ist Gegenstand aktueller Forschung und ist auf Grund der enormen Vielfalt im Plasmaproteom und der Austauschdynamik der verschiedenen Partikel sehr komplex.^{245, 252-254} Bei Untersuchungen von Silica-Nanopartikeln und Polystyrol-Nanopartikeln wurden beispielsweise bereits über 125 verschiedene Plasmaproteine identifiziert.^{13, 14} Inwiefern die Zusammensetzung der Proteine auf der Nanopartikeloberfläche von dessen Größe, Material, Rauheit und Ladung beeinflusst wird und in welcher Weise die biologische Identität des Partikels schließlich die Wechselwirkungen an der Bio-Nano-Grenzfläche bestimmt, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. In Zellexperimenten wurde jedoch grundsätzlich ein Zusammenhang zwischen der Präsenz von Serumproteinen und der Zellaufnahme von Nanopartikeln beobachtet.^{245, 254, 255} Die Untersuchung der Zellaufnahme von Nanopartikeln *in vitro* wird oftmals in serumfreiem Zellkulturmedium durchgeführt, da viele Partikel in Anwesenheit von Serumproteinen zur Agglomeration neigen. Die hier vorgestellte Zellbindungsstudie zeigt jedoch deutlich, dass die Zellbindung maßgeblich durch die Anwesenheit von Serumproteinen beeinflusst wird, auch wenn diese nicht zwangsläufig mit der Agglomeration der Polymervesikel in Verbindung steht. Des Weiteren zeigten die Carboxylvesikel im Vergleich zu den Hydroxylvesikeln eine stärkere Zellbindung. Diese Tendenz blieb auch in Präsenz von Serumproteinen bestehen. Eine ähnliche Studie mit Polystyrol-Nanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung zeigte ähnliche Trends bezüglich der Zellaufnahme in HeLa-Zellen.²⁵⁶ Auch hierbei war die Zellbindung und Internalisierung in serumfreiem Medium *in vitro* deutlich stärker als nach Zusatz von fetalem Rinderserum. Der Vergleich in der Zellaufnahme bezogen auf die Oberflächenladung bestätigte ebenfalls die hier gezeigten Zusammenhänge. So wurden sowohl in serumfreiem Medium als auch nach Serumzusatz die negativ geladenen Partikel in höherem Maß aufgenommen als ungeladene oder positiv geladene Partikel.²⁵⁶ Die bevorzugte Aufnahme negativ geladener Nanopartikel wurde ebenfalls in anderen *In-vitro*-Zellstudien beschrieben.^{225, 244, 255}

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch an Polymervesikeln aus Blockcopolymeren mit dem proteinrepulsiven PEO als hydrophilem Block durchaus Proteinadsorption stattfindet. Die Wechselwirkung der Serumproteine mit PEO ist dabei offenbar von der Blocklänge abhängig. Unabhängig von der Blocklänge kann keine vollständige Prävention der Proteinadsorption erreicht werden.

Generell ist eine Adsorption von Serumalbumin für die Anwendung in der Medizin jedoch nicht nachteilig zu sehen, da Albumin zur Klasse der Dysopsonine zählt und damit eine erwünschte Verlängerung der Blutzirkulation zur Folge haben kann.

Photos et al. untersuchten beispielsweise die *In-vivo*-Blutzirkulationszeit von PB-*b*-PEO-Vesikeln verschiedener Kettenlängen im Vergleich zu Liposomen und PEGylierten Liposomen (*Stealth-Liposome*). Hierbei wiesen auch die Polymervesikel aus dem längsten Polymer mit PB₁₃₀-PEO₈₀, welches einem PEO-Molekulargewicht von 3680 g/mol entspricht, eine im Vergleich zu Liposomen und Stealth-Liposomen lange Zirkulationszeit (mit $t_{1/2} = 25,5$ h) auf.²⁵⁷

Die Anwesenheit von Serumproteinen führte für beide hier untersuchten Polymervesikel zu einer reduzierten Zellbindung. Ein Ziel der Nanomedizin ist die unspezifische Zellaufnahme möglichst zu minimieren, um Nebenwirkungen an gesundem Gewebe zu verhindern, daher ist im Grunde auch dieser Effekt wünschenswert.

Die Zellbindung der Polymervesikel an HeLa-Zellen in PBS zeigte dennoch eine Abhängigkeit von der Oberflächenladung der Partikel. Die Tendenz zur bevorzugten Bindung von negativ geladenen Vesikeln im Vergleich zu neutralen Hydroxyl-Vesikeln war auch nach Serumzugabe noch schwach zu erkennen. Somit ist offenbar auch nach Ausbildung einer Proteinkorona die ursprüngliche Oberflächenfunktionalisierung von Bedeutung. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass auch bei Ausbildung einer Proteinkorona eine Funktionalisierung der Vesikeloberfläche mit spezifischen Targeting-Liganden durchaus erfolgsversprechend sein kann. Die Liganden wären somit für eine spezifische Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren auf den Zielzellen zugänglich und könnten eine rezeptorvermittelte Zellaufnahme in erkrankte Zellen ermöglichen. Um die Zugänglichkeit der Liganden weiter zu verbessern, könnten diese über einen *Spacer-Arm* an die Polymersom-Oberfläche gekuppelt werden.

4.2 Polymer-Vesikel aus Poly(ethylenoxid)-*block*-Poly(propylenoxid)-*block*-Poly(ethylenoxid)

Im Hinblick auf potenzielle Anwendungen in der Nanomedizin wurde auch die Herstellung und Beladung von Vesikeln aus dem Triblockcopolymer Poly(ethylenoxid)-*block*-Poly(propylenoxid)-*block*-Poly(ethylenoxid), kurz PEO₅PPO₆₈PEO₅, im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dieses Polymer ist unter dem Handelsnamen Pluronic® L121 kommerziell erhältlich. Pluronic®-Polymere gelten im Allgemeinen als biologisch gut verträglich. Einige Pluronic®-Polymere sind bereits für verschiedene Anwendungen in Medizin und Kosmetik von der US-Behörde FDA zugelassen (vgl. Abschnitt 2.3.4).¹²² Die Hürden für neue Medikamente wie auch neue Arzneiformulierungen sind aufgrund der strengen Zulassungsregularien sehr hoch. Für die Entwicklung eines Wirkstoffträgersystems bietet daher ein bereits geprüftes, sicheres Ausgangsmaterial enorme Vorteile und damit verbesserte Chancen, in den klinischen Studien den hohen Anforderungen an das Sicherheitsprofil zu genügen.

Pluronic®-Polymere sind in einer Vielzahl von Blocklängenkompositionen erhältlich (vgl. Abschnitt 2.3.4). PEO-reiche Pluronic®-Polymere bilden in Wasser im Allgemeinen sphärische oder stäbchenförmige Mizellen. Konzentrations- und temperaturabhängig kann es dabei auch zu einem Übergang in ein Polymergel kommen.^{212, 258} Pluronic® L121 gehört mit nur 10 % PEO zu den PPO-reichsten Pluronic®-Polymeren und unterscheidet sich stark im Phasenverhalten von den hydrophileren PEO-PPO-PEO-Blockcopolymeren.

Eine Studie zum Phasenverhalten von Pluronic® L121 (PEO₅PPO₆₈PEO₅) in einem D₂O/*p*-Xylol-System zeigte eine bevorzugte Bildung lamellarer und reverser (Wasser-in-Öl) Strukturen für das PPO-reiche Polymer.²⁵⁹ Im Vergleich dazu wurden bei einem PEO-reichen Blockcopolymer mit ähnlichem Molekulargewicht PEO₄₃PPO₁₆PEO₄₃ (80 Gew.-% PEO) bevorzugt normale (Öl-in-Wasser) Strukturen beobachtet. Während für ein weiteres Polymer PEO₁₉PPO₄₃PEO₁₉ (40 Gew.-% PEO) mittleren PEO-Anteils eine volle Phasensequenz von L₁ (normale Mizelle (Öl-in-Wasser)) über L_α (lamellare Phase) bis zu L₂ (reverse Mizelle (Wasser-in-Öl)) beobachtet wurde, wies Pluronic® L121 bei keiner Lösungsmittelkomposition Normalphasen bei 25 °C auf. Offenbar führt also die Blockkomposition dieses relativ hydrophoben Polymers mit dem sehr geringen PEO-Anteil zu einer eingeschränkten Phasensequenz. In konzentrierten Blockcopolymer-

systemen wird das Phasenverhalten wie bereits erwähnt maßgeblich von zwei Beiträgen der freien Energie bestimmt: von der Grenzflächenenergie und von dem Entropieverlust aufgrund der geordneten Zusammenlagerung der hydrophoben Ketten. Diese Triebkräfte bestimmen die Phasensequenz in der Polymerschmelze als Funktion der Blockkomposition. Für die Selbstorganisation von PEO-PPO-PEO-Blockcopolymeren in wässriger Umgebung ist dennoch der *hydrophobe Effekt*, also die Entropie des Wassers, als Haupttriebkraft der Aggregation anzusehen. Dies wurde durch eine umfassende Studie zur kritischen Aggregationstemperatur und kritischen Aggregationskonzentration von zwölf verschiedenen Pluronic®-Polymeren experimentell bestätigt.²⁵⁸ In dieser thermodynamischen Untersuchung wurden für alle Polymere positive Enthalpie-Werte (ΔH°) für die Polymeraggregation bestimmt. Die freie Energie ΔG° der Mizellisierung ist offenbar dennoch negativ, da eine spontane Bildung thermodynamisch stabiler Mizellen stattfindet. Folglich muss dieser endotherme Prozess entropisch getrieben sein.

Pluronic®-L121-Polymere bilden aufgrund des hohen hydrophoben Anteils (nur 10 Gew.-% PEO) in wässriger Umgebung keine sphärischen Mizellen, sondern bevorzugt lamellare Strukturen aus.²⁶⁰ Aus diesem Grund eignet sich dieses Polymer gut zur Herstellung polymerer Vesikel, welche mit einem hydrophilen inneren Kompartiment sowie einer äußeren hydrophoben Membran gute Voraussetzungen zum Lösen und Transportieren verschiedener Wirkstoffkomponenten bieten.

Im Vergleich zu Vesikelstrukturen aus den zuvor beschriebenen PB-*b*-PEO-Diblockpolymeren verhalten sich Pluronic®-L121-Vesikel in einigen Punkten deutlich unterschiedlich.

Wegen der Molekülstruktur des symmetrischen Triblocks, verglichen mit dem asymmetrischen PB-*b*-PEO-Diblock, differieren Pluronic®-Vesikel stark in ihrer Membranarchitektur (Abb. 4.21). Während sich die PB-*b*-PEO-Vesikelmembran aus zwei sich gegenüberliegenden Monoschichten bildet, wobei die hydrophoben Polymerketten zum Teil interdigitieren, können sich die Pluronic®-Polymere in der Membran auf verschiedene Arten anordnen: Aufgrund der Block-Komposition hydrophil-hydrophob-hydrophil kann eine Polymerkette die gesamte Membrandicke durchspannen (I-Form), alternativ können jedoch auch beide hydrophilen Blöcke entweder der wässrigen Umgebung oder dem hydrophilen inneren Lumen des Vesikels zugewandt sein (U-Form).

Nach Noolandi und Svensson steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich beide hydrophilen Segmente auf der gleichen Seite des PPO-Blocks anordnen, mit zunehmender Größe der hydrophoben Domäne in der lamellaren Phase.^{261, 262} Die apparente Membrandicke der L121-Vesikel nach Abschätzungen über den Massendickenkontrast aus Cryo-TEM-Aufnahmen ist mit 3 – 5 nm relativ klein, sodass hierbei vermutlich der Großteil der Polymerketten eher die gesamte Membrandicke durchspannt.¹³¹

Ein weiterer Unterschied zwischen PB-*b*-PEO-Vesikeln und Pluronic®-Polymersomen liegt in der Löslichkeit des hydrophoben Blocks. Generell ist der PPO-Block besser wasserlöslich als der PB-Block. Im zuvor beschriebenen Experiment zum Phasenverhalten von Pluronic® L121 (PEO₅PPO₆₈PEO₅) in einem D₂O/*p*-XyloI-System wurde bei einer vollständigen Sättigung des PEO-Blockes mit Wasser in der lamellaren Phase ein molekulares Verhältnis von Wasser zu EO von ungefähr 24 ermittelt.²⁵⁹ Diese Wassermenge übersteigt die theoretische Löslichkeit von Wasser in PEO. Diese Tatsache weist darauf hin, dass Wassermoleküle zum Teil auch den PPO-Block solvatisieren.

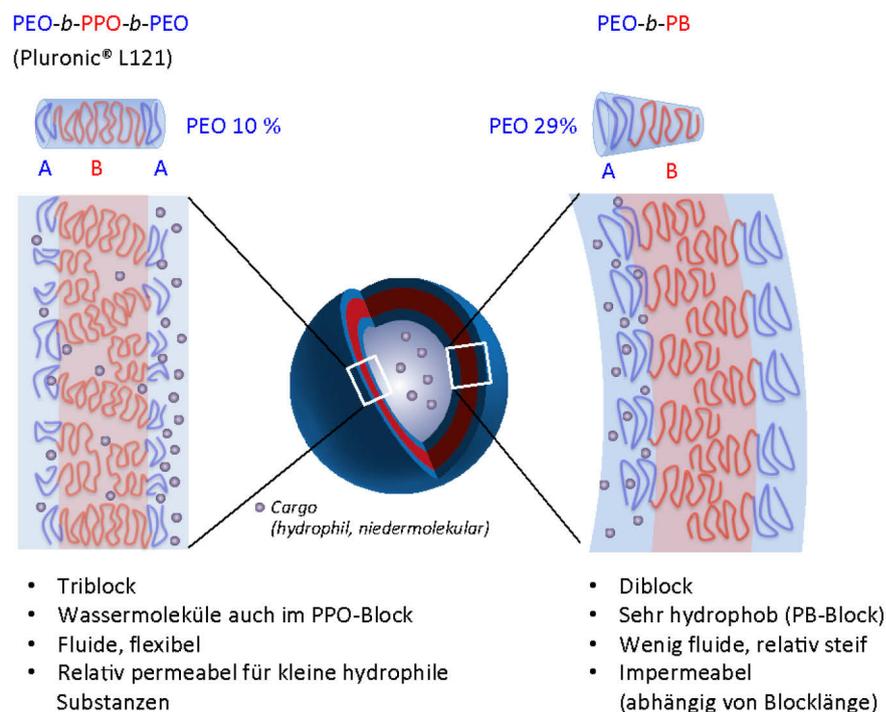


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der Vesikelmembran aus Pluronic® L121 (PEO-PPO-PEO) und PEO-*b*-PB im Vergleich.

PEO₅-PPO₆₈-PEO₅ weist zudem thermoresponsives Verhalten auf. Wird Pluronic® L121 auf Temperaturen unterhalb der LCST des PPO-Blocks von 15 °C gekühlt, so löst sich der gesamte Triblock in der wässrigen Umgebung und die supramolekulare Struktur des Vesikels desorganisiert sich (vgl. Abschnitt 2.3.4.2, Abb. 2.13).

Unabhängig von diesem thermoresponsiven Verhalten ist die Membranpermeabilität der PEO-PPO-PEO-Vesikel in wässriger Phase im Vergleich zur PB-PEO-Membran erhöht, so dass verschiedene kleine geladene wie auch ungeladene Moleküle durch die Membran diffundieren können. Eine Studie von Rodriguez-Garcia et al. demonstrierte beispielsweise die Durchlässigkeit von Pluronic®-L121-Vesikeln für Calcein im direkten Vergleich zu Vesikeln aus PB₄₆PEO₂₉ (M = 3800 g/mol), welche im Gegensatz dazu Membranintegrität für den Farbstoff zeigten.¹¹⁷

Diese Permeabilität, welche offenbar mit der höheren Solvatisierung der Membran in Zusammenhang steht, ermöglicht eine zeitverzögerte Freisetzung von eingekapselten Substanzen, wie z.B. Wirkstoffen, was es zusammen mit der guten Bioverträglichkeit zu einem vielversprechenden System für den Einsatz in der Nanomedizin macht.

4.2.1 Herstellung und Beladung von Pluronic®-Polymersomen

Pluronic® L121 unterscheidet sich auch im Hinblick auf die Herstellungsmöglichkeiten von Vesikeln vom PB-PEO-Modellpolymer. Letzteres ermöglicht die Herstellung von Vesikelstrukturen mittels Filmrehydratation oder auch der einfachen Batch-Ausführung der Co-Lösungsmittelmethode, bei der sukzessive der Wasseranteil der Polymerlösung (zunächst in THF) erhöht wird. Pluronic® L121 neigt auf Grund des sehr hohen hydrophoben Anteils (90 %) und der damit verbundenen Molekülgeometrie zur Bildung von größeren Lamellen, wohingegen die Vesikelbildung, insbesondere die kleiner Vesikel mit hoher Krümmungsenergie, thermodynamisch nicht bevorzugt ist.^{130, 131} Foster et al. berichteten bereits über die Herstellung von L121-Vesikeln im Mikrometer-Bereich mittels Doppelemulsionsmethode.²⁶³ Kleinere Vesikel mit Radien unter 100 nm wurden bisher zumeist in 2-Stufen-Prozessen wie beispielsweise mittels Ultraschall und nachfolgender Extrusion durch eine Polycarbonat-Membran hergestellt.^{131, 133} Bryskhe et al. demonstrierten die spontane Bildung von L121-Vesikeln aus einer auf 8 °C gekühlten, verdünnten Polymerlösung in Wasser, welche nachfolgend durch Temperaturerhöhung zur Aggregation gebracht wurde.¹³⁰ Dabei wurden unilamellare Vesikel mit Radien

zwischen 30 und 200 nm mit einer exponentiellen Größenverteilung erhalten. Diese waren über einige Stunden stabil, jedoch zeigte sich nach wenigen Wochen Präzipitation, welche vermutlich auf die Bildung größerer Lamellen zurückzuführen ist.

Mit dem Ziel, eine kontinuierliche Herstellung nanoskaliger Vesikel mit enger Größenverteilung zu realisieren, wurde die bereits vorgestellte Mikromischer-Technologie an das Pluronic®-L121-Polymer adaptiert. Gleichzeitig wurde eine *In-Situ*-Beladung der gebildeten Vesikel erfolgreich umgesetzt.

Die Mikromischer-Technologie beruht auf dem Grundprinzip der Co-Lösungsmittelmethode (Abschnitt 2.3.2). Für die Auswahl eines geeigneten Co-Lösungsmittels ist die Erfüllung folgender Grundvoraussetzungen entscheidend: Das Co-Lösungsmittel sollte ein gutes Lösungsmittel für beide Blocksegmente sein und es sollte unbegrenzt mit dem selektiven Lösungsmittel, hier Wasser, mischbar sein. Zusätzlich sollte das Co-Lösungsmittel auch die Beladung der Vesikel ermöglichen, d.h. beispielsweise auch stark hydrophobe Komponenten, welche in die Vesikelschale integriert werden sollen, gut lösen. Zwei gute Lösungsmittel für eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen, die gleichzeitig unbegrenzt mit Wasser mischbar sind, sind z.B. DMSO und THF. DMSO wird häufig zur Lösungsvermittlung von Fluoreszenzfarbstoffen oder für die Kryokonservierung von Zellen in der Biologie eingesetzt. Es weist eine relativ hohe Dichte ($1,1 \text{ g/cm}^3$) wie auch Viskosität (2,14 mPas bei 20 °C) auf, weshalb es bei einer Mischung mit Wasser aufgrund der langsamen Diffusion vergleichsweise lange Zeit zur vollständigen Homogenisierung benötigt. THF mit einer Dichte von $0,89 \text{ g/cm}^3$ und einer Viskosität von 0,55 mPas liegt deutlich niedriger, wodurch eine schnelle Mischung in der mikrofluidischen Anlage gewährleistet ist. Des Weiteren lassen sich in THF beispielsweise auch Ölsäure-stabilisierte Eisenoxidpartikel lösen, während diese in DMSO, welches nicht mit Alkanen mischbar ist, präzipitieren. Aus den hier genannten Gründen wurde somit THF auch für die Herstellung von Pluronic®-Vesikeln als Co-Lösungsmittel gewählt.

Im Gegensatz zu den PB₁₃₀-PEO₆₆-Polymeren lassen sich mit Pluronic® L121 mit der Co-Lösungsmittelmethode im Batch keine Vesikel herstellen. Offenbar verläuft hierbei die Bildung von großen lamellaren Strukturen so schnell, dass es bereits nach kurzer Zeit zur Präzipitation kommt und keine stabile Vesikellösung entsteht. Um eine vorzeitige

Phasenseparation zu vermeiden, wurde daher bei der Herstellung von Pluronic®-Vesikeln auf eine Vormischung mit Wasser verzichtet. Um dennoch einen genügend hohen Anteil des selektiven Lösungsmittels für die Strukturbildung zu erreichen, wurden asymmetrische Mischbedingungen gewählt. Flussraten von 1 mL/min für die Polymerlösung und 10 mL/min für das selektive Lösungsmittel Wasser erwiesen sich dabei als praktikabel. Anders als die PB-PEO-Diblock-Polymere welche mit 29 % – 43 % PEO unter diesen Bedingungen nahezu ausschließlich kugelmizellare Strukturen bilden würden, aggregiert das Triblockpolymer Pluronic® L121 mit nur 10 % PEO unter diesen asymmetrischen Flussbedingungen in vesikuläre Strukturen, während die Ausbildung der bevorzugten großen Lamellen im Mischer verhindert wird.

Die Unterschiede im Aggregationsverhalten im Mikromischer zwischen PB-*b*-PEO und dem nun vorgestellten Pluronic® L121 sind neben dem hohen hydrophoben Anteil auf weitere Faktoren zurückzuführen.

Grundsätzlich unterscheiden sich Tri- und Diblockpolymere in ihrem Aggregationsverhalten. Die Gruppe um Adi Eisenberg zeigte beispielsweise für ein Triblockcopolymer aus Polystyrol und Poly[5-(N,N,-Diethylamino)isopren] neben Unterschieden in der Löslichkeit auch die Bildung besonderer schalenartiger Polymeraggregate, während sich das Diblockpolymer vergleichbarer Komposition mit identischen Blocklängen unter gleichen Bedingungen in Vesikelstrukturen organisierte.²⁰⁰

Zusätzlich zur Triblockkomposition handelt es sich bei Pluronic® L121 mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 4400 g/mol um ein relativ kleines Polymer, welches dementsprechend einen kleinen hydrodynamischen Radius und damit einen vergleichsweise hohen Diffusionskoeffizienten aufweist. Verglichen mit PB₁₃₀-PEO₆₆ (M = 10800 g/mol), welches mit mehr als dem doppelten Molekulargewicht sehr viel langsamer diffundiert, ist somit wahrscheinlich auch die Kinetik der Selbstorganisation des Pluronic® L121 sehr viel schneller. Des Weiteren könnte sich auch der Mechanismus der Strukturbildung der beiden Polymersysteme unterscheiden. Während bei den nun für die Vesikelherstellung aus Pluronic® L121 eingestellten sehr hohen Flussgeschwindigkeiten bei allen hier untersuchten PB-PEO-Polymeren ausschließlich Mizellen entstanden, wurden für Pluronic® L121 zu keiner Zeit mizellare Strukturen gefunden. Dies könnte zum einen mit der schnelleren Selbstorganisation zusammenhängen, jedoch auch in einem veränderten Bildungsmechanismus aufgrund der besonderen Molekülgeometrie begründet sein. Außerdem unterscheiden sich, wie bereits

erwähnt, auch die Membranarchitekturen der beiden Polymersysteme. Während bei PB-PEO-Diblockpolymeren eine Doppelschicht aus jeweils zwei gegenüberliegenden Monoschichten aufgebaut ist, kann die Membran aus Pluronic® L121 aus nur einer Polymerschicht gebildet werden, in welcher der Triblock die gesamte Dicke durchspannt. Ein ebenfalls nennenswerter Unterschied der beiden diskutierten Polymere liegt in der Löslichkeit bzw. Mobilität einzelner Polymerketten im Lösungsmittelgemisch. Während für PB-*b*-PEO-Polymere die Diffusion in einem THF/Wasser-Gemisch bereits ab ca. 70 % Wasseranteil auf Grund der sehr geringen Löslichkeit stark eingeschränkt ist und die Struktur kinetisch gefangen bleibt, liegt Pluronic® L121 selbst in reinem Wasser bei Raumtemperatur neben lamellaren Aggregaten noch teilweise in unimolekularen Ketten vor.¹³⁰ Demzufolge wird der Prozess der Selbstorganisation des Pluronic® L121 im Vergleich zum PB-*b*-PEO im Mikromischer nicht so abrupt beendet, weshalb es den Erwartungen entspricht, dass selbst unter Annahme eines vergleichbaren Strukturbildungsmechanismus über die Kugelmizelle als Zwischenstruktur auch bei sehr hohen Mischgeschwindigkeiten keine sphärischen Mizellen aus dem L121-Polymer erhalten werden können. Pluronic® L121 besitzt zudem mit beiseitig jeweils nur fünf EO-Segmenten (im Vergleich zu 29 EO-Segmente für das kürzeste hier verwendete PB-PEO-Polymer, $M \approx 3300$ g/mol) wahrscheinlich nicht die Möglichkeit die instabile Zwischenstruktur der Kugelmizellen ausreichend sterisch zu stabilisieren.

Mit den hier eingestellten hohen Flussgeschwindigkeiten lässt sich die Bildung relativ einheitlicher nanoskaliger Vesikel aus Pluronic® L121 im Mikromischer realisieren. Die vergleichsweise schnelle Strukturbildung im Mikromischer ermöglicht gleichzeitig den Einbau von stark hydrophoben Komponenten, welche unter anderen Bedingungen in direktem Kontakt mit Wasser sofort ausfallen würden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pluronic®-Polymersome als auch Hybrid-Polymersome mit hydrophiler und hydrophober Beladung hergestellt und umfassend charakterisiert. Für Modell-Untersuchungen dienten dabei die Farbstoffe Phloxin B und Rhodamin B als Cargo. Im Hinblick auf die Entwicklung eines theranostischen Wirkstoffträgersystems wurden zudem hydrophobe Eisenoxid-Nanopartikel in die Vesikelmembran eingebaut sowie eine Beladung der Polymersome mit dem Zytostatikum Camptothecin durchgeführt. Das potenzielle Wirkstoffträgersystem wurde anschließend bezüglich des Freisetzungsverhaltens *in vitro* untersucht sowie die zytotoxische Wirkung des verkapselten Wirkstoffs auf Krebszellen getestet. Zusätzlich wurde die Möglichkeit zu

einem aktiven Targeting über eine Oberflächenfunktionalisierung mit dem spezifischen Liganden Bombesin geprüft. Das Potenzial der Hybrid-Polymersome für die medizinische Bildgebung als theranostischer Nanotransporter wurde zudem mit Hilfe verschiedener Messungen zu den magnetischen Eigenschaften evaluiert.

Auf die einzelnen Systeme wird im Folgenden näher eingegangen. In Abb 4.22 ist zusammenfassend noch einmal der allgemeine Versuchsaufbau für die Herstellung und Beladung von Polymersomen im Mikromischer schematisch dargestellt.

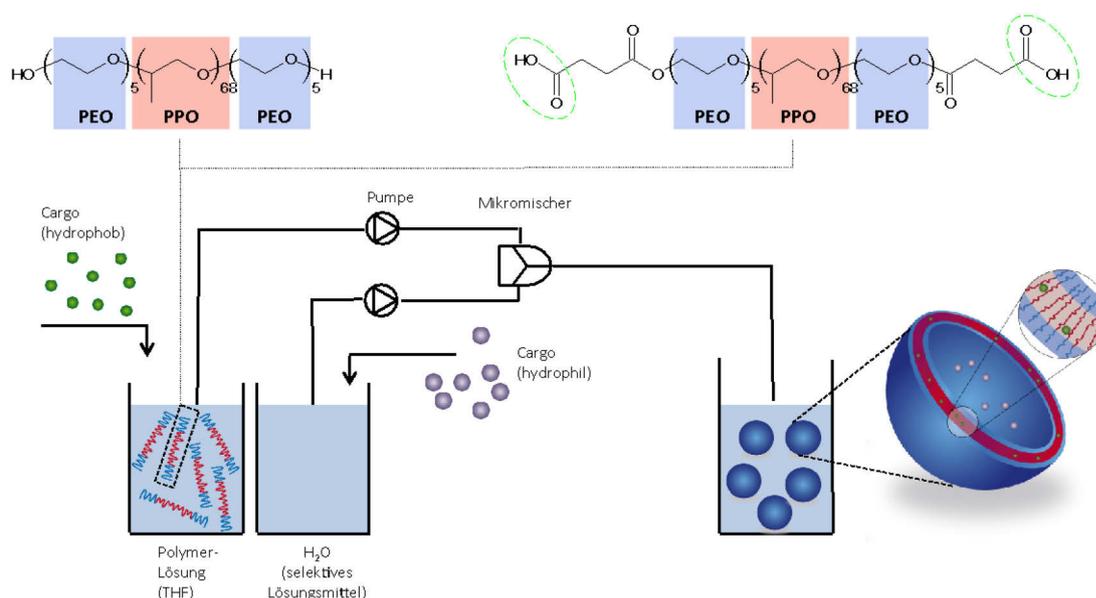


Abb. 4.22: Kontinuierliche Herstellung beladener Pluronic®-Polymersome. Die Startlösung beinhaltet das PEO-PPO-PEO-Polymer in Tetrahydrofuran, welches ein gutes Lösungsmittel für beide Blöcke darstellt. Diese wird sehr schnell dem selektiven Lösungsmittel (Wasser) für den PEO-Block im Mikromischer in Kontakt gebracht, wodurch die Selbstorganisation der Polymer-Vesikel induziert wird. Die Beladung mit hydrophoben Substanzen (z.B. Ölsäure stabilisierte Eisenoxidnanopartikel oder schwer wasserlösliche Wirkstoffe) kann durch einfache Zugabe in die Start-Polymerlösung vor dem Mischen realisiert werden. Aufgrund ihrer Lipophilie werden diese dann während des Strukturbildungsprozesses in den hydrophoben Bereich der Membran eingebaut. Hydrophile Substanzen können entweder in das Wasserreservoir gegeben werden oder, wenn es die Löslichkeit erlaubt, auch in die THF-Startlösung. Es folgt eine vollständige Entfernung des Co-Lösungsmittels sowie gegebenenfalls eine Aufreinigung der beladenen Vesikel durch Dialyse und/oder Gelfiltration. Die Carboxylierung des Polymers im Vorfeld der Polymersom-Herstellung kann zusätzlich eine weitere Oberflächenmodifikation z.B. mit Peptiden oder Proteinen zu Targeting-Zwecken gewährleisten.

4.2.1.1 Kontrollierte Vesikelbildung aus Pluronic® L121 und L121-COOH

Eine kontrollierte Herstellung einheitlicher Polymervesikel im Submikrometerbereich ist insbesondere für biomedizinische Anwendungen sehr wichtig. Die exakte Größe ist zwar nur einer von vielen Faktoren, welcher den Weg eines Nanotransporters durch den Körper beeinflusst, dennoch ein entscheidender Faktor. Vesikel mit Radien zwischen 50 und 100 nm besitzen ein verhältnismäßig großes Innenvolumen, welches für hydrophile Beladung genutzt werden kann. Zudem sind sie groß genug, um eine renale Ausscheidung zu verhindern. Gleichzeitig sind Polymervesikel dieser Dimensionen klein genug, um beispielsweise durch die Lücken erweiterter Blutgefäße in Tumorgewebe oder an Entzündungsherden gelangen zu können und so vom passiven Targeting nach dem *Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR Effekt)* profitieren. Des Weiteren erleichtert eine Größe unterhalb 200 nm im Durchmesser eine Sterilfiltration, welche für medizinische Anwendungen oft unabdingbar ist.

Im Hinblick auf einen gezielten Wirkstofftransport sollte auch das Anknüpfen eines spezifischen Targeting-Liganden an der Polymersom-Oberfläche möglich sein, damit neben der Ausnutzung des *EPR-Effekts* im Sinne des passiven Targetings für Nanotransporter auch eine aktive Targeting-Strategie verfolgt werden kann. Dazu wurde eine Modifikation des PEO₅-PPO₆₈-PEO₅-Polymers mit Hilfe von Bernsteinsäureanhydrid durchgeführt (Abb. 4.23).

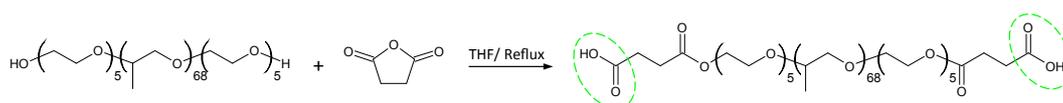


Abb. 4.23: Reaktionsschema: Carboxylierung von Pluronic® L121

IR-Spektroskopie-Messungen bestätigten den Erfolg der Carboxylierung. Das Spektrum der Probe nach der Modifikation und Aufreinigung weist eine deutliche Bande im typischen Absorptionsbereich einer Carbonylfunktion von 1670-1820 cm⁻¹ auf (Abb. 4.24). Die Spektren des unbehandelten Pluronic® L121 im direkten Vergleich zur modifizierten Probe sind noch einmal im Anhang gezeigt (Abb. 9.2).

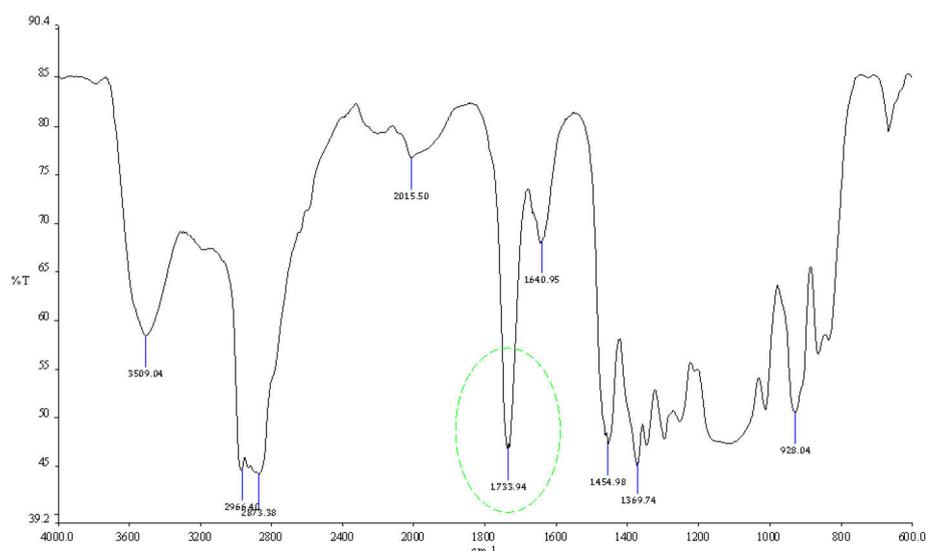


Abb. 4.24: IR-Spektrum nach Carboxylierung des Pluronic® L121 mit Bernsteinsäureanhydrid. Die typische Carbonylbande ist mit einer grünen Markierung versehen.

Die Vesikelherstellung im Mikromischer erfolgte wie bereits erwähnt bei asymmetrischen Flussbedingungen von 1 mL/min (10 g/L Polymerlösung in THF) und 10 mL/min Wasser. Sowohl das Polymer Pluronic® L121 als auch das carboxylierte Polymer L121-COOH organisieren sich unter diesen Bedingungen in vesikuläre Strukturen. Die Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung ergab einen mittleren hydrodynamischen Radius R_h von 60 nm für Vesikel aus L121 und für das carboxylierte Polymer einen etwas größeren mittleren Vesikelradius R_h von 75 nm (Tab 4.5). Die μ_2 -Werte liegen mit 0,11 und 0,13 höher als für die im Mikromischer hergestellten PB₁₃₀-PEO₆₆-Vesikel, jedoch in der gleichen Größenordnung der extrudierten Vesikelproben des PB₃₂-PEO₂₉ (vgl. 4.1.1.3). In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei Pluronic® L121 um ein großtechnisches Produkt handelt, welches eine vergleichsweise hohe Polydispersität aufweist und zudem sehr wahrscheinlich mit Homopolymeren der Blocksegmente verunreinigt ist, ist diese relativ enge Größenverteilung, welche vergleichbar mit einer extrudierten Probe ist, durchaus zufriedenstellend.

Mit Hilfe der statischen Lichtstreuung wurde zusätzlich der Trägheitsradius R_g der Vesikelproben ermittelt. Das ρ -Verhältnis R_g/R_h , welches in beiden Fällen nahe des theoretischen Wertes für eine Hohlkugelstruktur ($\rho = 1$) lag, bestätigt damit das Vorliegen der vesikulären Struktur. Des Weiteren wurde das ζ -Potential beider Proben bestimmt. Vesikel des carboxylierten Polymers wiesen dabei deutlich stärker negative Werte auf als

die unmodifizierten Pluronic®-Vesikel. Diese Verschiebung des ζ -Potenzials bestätigt damit das Ergebnis der IR-Spektroskopie und zeigt ebenfalls die erfolgreiche Konvertierung der Hydroxyl-Endgruppen in die negativ geladenen Carboxyl-Endgruppen.

Tab. 4.5: Analyse der hergestellten Pluronic®-L121- und L121-COOH-Vesikel

Probenname	R_h [nm]	μ_2^a (90°)	R_g^b [nm]	$\rho = R_g/R_h$	ζ -Potenzial [mV]
L121	60	0,11	61	1,02	-19±2
L121-COOH	75	0,13	77	1,03	-44±3

^a Mittlerer hydrodynamischer Radius der Polymersome wurde aus winkelabhängiger, dynamischer Lichtstreuung ermittelt. Der zweite Kumulant μ_2 kann als Maß der Poly-dispersität angesehen werden (nach der Kumulanten-Methode^{209, 264} entspricht $\mu_2=0,05$ bei 90° Streuwinkel einer Polydispersität im Radius von ca. 25%).

^b R_g Trägheitsradius aus statischer Lichtstreuung bei 0,1 g/L

Eine hydrophile Beladung der Pluronic®-L121-Vesikel mit den Farbstoffen Phloxin B und Rhodamin B erfolgte bei gleichen experimentellen Bedingungen, jedoch wurde der jeweilige Farbstoff im Wasserreservoir ergänzt und die Vesikel anschließend über eine Gelfiltrationssäule aufgereinigt. Der Zusatz der Farbstoffe hatte keine Auswirkung auf den Strukturbildungsprozess. Untersuchung der zeitlichen Stabilität der Pluronic®-L121-Vesikel in Abhängigkeit ihrer Beladung werden in Abschnitt 4.2.2 diskutiert.

4.2.1.2 Beladung von Pluronic®-L121-Vesikel mit hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikeln

Die Kombination von magnetischen Nanopartikeln und einem vesikulären Wirkstoff-trägersystem ist auf Grund der vielfältigen Möglichkeiten im biomedizinischen Anwendungsbereich von besonderem Interesse. Wie bereits erwähnt, können so therapeutische Funktionen wie der Wirkstofftransport oder auch Hyperthermie-Behandlungen mit diagnostischen Verfahren wie beispielsweise MRT kombiniert werden, wodurch eine Nachverfolgung des Nanotransporters innerhalb des Körpers möglich würde. In dem zuvor beschriebenen PB-*b*-PEO-Modellsystem konnten maximal 4 % (w/w) hydrophober Eisenoxid-Nanopartikel bezogen auf die Polymerkonzentration mit Hilfe der Mikromischertechnologie eingebaut werden. Für einige Anwendungsgebiete wie beispielsweise die magnetische Lenkung des Wirkstoffträgers durch den Körper oder eine durch ein externes alternierendes Magnetfeld induzierte Wirkstofffreisetzung würde eine höhere und homogenere Beladung der Vesikel mit magnetischen Nanopartikeln eine verbesserte Leistung bedeuten.

Ziel war somit die Beladungsdichte der Pluronic®-Polymersome im Vergleich zu dem PB-*b*-PEO-System deutlich zu steigern. Wichtig war auch hierfür die Herstellung von relativ eng verteilten Proben, da die Partikelgröße erheblichen Einfluss auf die Blutzirkulation, die Klärung aus dem Blutkreislauf durch das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) und damit auf die Biodistribution hat (vgl. 1.2.3).

Die *In-Situ*-Beladung von L121- und L121-COOH-Vesikeln mit magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln erfolgte unter gleichen Mischbedingungen wie die Herstellung der leeren Vesikel. Die Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Partikel wurden der Polymerstartlösung in THF zugesetzt. Es wurden magnetische Polymersome mit 4 – 50 % (w/w) erfolgreich hergestellt. Die Verkapselungseffizienz, also der Anteil der eingebauten Nanopartikel bezogen auf die eingesetzte Menge an Partikeln, lag in allen Fällen nahe 100 %. Dies wurde durch eine thermogravimetrische Analyse bestätigt (Daten im Anhang, Abb. 9.3). Es wurde zu keiner Zeit eine Präzipitation der Eisenoxid-Nanopartikel beobachtet.

Die erhaltenen Magnetvesikel zeigten eine relativ enge Größenverteilung mit $\mu_2(90^\circ) < 0,1$, welche demnach im Vergleich zu den unbeladenen Vesikeln noch verbessert war. Die Beladung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Strukturbildung. Alle Radien $\langle R_h \rangle_z$ lagen weiterhin unterhalb 100 nm. Auch für die beladenen Vesikel

wiesen die ζ -Potential-Messungen erwartungsgemäß die gleichen Unterschiede für die Hydroxyl- und die Carboxyl-Vesikel auf. In Tab 4.6 sind die Kenndaten der hergestellten Magnetvesikel zusammengefasst.

Tab. 4.6: Charakteristika hergestellter L121- und L121-COOH-Vesikel mit Eisenoxid-Beladung

Probenname	R_H [nm]	μ_2^a (90°)	ζ -Potential [mV]	Eisenoxid ^b [%(w/w)]
L121 (4% Fe _x O _y)	62	0,07	-19±3	4,1
L121 (8% Fe _x O _y)	63	0,04	-17±3	7,1
L121 (16% Fe _x O _y)	63	0,03	-19±2	17,4
L121 (50% Fe _x O _y)	62	0,03	-17±3	49,8
L121-COOH (8% Fe _x O _y)	73	0,08	-45±3	7,6

^a Mittlerer hydrodynamischer Radius der Polymersome wurde aus winkelabhängiger, dynamischer Lichtstreuung ermittelt. Der zweite Kumulant μ_2 kann als Maß der Polydispersität angesehen werden (Nach der Kumulanten-Methode^{209, 264} entspricht $\mu_2=0,05$ bei 90° Streuwinkel einer Polydispersität im Radius von ca. 25%).

^b Angegebener Eisenoxidgehalt bezieht sich auf die Polymerkonzentration und wurde mittels Thermogravimetrischer Analyse ermittelt.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Hybrid-Polymersome visualisiert. Das Pluronic®-Polymer hat im Vergleich zu Eisenoxid auf Grund der geringen Massendichte nahezu keinen Kontrast unter dem Elektronenmikroskop. Die beladenen Polymersome erscheinen daher weitestgehend als isolierte Anhäufungen von Eisenoxid-Nanopartikeln, welche die sphärische Morphologie der Vesikel andeuten.

Abb. 4.25 (links) zeigt eine TEM-Aufnahme einer getrockneten Vesikelprobe aus carboxyliertem Pluronic® L121 mit ca. 8 % Eisenoxid-Gehalt. Einige der magnetischen Polymersome sind trotz des Wasserentzugs in ihrer kugelförmigen Morphologie noch erkennbar. Im Gegensatz zu dem PB-*b*-PEO verfügt das Pluronic®-Polymer nicht über Doppelbindungen, welche für eine Vernetzung ausgenutzt werden können. Oft ist die Stabilität unvernetzter Polymervesikel in getrocknetem Zustand nicht mehr gegeben, sodass diese aufgrund ihrer Hohlkugelstruktur kollabieren. Offenbar helfen im Fall der hier gezeigten Hybrid-Polymersome die eingebauten hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel, die Vesikelmembran zu stärken und damit zumindest teilweise ihre Vesikelstruktur zu bewahren. Vesikel mit zu geringem Eisenoxid-Gehalt kollabierten

dennoch und erscheinen in der TEM-Aufnahme daher als kleinere, weniger definierte Partikelgruppen. Dadurch erscheint diese Probe in der TEM-Aufnahme relativ polydispers.

Ein einfacher Versuch zeigte, dass sich die hergestellten magnetischen Polymersome (7,6 % Eisenoxid) mit Hilfe eines äußeren Magnetfeldes (hier ein Stabmagnet) aus der Dispersion separieren lassen (Abb. 4.25, rechts). Die Möglichkeit die magnetischen Polymersome mit Hilfe eines externen Magnetfeldes zu bewegen, könnte auch für ein potenzielles magnetisches Targeting von Interesse sein. Bealle et al. demonstrierten diese Möglichkeit mit Eisenoxid-beladenen Liposomen bereits im Zellversuch, bei welchem durch ein Magnetfeld eine erhöhte Zellaufnahme der Liposomen induziert werden konnte.²⁶⁵ Um diese Anwendung genauer zu evaluieren sind an den magnetischen Polymersomen Messungen zur magnetophoretischen Mobilität in Abhängigkeit des Eisenoxid-Gehaltes für die Zukunft geplant.

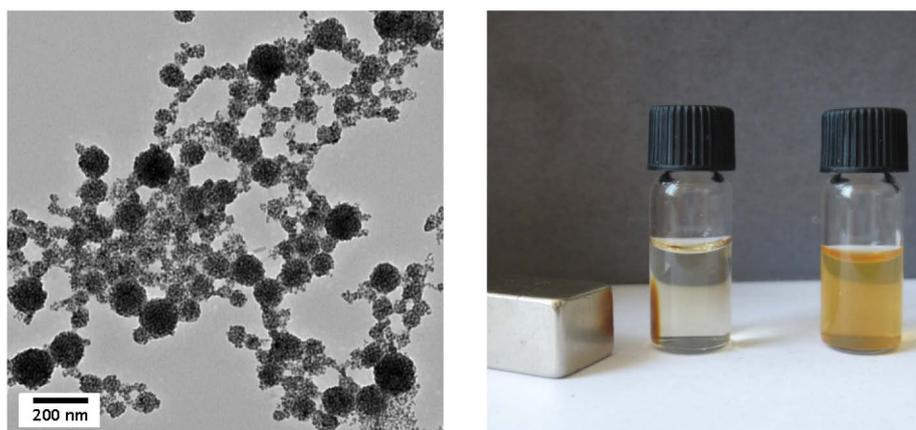


Abb. 4.25: TEM-Aufnahme einer getrockneten Vesikelprobe aus Pluronic[®]-L121-COOH, beladen mit magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (7,6 % Eisenoxidgehalt). Das Foto (rechts) zeigt die gleiche Probe in wässriger Dispersion vor und nach der Magnetseparation.

Kryogene Elektronenmikroskopie ermöglicht die Visualisierung einer Probe in wässriger Umgebung. Die Probe wird hierbei so schnell schockgefroren, dass die Bildung von Wasserkristallen weitestgehend vermieden wird und die Probe in ihrer „natürlichen“ Umgebung abgebildet werden kann. Mit Hilfe der Kryo-TEM-Technik wurden Aufnahmen von Magnetvesikeln mit unterschiedlicher Beladungsdichte erhalten (Abb. 4.26).

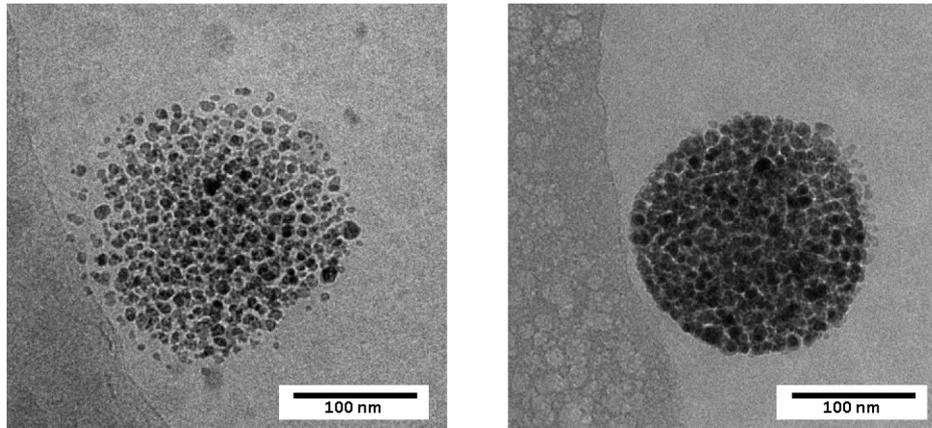


Abb. 4.26: Kryo-TEM-Aufnahmen von L121-Vesikeln, hydrophob beladen mit 4,1 % Eisenoxid (links) und 17,4 % (w/w) Eisenoxid (rechts) in der Vesikelmembran.²⁶⁶ Copyright © 2013, Royal Society of Chemistry. Wiedergabe mit Genehmigung.

Beide Aufnahmen zeigen eine definierte sphärische Morphologie der Hybrid-Vesikel. Die Eisenoxidpartikel sind relativ homogen über die gesamte Vesikelmembran verteilt. Der Kontrast ist dabei über das ganze Vesikel gleichmäßig stark. Dies ist ein Hinweis auf eine vesikuläre Struktur, da für eine Kugelmizelle, bei der das Innere mit Magnetpartikeln gefüllt wäre, der Kontrast im Zentrum der Struktur deutlich höher als in der äußeren Region sein müsste. Mit Hilfe statischer Lichtstreuung wurde zudem exemplarisch für die Probe mit 17,4 % Eisenoxid der Trägheitsradius bestimmt. Dieser lag bei $R_g = 62$ nm ($R_h = 63$ nm) und bestätigte über das ρ -Verhältnis $R_g/R_h = 0,98$ damit ebenfalls die vesikuläre Hohlkugel-Struktur.

In den Kryo-TEM-Aufnahmen (Abb. 4.26) wiesen die Vesikel ca. 160 nm im Durchmesser auf. Dieser Wert liegt über den mittleren hydrodynamischen Durchmessern von ca. 125 nm aus der Lichtstreuung. Ausgehend von ca. 25 % Abweichung vom mittleren Radius, einem μ_2 -Wert von ca. 0,05 entsprechend, liegt der TEM-Durchmesser in dieser Aufnahme noch innerhalb der Partikelverteilung.

Eine Berechnung basierend auf der Bulk-Dichte von Magnetit ergab eine Anzahl von ca. 40 Eisenoxidpartikeln (mittlerer Durchmesser 6 nm) pro Vesikel mit einem Durchmesser von 160 nm und einer Beladungsdichte von 4 % (w/w). Die Kryo-TEM-Aufnahme zeigt zwar eine deutlich höhere Partikelanzahl, da es sich jedoch bei der Elektronenmikroskopie um eine Methode handelt, die nur einen relativ kleinen Ausschnitt der Probe zeigt, ist dieser statistisch oft nicht repräsentativ. Dennoch weist dieses

Ergebnis darauf hin, dass die Eisenoxid-Nanopartikel nicht vollständig homogen in den Vesikeln verteilt vorliegen.

In Abb. 4.27 sind Kryo-TEM-Aufnahmen einer Pluronic[®]-Vesikelprobe mit 50 % (w/w) Eisenoxid dargestellt. Die Nanopartikel sind hierbei relativ homogen über alle Vesikel verteilt. Die Magnetvesikel weisen zudem mit $\mu_2 = 0,03$ ($R_h = 62$ nm) eine vergleichsweise enge Größenverteilung auf. Auffällig ist bei den Vesikeln mit dieser hohen Beladungsdichte eine leichte Verformung der Membran, wodurch die Vesikel keine völlig sphärische Morphologie mehr aufweisen. Dennoch sind die Magnetvesikel über lange Zeit stabil und bleiben in ihrer Größe unverändert. Dieser Stabilisierungseffekt wird im nächsten Abschnitt 4.2.2 noch näher erläutert und diskutiert.

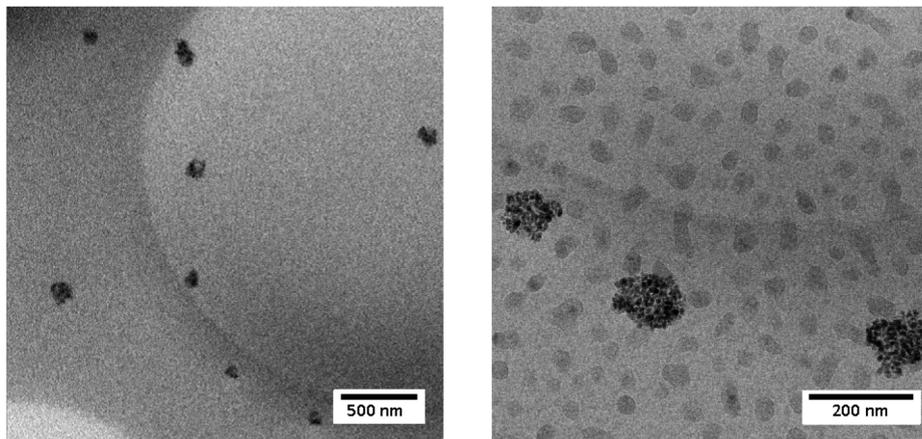


Abb. 4.27: Kryo-TEM-Aufnahmen einer Vesikelprobe aus Pluronic[®] L121 mit 50% (w/w) Eisenoxid

Zusammenfassend kann die Mikromischer-Technologie mit den hier genutzten hohen Flussraten (10 mL/min) als gut adaptierte Methode zur Herstellung von beladenen Pluronic[®]-Vesikeln beschrieben werden. Mit Hilfe der rapiden und effizienten Mischmethode wurden nicht nur sehr uniforme Vesikel erhalten, sondern gleichzeitig der effiziente Einbau von extrem hydrophoben, Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln ermöglicht, die unter anderen Bedingungen unmittelbar präzipitieren würden. Außerdem wurde ein recht hoher Durchsatz von 600 mg/h (bezogen auf die Polymerkonzentration) erzielt, welcher verglichen mit der auf wenige mg pro Ansatz beschränkten konventionellen Herstellung mittels Extrusion eine erhebliche Verbesserung darstellt. Eine weitere Durchsatzsteigerung mit höherer Polymerkonzentration sowie einer Flussratenerhöhung ist denkbar. Der Einsatz eines größeren Raupenmischers, z.B. Modell

CPMM-R600, könnte die Maßstabvergrößerung der Polymersom-Produktion zusätzlich erleichtern.

4.2.2 Stabilität der non-equilibrium L121-Vesikel in Abhängigkeit der Beladung

Pluronic® L121 hat, wie bereits zuvor erwähnt, die Ausbildung von großen lamellaren Strukturen anstelle von Vesikeln als thermodynamisch bevorzugte Morphologie. Die Mikromischer-Technologie ermöglicht die Herstellung von Vesikeln, jedoch verändern diese ihre Größe nach der Präparation noch weiterhin. Dies ist vor allem mit der guten Löslichkeit des gesamten Blockcopolymers zu erklären. Oberhalb der kritischen Aggregationskonzentration (*CAC critical aggregation concentration*) liegen weiterhin Unimere und Polymeraggregate nebeneinander vor. Dies wurde von Bryskhe et al. in einem NMR-Diffusionsexperiment gezeigt.¹³⁰ Anders als bei dem Phasenseparationsmodell, bei welchem die gebildeten Polymeraggregate als separierte Phase oberhalb der CAC angesehen wird, würde eine Beschreibung der Vesikelbildung des Pluronic® L121 als ein Assoziations-Dissoziationsgleichgewicht zwischen Aggregaten und Unimeren wahrscheinlich treffender sein.²⁵⁸ Die freie Diffusion einzelner Polymerketten erlaubt damit eine gewisse Dynamik und einen Austausch zwischen den Vesikeln, so dass es zur Ausbildung der thermodynamisch favorisierten größeren lamellaren Strukturen kommen kann. Im Gegensatz dazu verhindert bei PB-*b*-PEO-Nanostrukturen der hydrophobe PB-Block durch die geringe Wasserlöslichkeit, dass es zu einem Angleichen an das thermodynamische Gleichgewicht kommt, was wie zuvor gezeigt in kinetisch gefangenen Strukturen resultieren kann.

Die Veränderung der Pluronic®-Vesikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung beobachtet. Abb. 4.28 zeigt die Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten der gleichen L121-Vesikelprobe am Tag der Herstellung und im Vergleich nach 14 Tagen. Da der Diffusionskoeffizient reziprok mit dem Radius über die Stokes-Einstein-Gleichung in Zusammenhang steht, ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt dieser Auftragung eine Veränderung des mittleren Radius von 60,2 nm auf 105,8 nm nach 14 Tagen.

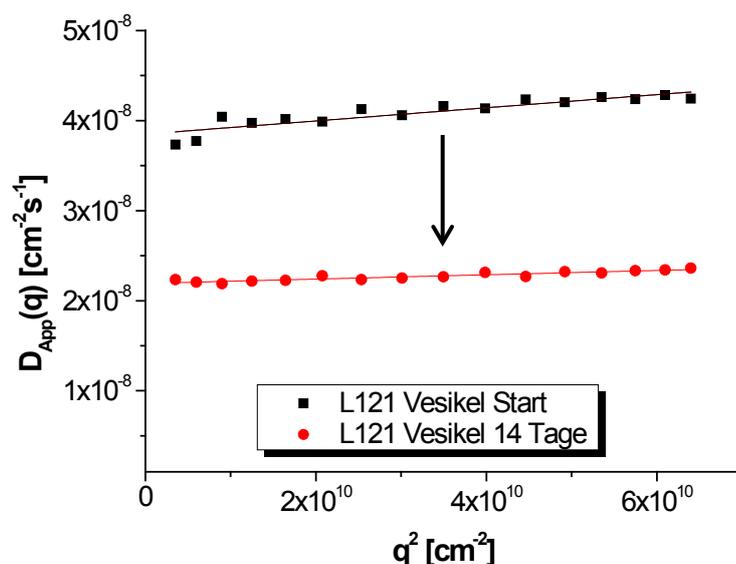


Abb. 4.28: DLS-Analyse der zeitabhängigen Veränderung von L121-Vesikeln. Gezeigt ist die Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten der identischen Probe am Tag der Herstellung und nach 14 Tagen. Die Vesikeldispersion hatte eine Konzentration von 0,4 g/L Polymer. Die aus der Extrapolation der Daten $q \rightarrow 0$ resultierend berechneten hydrodynamischen Radien betragen $R_h(\text{Start}) = 60,2$ nm mit $\mu_2 = 0,11$ und $R_h(14 \text{ Tage}) = 105,8$ nm mit $\mu_2 = 0,03$.

Dieses Anwachsen der Vesikelgröße kann durch das Bestreben nach der Reduktion der Krümmungsenergie und der Bildung von lamellaren Strukturen erklärt werden. Im Gegensatz zu der von Bryskhe et al. beschriebenen längerfristigen Sedimentation,¹³⁰ wurden bei den im Mikromischer hergestellten Pluronic®-Vesikel auch nach mehreren Monaten keine Zeichen von Präzipitation beobachtet. Möglicherweise ist hierfür die hohe Einheitlichkeit der gebildeten Vesikel verantwortlich. Existieren bereits zu Beginn große Aggregate können diese zu Lasten kleinerer Vesikel stark anwachsen, was längerfristig zur Präzipitation führt. Durch die Herstellung im Mikromischer wird die Bildung solcher großer Doppellagen verhindert und es kommt lediglich zu einer zeitabhängigen Vergrößerung der Vesikelradien. Die Kinetik des Vesikelwachstums ist dabei zu Beginn unmittelbar nach der Herstellung recht schnell (Radiuserhöhung um ca. 30 – 50 % innerhalb weniger Stunden), verlangsamt sich jedoch zunehmend. Möglicherweise existiert abhängig der Polymerkonzentration auch eine Gleichgewichtsgröße oder ein metastabiler Zustand, welcher durch die sehr langsame Diffusion großer Vesikel bedingt, kinetisch gehemmt ist. In verdünnter Vesikeldispersion (< 3 g/L) lag selbst nach über einem Jahr der mittlere hydrodynamische Radius noch unterhalb von 150 nm.

Die Stabilität der Pluronic®-L121-Vesikel scheint zusätzlich durch die Wechselwirkung mit anderen Komponenten im System beeinflusst zu werden. Neben der Beladung mit Magnetpartikeln wurden die L121-Vesikel nach gleichem Verfahren mit dem Farbstoff Rhodamin B beladen. Dieser wurde dem Wasserreservoir in einer Konzentration von 10 mg/L zugesetzt. Der überschüssige, nicht eingeschlossene Farbstoff wurde mittels Gelfiltration von den Vesikeln getrennt. Auch hier wurde die Probe am Tag der Herstellung und wieder nach zwei Wochen mittels DLS gemessen (Abb. 4.29). Diese Probe zeigte kaum eine Größenveränderung und wies zudem mit $\mu_2 > 0,06$ eine geringe Polydispersität auf. Die Vesikelgröße wurde jedoch im Gegensatz zu den unbeladenen Vesikeln mit der Zeit geringfügig kleiner von $\langle R_h \rangle_z = 65,5$ auf $\langle R_h \rangle_z = 57,9$. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die geringere Konzentration sein, da die Messungen an einer Polymersom-Dispersion mit 0,2 g/L Polymer anstelle von 0,4 g/L wie für die unbeladenen Vesikel durchgeführt wurde. Dementsprechend wurde vermutlich durch die Verdünnung das Gleichgewicht zwischen den Polymeraggregaten in Richtung der Unimere verschoben, so dass einzelne Polymerketten aus den Vesikeln herausdiffundierten. Die geringere Aggregationszahl bedingte dann folglich den kleineren hydrodynamischen Radius. Der Anteil an Unimeren in einer Pluronic®-L121-Dispersion ist generell vergleichsweise groß. So wurde beispielsweise für eine Probe mit 0,01 Gew.-% Pluronic® L121 in Wasser, also 0,1 g/L Polymer, bei 25 °C ein Anteil an Unimeren von ca. 40 % bestimmt.¹³⁰ Die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation wurde auch bei temperaturabhängigen Messungen zur kritischen Aggregationstemperatur von Pluronic®-Polymeren beobachtet.^{130, 258}

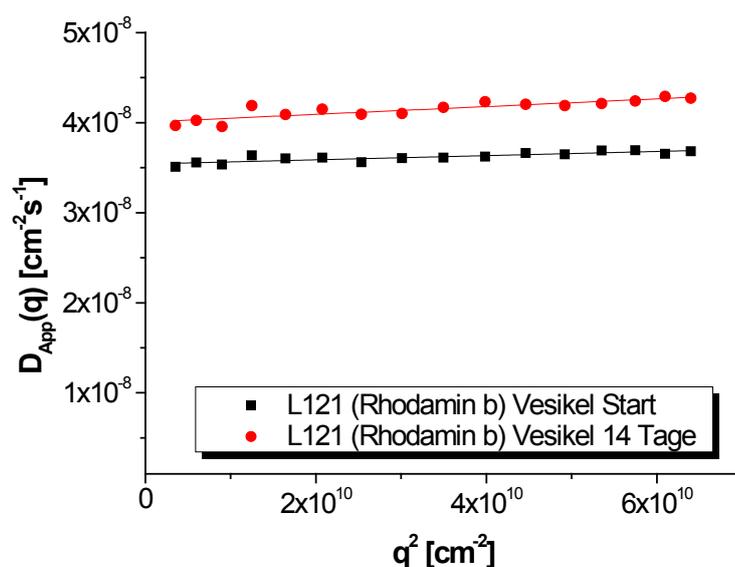


Abb. 4.29: Stabilisierender Effekt von Rhodamin B auf L121-Vesikel. Gezeigt ist die Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten der identischen Probe am Tag der Herstellung und nach 14 Tagen. Die Vesikeldispersion hatte eine Konzentration von 0,2 g/L Polymer (0,7 % (w/w) Rhodamin B, bezogen auf die Polymerkonzentration). Die aus der Extrapolation der Daten $q \rightarrow 0$ resultierend berechneten hydrodynamischen Radien betragen $R_h(\text{Start}) = 65,5$ mit $\mu_2 = 0,06$ und $R_h(14 \text{ Tage}) = 57,9$ nm mit $\mu_2 = 0,03$.

Rhodamin B besitzt aufgrund der geringen Größenveränderung sowie der geringen Polydispersität der beladenen Pluronic®-Vesikel offenbar eine stabilisierende Wirkung. Bei Rhodamin B handelt es sich um einen relativ hydrophilen Farbstoff. Bei Versuchen zur Membranpermeabilität an mikrometergroßen Pluronic®-L121-Vesikeln (*GUV giant unilamellar vesicles*) von Rodriguez-Garcia et al. wurde eine signifikante Akkumulation des Farbstoffes an der Vesikelmembran beobachtet.¹¹⁷ Zusammen mit der Tatsache, dass trotz der nachweislich hohen Permeabilität der Pluronic®-L121-Membran für hydrophile niedermolekulare Stoffe ein erheblicher Anteil des Rhodamin B innerhalb des Vesikels verblieb, lässt auf eine gewisse Affinität des Farbstoffes zur Pluronic®-L121-Membran schließen. Diese Wechselwirkung zwischen Rhodamin B und Pluronic® L121 könnte somit eine Erklärung für die verbesserte Stabilität der Vesikel sein.

Neben Rhodamin B wurden auch die hydrophoben Eisenoxidpartikel auf ihre stabilisierende Wirkung untersucht. Abhängig von der Konzentration der Eisenoxid-Nanopartikel wurde auch dort eine Stabilisierung der L121-Vesikel beobachtet. Schon bei einer Beladung von 4 % (w/w) Eisenoxid veränderten sich die Vesikel merklich weniger,

d.h. die Veränderung von $\langle R_h \rangle_z$ nach 2 Wochen differierte weniger als 10 % vom Ursprungswert. Bei Vesikeln mit 16 % (w/w) Eisenoxid-Nanopartikeln zeigten die Vesikel keine zeitabhängige Größenänderung mehr (Abb. 4.30). Selbst nach mehreren Monaten wurde hier mit $\langle R_h \rangle_z = 62,3$ nm keine signifikante Veränderung des mittleren hydrodynamischen Radius im Vergleich zur DLS-Messung am Tag der Herstellung ($\langle R_h \rangle_z = 62,5$ nm) beobachtet.

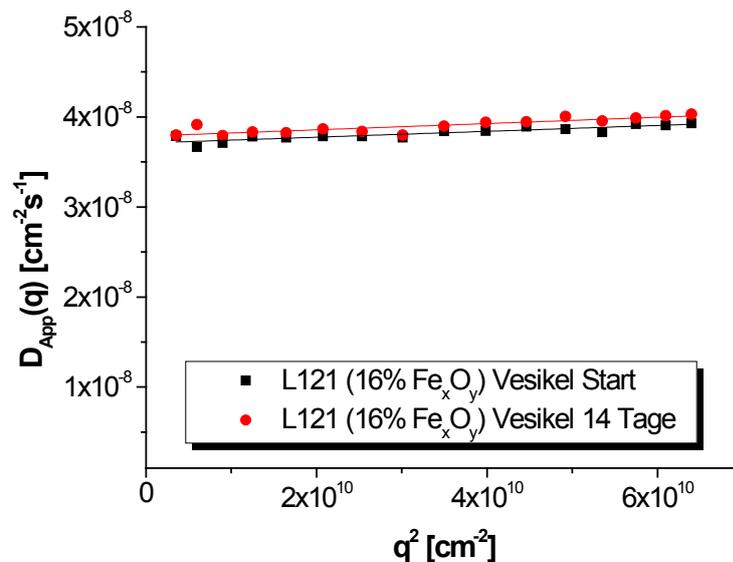


Abb. 4.30: Stabilisierender Effekt von hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikeln auf L121-Vesikel. Gezeigt ist die Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten der identischen Probe am Tag der Herstellung und nach 14 Tagen. Die Vesikeldispersion hatte eine Konzentration von 0,2 g/L Polymer. Die aus der Extrapolation der Daten $q \rightarrow 0$ resultierend berechneten hydrodynamischen Radien betragen $R_h(\text{Start}) = 62,5$ mit $\mu_2 = 0,06$ und $R_h(14 \text{ Tage}) = 61,2$ nm mit $\mu_2 = 0,08$.

Ergänzend zur zeitlichen Veränderung wurde die Stabilität auch im Hinblick auf die kritische Aggregationskonzentration untersucht. Insbesondere für die Anwendung im biomedizinischen Bereich ist es von Interesse, dass die Vesikel auch in hoher Verdünnung, z.B. nach der Injektion in den Blutkreislauf, stabil bleiben. In Abb. 4.31 sind die Messungen zur Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration gezeigt. Mit zunehmender Verdünnung nimmt die Streuintensität ab, bis sich alle Polymerketten in Lösung befinden und ein Plateau erkennbar ist. An diesem Punkt, d.h. dem Schnittpunkt aus den beiden linearen Regressionsgeraden kann die kritische Aggregationskonzentration ermittelt werden. Daraus ergibt sich für unbeladene L121-Vesikel ein Wert von 0,017 g/L. Dieser liegt etwas oberhalb des von Lee et al. publizierten Werts mit 0,0114 g/L, welcher nach der Pyrene-Methode bei 23 °C bestimmt

wurde.²⁶⁷ Diese Fluoreszenz-basierende Methode wäre jedoch für die Untersuchung der Eisenoxid-beladenen Vesikel ungeeignet. Für die mit 16 % Eisenoxid beladenen Vesikel wurde eine deutliche Verringerung der kritischen Aggregationskonzentration gefunden, welche um den Faktor 4 auf 0,0045 g/L (Polymerkonzentration) sank. Bei der Vesikelprobe mit 50 % (w/w) Eisenoxid konnte auch mit der sehr sensitiven Lichtstremethode keine Auflösung der Vesikelstrukturen mehr detektiert werden (Abb. 4.31, rechts). Die Eisenoxidpartikel liegen hier in hoher Anzahl eingebaut in der Vesikelmembran vor und sind zudem relativ homogen über alle Vesikel verteilt. Offenbar führt dies zu einer starken Stabilisierung der Vesikelprobe, sodass weder eine zeitliche Veränderung eintritt noch eine Destabilisierung durch Verdünnung induziert werden kann.

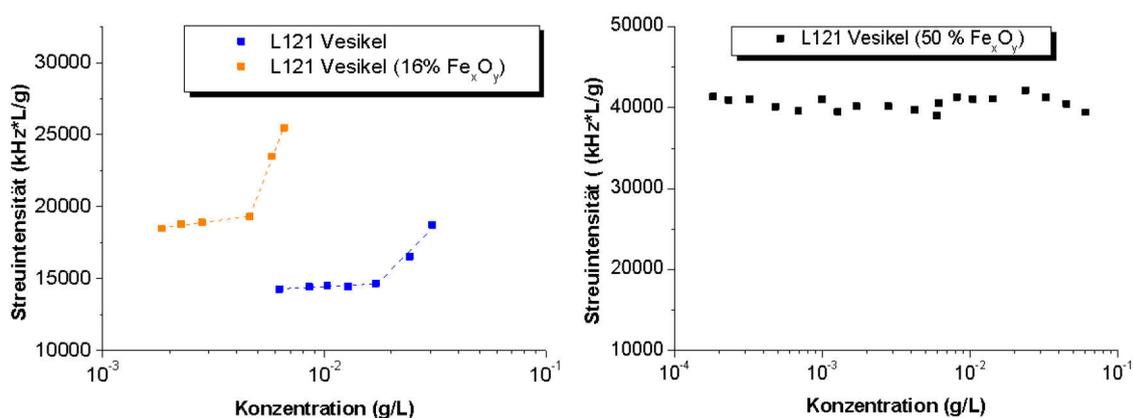


Abb. 4.31: Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration von L121-Vesikeln verschiedener Beladungsdichte mittels Lichtstreuung. Die Streuintensität wurde auf die Konzentration normiert. Aufgetragen gegen die Polymerkonzentration kann die kritische Aggregationskonzentration am Schnittpunkt der beiden Extrapolationsgeraden ermittelt werden. Es ergab sich 0,017 g/L für unbeladene Vesikel und 0,0045 g/L für L121-Vesikel mit 16 % Eisenoxid (links). Bei Vesikeln mit einem Eisenoxidgehalt von 50 % wurde kein Auflösen der Vesikelstruktur detektiert (rechts).

In Abb. 4.32 sind noch einmal die Daten für die Vesikelprobe mit 16 % Eisenoxid über einen größeren Konzentrationsbereich dargestellt. Es ist deutlich ein 2-Stufen-Verlauf zu erkennen. Dies könnte ein Hinweis auf eine inhomogene Verteilung der Eisenoxid-Nanopartikel über die Vesikel sein. Offenbar löst sich bereits im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,015 g/L Polymerkonzentration ein Teil der Aggregatstrukturen auf. Der Schnittpunkt der hier blau gekennzeichneten Regressionsgeraden liegt ca. bei 0,011 g/L. Dieser Wert entspricht dem Literaturwert für die CAC unbeladener Pluronic®-

L121-Vesikel und würde demnach das Auflösen leerer Vesikel anzeigen. Die zweite Stufe (Regressionsgerade orange gekennzeichnet) mit dem Schnittpunkt bei 0,0045 g/L repräsentiert dann die Desorganisation der beladenen Vesikel.

Diesen Daten zufolge scheint die Verteilung der Eisenoxid-Nanopartikel bei der *In-Situ*-Beladung im Mikromischer nicht vollständig homogen zu verlaufen. Möglicherweise führen attraktive Kräfte zwischen den Nanopartikeln bereits vor der Strukturbildung zu einer lockeren Aggregation. Die lokale Konzentrationserhöhung der Partikel führt dann zu einer inhomogenen Verteilung bei der Vesikelbildung.

Bei der Vesikelprobe mit 50 % Eisenoxid wurde im Lichtstreuexperiment kein frühzeitiges Auflösen einer zweiten Vesikelpopulation detektiert. Daher bewirkt möglicherweise die Erhöhung der Partikelkonzentration bis zu einer annähernden Sättigung der Vesikel eine verbesserte Verteilung über alle Vesikel. Des Weiteren könnte eventuell eine Homogenisierung der Partikel-Polymer-Mischung unmittelbar vor dem Eintritt in das Mischersystem die Verteilung über alle Vesikel verbessern. Alternativ könnten bei Bedarf durch einfache Magnetseparation beladene von unbeladenen Vesikeln getrennt werden.

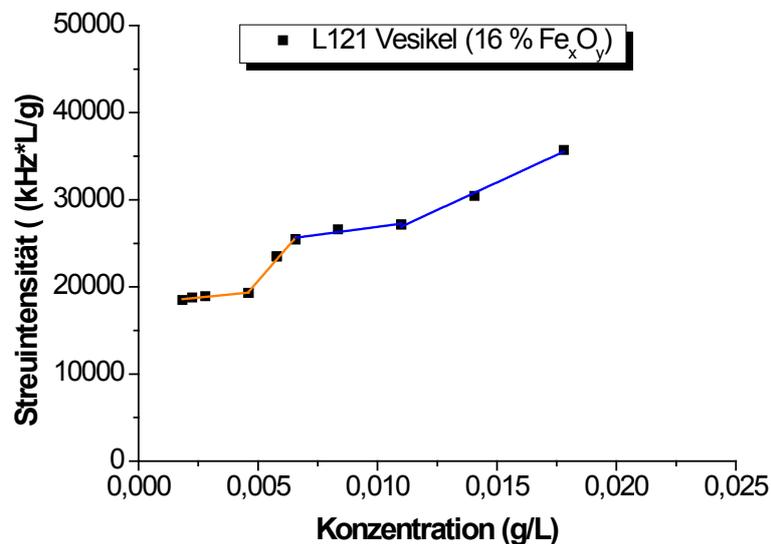


Abb. 4.32: Normierte Streuintensität von L121 Vesikeln mit 16% Eisenoxid in Abhängigkeit der Konzentration. Der 2-stufige Verlauf deutet auf das Vorliegen verschiedener Vesikel-Populationen hin. Die farbliche Kennzeichnung der Regressionsgeraden soll eine optische Zuordnung der Punkte zu der Population unbeladener Vesikel (blau) und beladener Vesikel (orange) darstellen.

Der Einbau der Eisenoxid-Nanopartikel bewirkte zusätzlich zur Herabsetzung der CAC auch eine verstärkte Temperaturbeständigkeit der Vesikel. Dieser Effekt konnte ebenfalls mittels Lichtstreuung und Kryo-TEM nachgewiesen werden (Abb. 4.33 und Abb. 4.34). Während sich die L121-Vesikel wie erwartet unterhalb von 15 °C komplett auflösen, konnten die Eisenoxid-beladenen Vesikel (16 % (w/w)) noch bei 7 °C detektiert werden, auch wenn sich der mittlere hydrodynamische Radius von 63 nm ($\mu_2 = 0,03$) auf 35 nm ($\mu_2 = 0,06$) sichtlich verringerte. Die Kryo-TEM-Aufnahmen stehen mit den DLS-Messungen in Bezug auf die Vesikelgröße in Einklang. Die vesikuläre Struktur bleibt offenbar auch deutlich unterhalb der kritischen Aggregationstemperatur des Pluronic® L121 intakt. Die Reduktion der Vesikelgröße ist wahrscheinlich durch das Herauslösen einzelner Polymerketten aus der Vesikelstruktur bedingt. Für andere Pluronic®-Polymere wie F68 und L64 wurde bereits eine Temperaturabhängigkeit der Aggregationszahl in der Literatur beschrieben. Diese zeigte ebenfalls eine Abnahme der Aggregationszahl mit sinkender Temperatur.^{268, 269}

Die zuvor beschriebenen Experimente zur CAC-Bestimmung gaben Hinweise auf eine teilweise inhomogene Verteilung der Partikel über alle Vesikel. Demzufolge würde der Anteil der Vesikel mit nur sehr wenig oder keiner Beladung bevorzugt zuerst aufgelöst. Da kein präzipitiertes Eisenoxid detektiert wurde, kam es jedoch offenbar auch bei 7 °C nicht zu einer vollständigen Auflösung beladener Vesikel.

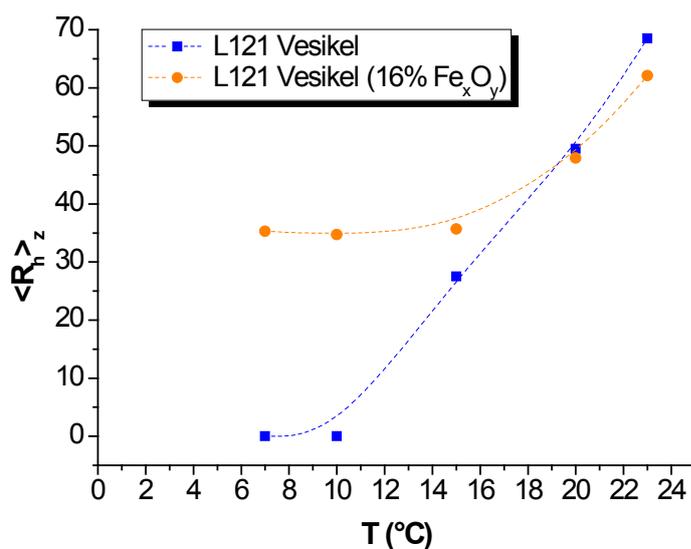


Abb. 4.33: Bestimmung der kritischen Aggregationstemperatur mittels DLS. Die Polymerkonzentration beider Proben betrug 0,2 g/L. Gestartet wurde die Messung bei 23 °C und anschließend sukzessive bis auf 7 °C abgekühlt. Die Verbindungslinien zwischen den Messpunkten dienen der optischen Orientierung und stellen keine Fit-Funktionen dar.

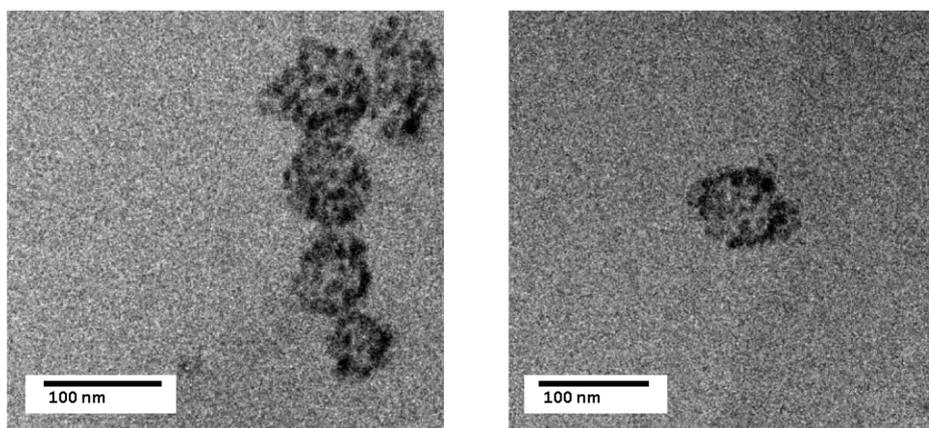


Abb. 4.34: Kryo-TEM-Aufnahmen: L121-Vesikel mit 16 % Eisenoxid bei 8 °C.

Nach der temperaturabhängigen Messung wurden die Proben wieder auf Raumtemperatur gebracht und nach zwei Wochen erneut gemessen. Erwartungsgemäß war dieser Prozess reversibel, so dass in beiden Proben wieder Vesikelstrukturen messbar waren (Tab. 4.7). Beide Proben erreichten auch wieder annähernd ihre ursprüngliche Größe mit nur einer geringfügig breiteren Größenverteilung. Die Reversibilität einer reinen L121-Vesikeldispersion nach Durchlaufen eines Temperaturzyklus in Bezug auf die ursprüngliche Größenverteilung als auch auf die Konzentration wurde bereits von Bryskhe et al. beschrieben.¹³⁰ Nach den Daten in Tab. 4.7 scheinen bei Erreichen der Starttemperatur offenbar auch die beladenen Vesikel wieder reversibel auf ihre Ursprungsgröße anwachsen zu können.

Tab. 4.7: Vesikel-Wiederfindung nach Durchlaufen eines Temperaturzyklus

Probenname	R_h [nm]	μ_2^a (90°)
L121 Start	68	0,08
L121 Recover*	62	0,1
L121 (16% Fe _x O _y) Start	62	0,03
L121 (16% Fe _x O _y) Recover*	65	0,08

^aMittlerer hydrodynamischer Radius der Polymersome wurde aus winkelabhängiger, dynamischer Lichtstreuung ermittelt.

*Nach Abkühlung der Probe, wurde diese wieder auf Raumtemperatur (23°C) gebracht und nach 2 Wochen erneut gemessen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch den Einbau von stabilisierenden Komponenten die zeitliche Größenveränderung der L121-Vesikel beeinflusst werden kann. Der Einbau der hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel ermöglichte eine Herabsetzung der kritischen Aggregationskonzentration sowie der kritischen Aggregationstemperatur. Diese Stabilisierung durch nicht-kovalente Wechselwirkungen ist im Vergleich zu anderen Methoden wie z.B. mit chemischen Vernetzungsmitteln (z.B. Pentaerythritol-tetraacrylat),¹³³ nicht-toxisch und zudem wird gleichzeitig das Anwendungsspektrum der Vesikel durch zusätzliche magnetische Eigenschaften erweitert (Abschnitt 4.2.5).

4.2.3 Freisetzungsmodell Phloxin B

Wie die PB-*b*-PEO-Vesikel wurden auch die L121-Vesikel mit dem pH-sensitiven Farbstoff Phloxin B beladen. Dazu wurde der Farbstoff dem Wasserreservoir in einer Konzentration von 80 mg/L zugesetzt. Die beladenen Vesikel wurden analog der L121-Vesikel unter identischen Mischbedingungen hergestellt. Der freie Farbstoff wurde durch Gelfiltration von den beladenen Vesikeln abgetrennt. Zur Untersuchung der Membranpermeabilität wurde auch hier die pH-Sensitivität des Phloxin B als Indikator ausgenutzt. Eine Veränderung des äußeren Mediums von neutral auf pH 1 führte zu einer vollständigen und sofortigen Löschung der Fluoreszenz (Abb 4.35). Die Membran der Vesikel ist demnach, anders als die PB-Vesikel, durchlässig für H⁺-Ionen (vgl. Abschnitt 4.1.2.1). Die Beladung mit Eisenoxid führte in diesem Fall zu keinem Unterschied verglichen mit den unbeladenen Vesikeln.

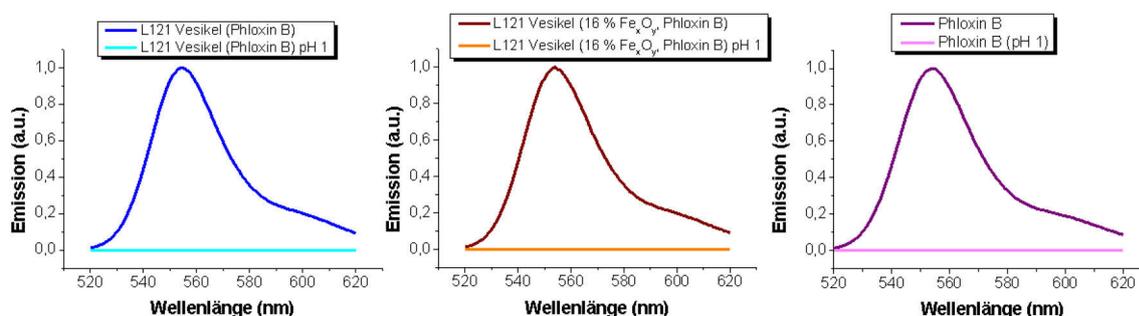


Abb. 4.35: pH-abhängige Fluoreszenzintensität von Phloxin-beladenen L121-Vesikeln. Die Proben wurden vor der Messung durch Gelfiltration von überschüssigem freien Farbstoff abgetrennt. Die Fluoreszenzmessungen wurden bei 23 °C und einer Anregungswellenlänge von 490 nm durchgeführt. Zur Absenkung des pH-Wertes wurde 1 M HCl zugegeben.

Untersuchungen zur Membranpermeabilität von Pluronic®-Vesikeln, welche ebenfalls eine hohe Durchlässigkeit für kleine Ionen, Zucker und Wasser zeigten, wurden von Rodriguez-Garcia et al. in der Literatur beschrieben.¹¹⁷ Demnach ist es nicht überraschend, dass auch Protonen ungehindert durch die Membran diffundieren können und ebenfalls, dass die Eisenoxid-Partikel zumindest in der Konzentration (16 % (w/w)) keine ausreichende Barriere darstellen.

Mit den Phloxin-beladenen Vesikeln wurde ergänzend auch eine Freisetzungsstudie durchgeführt (Abb. 4.36). Da jedoch Phloxin B die Eigenschaft besitzt, an die Dialysemembran zu binden, konnten diese Ergebnisse leider nur qualitativ, relativ zueinander ausgewertet werden. Dennoch ist deutlich sichtbar, dass die Farbstoff-Freisetzung bei 37 °C aus den Magnetvesikeln im Vergleich zu den reinen L121-Vesikeln verzögert ist. Außerdem wurden die Proben nach ca. 1 Woche (gekennzeichnet durch den blauen Hintergrund) in den Kühlschrank (8 °C) gestellt, wobei eine beschleunigte Freisetzung aus den L121-Vesikeln und gleichbleibend geringe Freisetzung aus den Eisenoxid-Vesikeln beobachtet wurde. Diese Beobachtungen stimmen sehr gut mit den Messungen zur kritischen Aggregationstemperatur überein und bestätigen die Stabilität Eisenoxid-beladener Vesikel bei niedrigen Temperaturen.

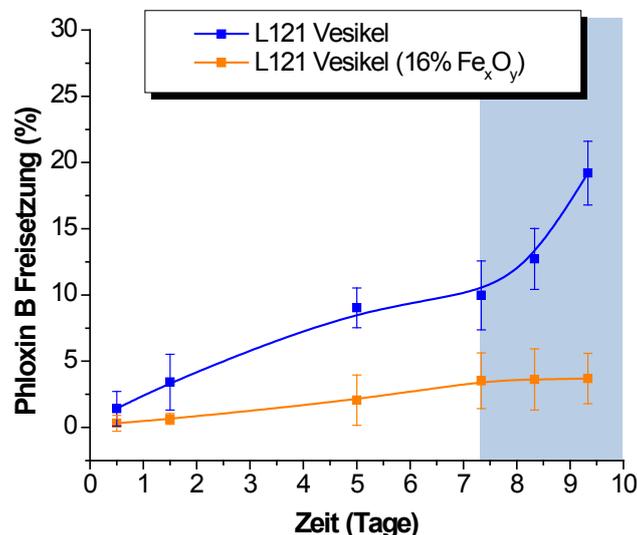


Abb. 4.36: Modell-Freisetzungsversuch mit Phloxin B aus L121-Vesikeln und L121(16% Fe_xO_y)-Vesikeln. Die prozentuelle Freisetzung bezieht sich auf die zu Versuchsbeginn in den Vesikeln befindliche Farbstoffmenge. Die beladenen Vesikel wurden in eine Dialysemembran gegeben und in ein mit Wasser gefülltes temperiertes Behältnis gegeben. Die Konzentration des freigesetzten Farbstoffes wurde außerhalb der Dialysemembran zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Die erste Phase des Freisetzungsversuchs wurde bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Temperatur auf 8 °C herabgesetzt (gekennzeichnet mit blauem Hintergrund). Die Verbindungslinien zwischen den Messpunkten dienen der optischen Orientierung und stellen keine Fit-Funktionen dar.

4.2.4 Pluronic®-Polymersome als theranostisches Wirkstoffträgersystem

Pluronic® L121 ist ein kommerziell erhältliches Polymer und bereits für einige kosmetische Anwendungen von der FDA zugelassen.¹²² Verwandte Pluronic®-Polymere werden auch als pharmazeutischer Zusatzstoff bereits eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.3.4). Auf Grund dieses guten Sicherheitsprofils eignen sich Pluronic®-Polymere als Grundmaterial für ein Wirkstoffträgersystem. In Kombination mit der Beladung mit magnetischen Nanopartikeln und der Möglichkeit einer reproduzierbaren, kontinuierlichen Herstellungs- und Beladungsmethode im Mikromischer bietet es ein vielversprechendes System für potenzielle Anwendungen in der Klinik. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vesikel aus Pluronic® L121 sowohl mit dem Krebswirkstoff Camptothecin als auch mit magnetischen Nanopartikeln *in situ* beladen. Diese Hybridvesikel wurden *in vitro* auf ihr Freisetzungverhalten untersucht und die Wirksamkeit im Zellversuch getestet. Des Weiteren wurden verschiedene Methoden zur magnetischen Charakterisierung durchgeführt, um die magnetischen Hybrid-Polymersome auf potenzielle Anwendungen im Bereich der Theranostik zu prüfen. Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Entwicklung eines Pluronic®-L121-basierenden multifunktionalen Nanotransporters im Detail dargestellt.

4.2.4.1 Agglomerationsverhalten in Anwesenheit von Serumproteinen

Die hergestellten Pluronic®-Polymersome wie auch die magnetischen Polymersome wurden zunächst auf ihr Agglomerationsverhalten in Anwesenheit von Serumproteinen geprüft. Pluronic®-L121-Vesikel zeigten keine Agglomeration in DMEM mit 10 % FCS, unabhängig der Endgruppe und der Beladung. In (Abb. 4.37) ist exemplarisch das Ergebnis der DLS-Analyse für L121-Vesikel mit 16 % Eisenoxid dargestellt. Die Autokorrelationsfunktion lässt sich gut durch eine kombinierte Fit-Funktion nach der Methode von Rausch et al. beschreiben. Es ist keine signifikante Abweichung des Residuums von null zu erkennen. Es wurden demnach also keine Agglomerate detektiert.

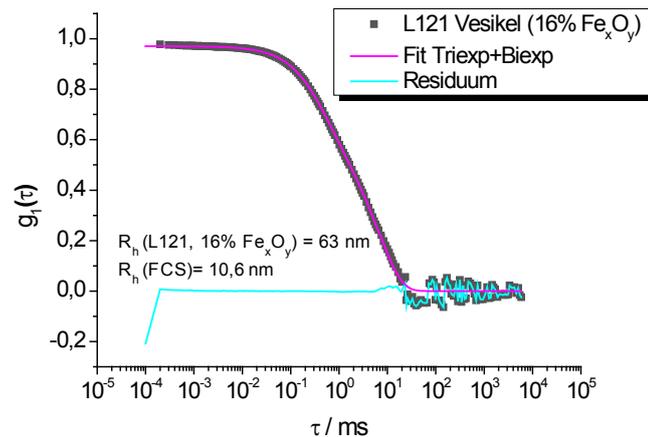


Abb. 4.37: DLS-Analyse des Agglomerationsverhaltens von L121-Vesikeln (16 % Fe_xO_y) in Wechselwirkung mit Serumproteinen. DLS-Messung bei Streuwinkel 30° zeigt keine Agglomeratbildung (Methode nach Rausch et al. 2010)¹⁹⁰. Die Daten der Autokorrelationsfunktion der Mischung aus Vesikeln und Serum-Proteinen lassen sich gut durch den Fit mit einer zusammengesetzten Exponentialfunktion mit fixierten Parametern der zuvor gemessenen Einzelkomponenten nur durch Anpassung der Intensitätsanteile beschreiben. Es resultiert keine signifikante Abweichung des Residuums von 0.

4.2.4.2 Beladung der Polymersome mit dem Wirkstoff Camptothecin

Camptothecin ist ein Krebsmedikament, das natürlicherweise in der Rinde des *Camptotheca acuminata*, auch „happy tree“ genannt, vorkommt.¹³⁵ Die zytotoxische Aktivität dieses Wirkstoffes beruht auf der Interaktion mit dem Enzym Topoisomerase I.¹³⁶ Camptothecin ist sehr toxisch und nur in seiner Lactonform vollständig wirksam. In wässriger Umgebung kann es schnell in die weniger aktive Carboxylform hydrolysiert werden (vgl. Abschnitt 2.3.5).¹³⁸ Die hohe Toxizität wie auch die Instabilität in wässriger Umgebung machen für Camptothecin ein Wirkstoffträgersystem besonders wünschenswert.

Aus diesem Grund wurden Camptothecin-Polymersome hergestellt, zum einen nur mit dem Wirkstoff beladen und zum anderen dual beladen mit Camptothecin und magnetischen Nanopartikeln (8 % Fe_xO_y). Eine Zusammenfassung der Charakterisierung dieser Camptothecin-Vesikel ist in Tab. 4.8 gegeben.

Tab. 4.8: Charakteristika Camptothecin-beladener L121-Vesikel mit und ohne Eisenoxid-Cargo

Probenname	R_h [nm]	μ_2^a (90°)	ζ -Potenzial [mV]	Eisenoxid ^b [%(w/w)]	Camptothecin ^c [%(w/w)]
Camptothecin-Polymersome	63	0,12	-17±2	—	2,4
Magnetische Camptothecin-Polymersome	61	0,06	-18±3	7,1	2,6

^a Mittlerer hydrodynamischer Radius der Polymersome wurde aus winkelabhängiger, dynamischer Lichtstreuung ermittelt. Der zweite Kumulant μ_2 kann als Maß der Polydispersität angesehen werden (nach der Kumulanten-Methode^{209, 264} entspricht $\mu_2=0,05$ bei 90° Streuwinkel einer Polydispersität im Radius von ca. 25%).

^b Angegebener Eisenoxid-Gehalt bezieht sich auf die Polymerkonzentration und wurde mittels Thermogravimetrischer Analyse ermittelt.

^c Camptothecin-Gehalt bezieht sich ebenfalls auf die Polymerkonzentration und wurde mit Hilfe einer HPLC-basierten Methode ermittelt.²⁷⁰

Die Verkapselungseffizienz des Camptothecins war nahe 100 % (96 % für einfach beladene Polymersome und 100 % für dual beladene Polymersome, quantifiziert mittels HPLC nach Warner und Burke²⁷⁰). Die maximale Beladung war jedoch durch die Löslichkeit von Camptothecin in THF limitiert. Daraus resultierend ergab sich eine Beladung von 2,4 % bzw. 2,6 % für einfach und dual beladene Polymersome (Daten im Anhang, Tab. 9.2). Dies entspricht in etwa 70 μmol Camptothecin pro Gramm Polymer und ist damit ca. 70-fach höher als in anderen Formulierungen wie z.B. Pluronic®-F-127-Mizellen.^{118, 271}

Zunächst wurde eine *In-Vitro*-Freisetzungsstudie durchgeführt (Abb. 4.38). Dabei zeigte sich eine langsame, kontinuierliche Wirkstofffreisetzung aus beiden Polymersom-Formulierungen. Jedoch war auch hier die Freisetzung aus den magnetischen Polymersomen verzögert. Dies könnte zum einen auf die erhöhte Stabilität der Eisenoxid-Hybrid-Vesikel zurückzuführen sein oder auch auf eine Interaktion der Wirkstoffmoleküle mit den Eisenoxid-Nanopartikeln in der Vesikelmembran hindeuten.

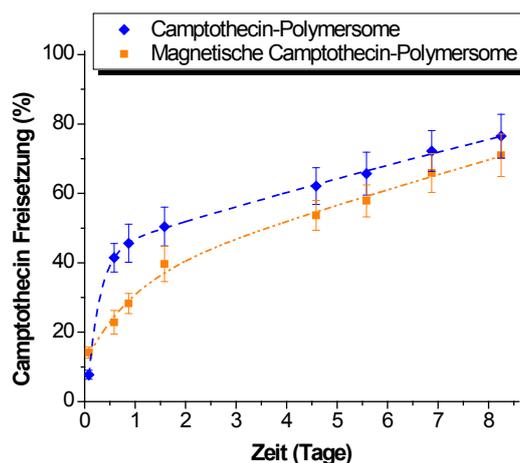


Abb. 4.38: *In-Vitro*-Wirkstoff-Freisetzungsstudie von Camptothecin-beladenen und dual-beladenen Polymersomen in PBS bei 37 °C.²⁷²

Die Wirkung der Camptothecin-beladenen Polymersome auf Krebszellen wurde in einer Zellviabilitätsstudie mit Prostata-Krebszellen (PC-3 Zelllinie) evaluiert (Abb. 4.39). Die Zellen wurden jeweils für 72 h mit dem Wirkstoff bzw. den Wirkstoffformulierungen inkubiert. Die zytotoxische Wirkung der Camptothecin-Polymersome war vergleichbar mit dem freien Wirkstoff. Allerdings ist die Dosis der Camptothecin-Verabreichung durch die geringe Wasserlöslichkeit (1,3 µg/mL) stark limitiert.²⁷¹ Durch die Verkapselung des Camptothecins in die hydrophobe Schicht der Polymersom-Membran konnte die Löslichkeit des Wirkstoffes in wässriger Umgebung erhöht werden. Die höhere Dosis ermöglichte so eine weitere Reduktion der überlebenden Krebszellen. Die Zellviabilität der PC-3 Zellen konnte auf diese Weise mit Hilfe beladener Polymersome auf 20 % verringert werden, während bei der höchsten Dosis Camptothecin noch ca. 40 % der Zellen überlebten.

Die zuvor erwähnte *In-Vitro*-Freisetzungsstudie zeigte für die dual-beladenen Polymersome bis zum Tag 3 eine Wirkstofffreisetzung von ca. 50 % (Abb. 4.38). Auf Grund der Depot-Wirkung der Polymersome könnte die zytotoxische Wirkung der beladenen Polymersome gegenüber dem freien Wirkstoff über eine längere Inkubationsperiode noch verstärkt sein. Da Inkubationen länger als 72 h ohne einen Wechsel des Mediums jedoch schwer zu realisieren sind, konnte die Langzeitwirkung der Camptothecin-Polymersome im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht werden.

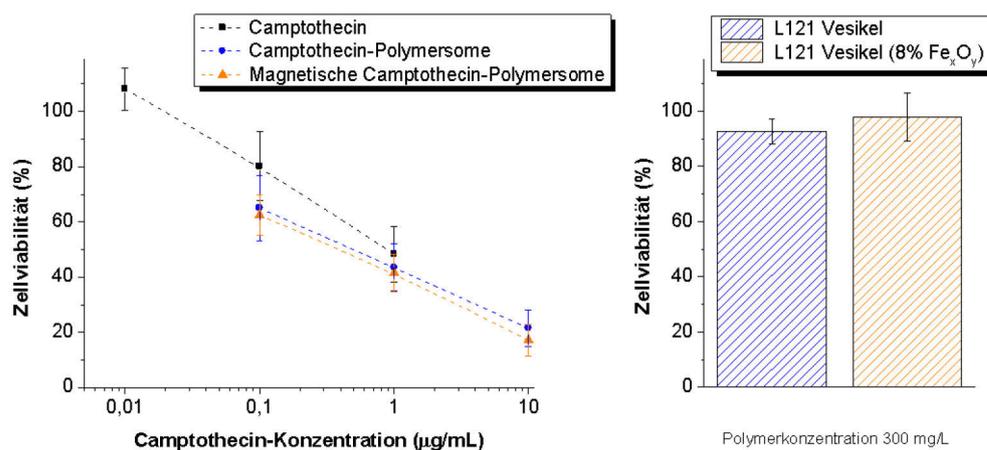


Abb. 4.39: Zytoxizität von wirkstoffbeladenen Polymersomen im Vergleich zum freien Wirkstoff Camptothecin.²⁶⁶ Prostata-Krebszellen (PC-3) wurden 72 h bei 37 °C in DMEM + 10 % FCS inkubiert. Wirkstofffreie Polymersome (L121 Vesikel) und magnetische Polymersome (L121 Vesikel (8% Fe_xO_y)) zeigten keine Zytotoxizität bei der höchsten angewendeten Polymersom-Konzentration von 300 mg/L (rechts).

4.2.4.3 Wirkstoffadressierung – aktives Targeting mit Bombesin

Der gezielte Transport an den Wirkort ist eine der wichtigsten Aufgaben eines Wirkstoffträgersystems. Um neben dem passiven Targeting über den EPR-Effekt auch aktives Targeting über eine spezifische Bindungsstelle wie einen Rezeptor zu bewerkstelligen, muss ein Ligand auf die Polymersom-Oberfläche gebunden werden. Dazu benötigt man zunächst funktionelle Gruppen, die eine Biokonjugation ermöglichen. Aus diesem Grunde wurde, wie bereits erwähnt, im Vorfeld der Polymersom-Herstellung das Pluronic® L121 mittels Bernsteinsäureanhydrid carboxyliert.

Als Targeting-Ligand wurde Bombesin ausgewählt, ein 14 Aminosäuren langes Peptid mit hoher Homologie zu dem humanen GRP (*Gastrin Releasing Peptide*). Der *Gastrin Releasing Peptide Receptor* GRPR ist in einigen Tumorarten, insbesondere bei Eierstock-, Prostata- und Brustkrebszellen, überexprimiert und stellt daher ein geeignetes Target dar.^{142, 143, 273}

Bombesin hat auf Grund der großen Ähnlichkeit zu dem GRP ebenfalls hohe Affinität zum GRP Rezeptor und eignet sich daher gut als Ligand, um eine spezifische Bindung der Polymersome an Krebszellen zu erzielen.

Um die Konjugation des Bombesins an die Carboxylgruppen zu erleichtern, wurde [Lys³]-Bombesin, ein Analog, bei dem die 3. Aminosäure Arginin gegen Lysin

ausgetauscht wurde, verwendet. Damit stand eine freie Aminogruppe zur Verfügung und die Konjugation mit der Carboxyl-Oberfläche des Polymersomes konnte mittels gängiger Carbodiimid-Chemie durchgeführt werden (Abb. 4.40)

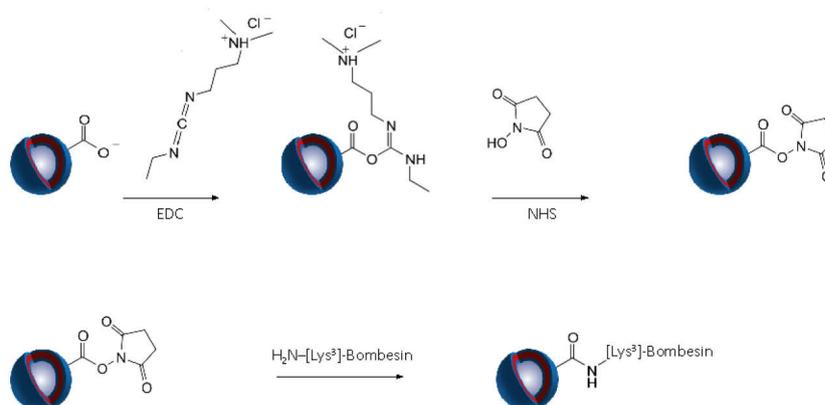


Abb. 4.40: Reaktionsschema zur Funktionalisierung von L121-COOH-Vesikeln mit [Lys³]-Bombesin

Diese Reaktion wurde erfolgreich durchgeführt und eine Kupplungseffizienz von > 80 % erreicht. Die Menge an konjugiertem Peptid wurde durch eine HPLC-basierte Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse auf 49 nmol [Lys³]-Bombesin pro mg Polymer bestimmt (Daten im Anhang, Tab. 9.3). Als Kontrollprobe wurde die gleiche Reaktion ohne Kopplungsagenzien durchgeführt und nach Aufreinigung mittels Dialyse analog der gekuppelten Probe analysiert. Auf diese Weise konnte die kovalente Verknüpfung zwischen Peptid und Polymersom nachgewiesen werden.

Zusätzlich zum Bombesin wurde auch eine Fluoreszenzmarkierung mit Alexa Fluor® 647 durchgeführt, um *in vitro* die Polymersome im Zellversuch verfolgen zu können (Fluoreszenzspektren im Anhang, Abb. 9.5). Die Immobilisierung des Fluoreszenzfarbstoffs wurde ebenfalls über die Aktivester-Chemie analog durchgeführt.

Die spezifische Bindung der Bombesin-funktionalisierten Polymersome wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS), Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CSLM) und einem Fluoreszenz-basierten Aufnahmetest untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.41 zusammengestellt. Die Untersuchungen wurden mit fluoreszenzmarkierten Polymersomen mit 8 % Eisenoxid-Beladung, die jeweils mit oder ohne Bombesin-Funktionalisierung ausgestattet waren, an PC-3-Zellen durchgeführt. Nach zwei Stunden Inkubation wurde die Zellaufnahme mit den unterschiedlichen Methoden ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigten, dass es einen gewissen Anteil an unspezifischer Polymersom-Aufnahme in die PC-3-Zellen gab. Dennoch wurden die Bombesin-funktionalisierten

Polymersome in deutlich höherem Maße aufgenommen. Die FACS-Analyse zeigt eine deutliche Verschiebung des Histogramms in Richtung höherer Fluoreszenzintensitäten für Zellen, die mit Bombesin-funktionalisierten Polymersomen inkubiert wurden im Vergleich zu den Zellen, welche mit nicht-funktionalisierten Polymersomen behandelt wurden. Die quantitative Auswertung ergab eine Verdopplung der Polymersome-Aufnahme funktionalisierter Vesikel im Vergleich zu den Blank-Vesikeln.

Es sei in diesem Zusammenhang nochmals erwähnt, dass die Fluoreszenzintensitäten der zur Inkubation verwendeten Polymersome-Dispersionen vergleichbar hoch waren (mit < 10 % Abweichung).

Die Spezifität der Zellbindung wurde durch ein Konkurrenzexperiment mit einem Überschuss an freiem Bombesin nachgewiesen. Die Bindung von den Bombesin-funktionalisierten Polymersomen ging auf das Level der unspezifischen Polymersome zurück, wohingegen die Bindung der nicht-funktionalisierten Polymersome durch die Präsenz von einem großen Überschuss an Bombesin nahezu nicht beeinflusst wurde. Mit Hilfe der konfokalen LSM konnten die Polymersome innerhalb der Zellen lokalisiert werden. Diese sind demnach tatsächlich in das Cytosol aufgenommen und nicht nur an die Zellmembran gebunden. Dieser Fakt konnte zusätzlich durch den Fluoreszenzaufnahme-Test bestätigt werden (Abb. 4.41, Insert rechts oben). Dabei wurden die Zellen mit einer Glycin-HCl-Lösung pH 2,2 behandelt, wodurch alle oberflächengebundenen Polymersome entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die verbleibende Fluoreszenz gemessen. Auf diese Weise konnte zwischen gebundenen und aufgenommen Polymersomen unterschieden werden. Auch hierbei wurde eine etwa doppelt so große Menge an aufgenommen funktionalisierten Polymersomen im Vergleich zu Blank-Polymersomen detektiert.

Die Tatsache, dass die Zellinternalisierung der funktionalisierten Polymersome mit einem Überschuss an freiem Bombesin gehemmt wird, ist neben dem Nachweis einer rezeptorspezifischen Zellaufnahme auch ein Indiz dafür, dass die Polymersome als Einheit intakt bleiben. Die FACS-Analyse nutzt den Fluoreszenzmarker zur Detektion, die funktionelle Bindestelle stellt jedoch das [Lys³]-Bombesin dar, deshalb scheinen nach den Versuchsergebnissen der Fluoreszenzmarker und das Bombesin eine Einheit, also ein stabiles Polymersom zu bilden.

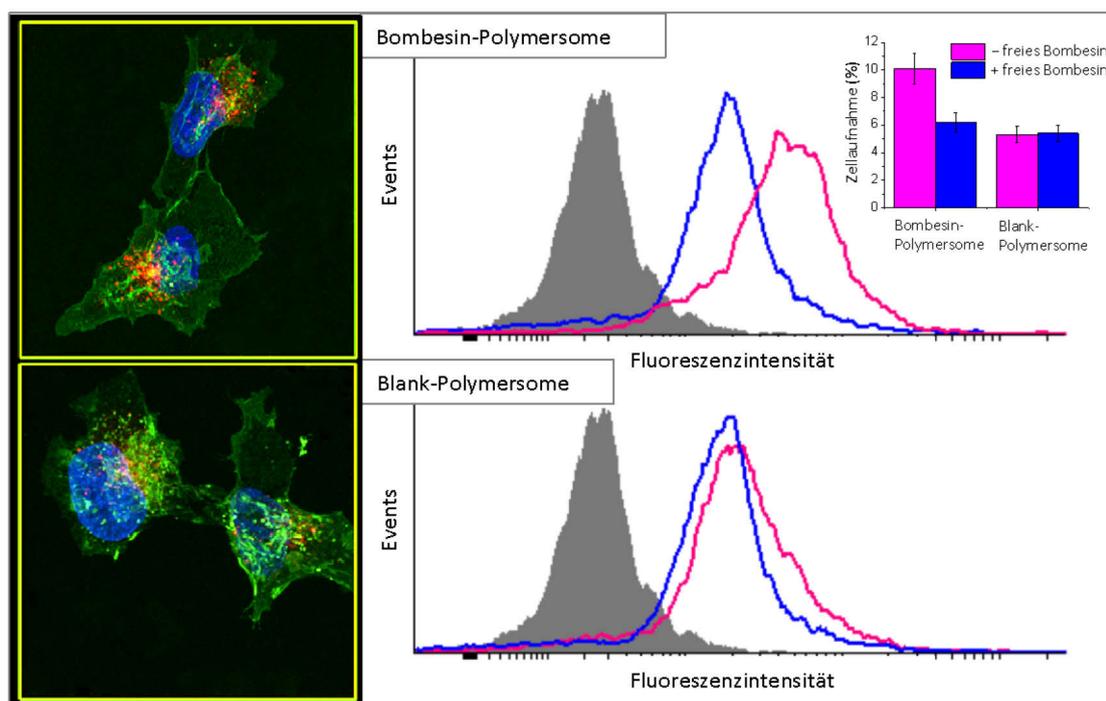


Abb. 4.41: Zellaufnahme von Fluoreszenzmarkierten magnetischen Polymersomen in humane Prostata-Krebszellen.²⁶⁶ PC-3-Zellen wurden 2 h bei 37 °C mit den magnetischen Polymersomen inkubiert. **Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie:** Der Zellkern ist mit DAPI (blau) und die Zellmembran mit einem Weizenkeim-Agglutinin-Fluorescein-Konjugat (grün) gefärbt. Die Alexa Fluor®-647-Polymersome sind in dem Mikrograph rot dargestellt. **Durchflusszytometrie:** Histogramm von Alexa Fluor®-647-Fluoreszenzintensität von PC-3-Zellen: unbehandelte Kontrollzellen (grau), Zellen inkubiert mit Alexa Fluor®-647-Polymersomen mit [Lys³]-Bombesin (Bombesin-Polymersome, oben) und ohne (Blank-Polymersome, unten) jeweils in pink dargestellt. Die Histogramme des Konkurrenzexperimentes mit einer Vorinkubation mit einem Überschuss an freiem Bombesin sind in blau gezeigt. **Zellaufnahme-Studie:** Die Zellaufnahme wurde nach folgender Formel berechnet: % Zellaufnahme = Fluoreszenzintensität des Zelllysats / Gesamtintensität der Polymersome, welche zur Inkubation eingesetzt wurden. Copyright © 2013, Royal Society of Chemistry. Wiedergabe mit Genehmigung.

Bombesin und seine Analoge wurden bereits als vielversprechende Targeting-Peptide für die Krebsdiagnose und selektive Radiotherapie getestet.^{144, 145, 274} Für das [Lys³]-Bombesin gekuppelt an den Chelator DOTA wurde mit einer Inhibitionskonzentration IC₅₀ von 2.2 ± 0,5 nM eine gute Bindung an die Prostata-Krebs-Zelllinie PC-3 in der Literatur berichtet.¹⁴⁶ Außerdem wurde ⁶⁴Cu-DOTA-[Lys³]-Bombesin bereits als Peptid zur *In-Vivo*-Detektion für humane GRPR-positive Prostata-Tumoren in PET-Imaging-Studien mit Mäusen erfolgreich eingesetzt.²⁷⁵

Im nächsten Abschnitt sind die Ergebnisse vorgestellt, welche zur Beurteilung der kontinuierlich hergestellten magnetischen Polymersome für die medizinische Bildgebung durchgeführt wurden.

4.2.5 Magnetische Charakterisierung Eisenoxid-beladener Polymersome

4.2.5.1 Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie

Die magnetischen Polymersome wurden zur Anwendbarkeit als MR-Kontrastmittel geprüft. Dazu wurde die transversale Relaxivität der magnetischen Polymersome jeweils mit und ohne Wirkstoffbeladung in einem magnetischen Feld von 1,4 Tesla gemessen. Magnetische Polymersome mit 7,1 % Eisenoxid wiesen eine sehr hohe transversale Relaxivität von $682 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ auf (Abb. 4.42). Die dual beladenen Polymersome zeigten eine etwas geringere, jedoch immer noch signifikante transversale Relaxivität von $394 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

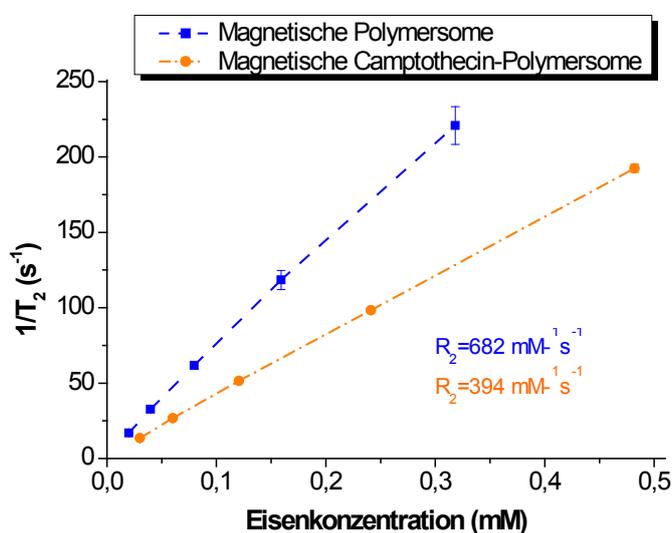


Abb. 4.42: T_2 -Relaxationsraten ($1/T_2, \text{s}^{-1}$) als Funktion des Eisengehaltes (mM) für magnetische Polymersome (8% Fe_xO_y) mit und ohne Camptothecin-Beladung.

Die Abnahme der Relaxivität der wirkstoffbeladenen Polymersome im Vergleich zu jenen, die nur Eisenoxid-Nanopartikeln enthielten, ist möglicherweise durch die unterschiedliche Verteilung der Eisenoxid-Nanopartikel über alle Vesikel zu erklären. Vorherige Experimente gaben Hinweise darauf, dass die Verteilung der Eisenoxid-Nanopartikel über alle Vesikel nicht homogen vorliegt, d.h. Vesikel mit einer hohen Beladungsdichte liegen neben Vesikeln mit wenig oder gar keiner Beladung vor. Dies scheint zumindest für Beladungen mit bis zu 16 % Eisenoxid der Fall zu sein. Möglicherweise hat die Anwesenheit des Wirkstoffes eine homogenere Verteilung der

Partikel über alle Vesikel zur Folge. Dadurch nimmt die Anzahl der Vesikel mit einer sehr hohen Beladungsdichte an Eisenoxid-Nanopartikeln in der Vesikelschale ab, was zu einer verringerten Relaxivität führt. Eine weitere Erklärung könnte die Einlagerung der Wirkstoffmoleküle zwischen den einzelnen Partikeln sein, welche die Wechselwirkung derer untereinander stört und daher die Relaxivität verringert.

Der in beiden Fällen gemessene hohe R_2 -Wert der Hybrid-Vesikel ist vermutlich vorwiegend über ein Clustering der Magnetpartikel zu erklären. Die magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel liegen in der Vesikelschale in räumlicher Nähe zueinander, was vermutlich zu einer Verstärkung der Magnet-Resonanz-Eigenschaften führt. Verglichen mit kommerziell erhältlichen Eisenoxid-Kontrastmitteln lagen die gemessenen R_2 -Werte der magnetischen L121-Polymersome mindestens um den Faktor zwei höher (Tab. 4.9).^{148, 276} Diese Relaxivitätsmessungen bestätigten die Eigenschaft der magnetischen Polymersome mit oder ohne Wirkstoff einen signifikanten Kontrast für ein T_2 -gewichtetes MR-Imaging zu generieren.

Tab. 4.9: Eigenschaften von kommerziellen R_2 -Kontrastmitteln^{148, 276}

Produktname	Hersteller	Stabilisierung	D_{Kern} [nm]	D_h [nm]	R_2 [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Feridex® Endorem®	Berlex (USA) Guerbet (EUR)	Dextran	4,9	160	120
Resovist®	Schering AG	Carboxydextran	4	60	186
Combidex® Sinerem®	Advanced Magnetics (USA) Guerbet (EUR)	Dextran	6,9	35	65

4.2.5.2 Tracer für Magnetic Particle Imaging

Magnetic Particle Imaging (MPI) ist ein relativ neues Bildgebungsverfahren, dem auf Grund der hohen Empfindlichkeit und sehr guten räumlichen und zeitlichen Auflösung großes Potenzial für den zukünftigen Einsatz in der Medizin nachgesagt wird. Dieses Verfahren, das 2005 erstmals von Gleich und Weizenecker vorgestellt wurde, basiert auf der nicht-linearen Magnetisierung von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (vgl. Abschnitt 2.4.5).¹⁸¹ Anders als bei der MRT werden hierbei die Eisenoxid-Nanopartikel direkt gemessen. Um die Leistungsfähigkeit von magnetischen Nanopartikeln für das MPI-Verfahren zu beurteilen, wurden Messungen an einem sogenannten Magnetic Particle Spectrometer (MPS) durchgeführt. Das Funktionsprinzip entspricht dem Magnetic Particle Imaging, jedoch wird auf komplizierte Gradientenfelder und damit auf die Ortskodierung verzichtet. Es wird ausschließlich das dynamische Magnetisierungsverhalten der Probe gemessen. Angeregt durch ein sinusförmiges Wechselfeld enthält das gemessene Signal, aufgrund des nicht-linearen Magnetisierungsverhaltens der Nanopartikel, höhere Harmonische der Anregungsfrequenz. Deren Anzahl ist ein wesentliches Qualitätsmerkmal für die Bildqualität beim MPI. In Abb. 4.43 ist das Signalspektrum resultierend aus einer MPS-Messung von magnetischen L121-Polymersomen im direkten Vergleich zu kommerziellen MR-Kontrastmitteln dargestellt.

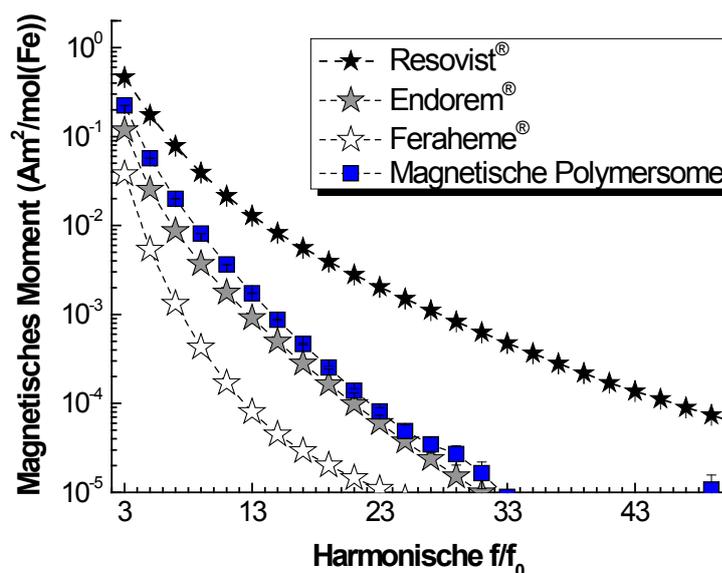


Abb. 4.43: Mittels MPS gemessenes Signalspektrum von magnetischen Polymersomen (16 % Fe_3O_4) im Vergleich zu kommerziellen MR-Kontrastmitteln.

Diese ersten MPS-Messungen bezüglich des Leistungsvermögens der magnetischen Polymersome für das MPI-Verfahren zeigten vielversprechende Ergebnisse. Magnetische Polymersome wiesen im Allgemeinen höhere absolute Signalamplituden (normalisiert auf den Eisengehalt) auf verglichen mit den kommerziell erhältlichen Partikelsystemen Endorem® und Feraheme®. Resovist® ist derzeit der am besten geeignete MPI-Tracer, der für klinische Anwendungen eine Zulassung erhalten hat (befindet sich gegenwärtig jedoch nicht mehr auf dem Markt). Selbst im Vergleich mit diesem System erreichten die magnetischen Polymersome ca. 50 % der Signalamplitude der 3. Harmonischen.

Eberbeck et al. beschrieben in der Literatur Ergebnisse zur Abhängigkeit des MPI-Signals von der Größe und Größenverteilung von Eisenoxid-Partikeln.¹⁸⁶ Theoretischen Berechnungen zufolge müssten optimierte Eisenoxid-basierte MPI-Partikel aus Eindomänenpartikeln Kerngrößen von 30 – 60 nm haben,¹⁸⁷ was bisher mit den gängigen Verfahren zur Eisenoxid-Synthese schwer zu realisieren ist. Die gute Leistungsfähigkeit von Resovist® wurde jedoch durch das Vorhandensein von Magnetpartikel-Clustern erklärt, die ein MPI-Signal erzeugen, welches dem von 20 nm Eindomänenpartikeln entspricht.¹⁸⁶

Die eingebauten magnetischen Nanopartikel in der Hülle der Polymersome waren ca. 3 bis 10 nm in der Kerngröße und somit nicht optimiert für das MPI-Verfahren. Die Mikromischer-Technologie ermöglichte die Herstellung von Polymersomen mit bis zu 50 % Eisenoxid, wobei höhere Beladungsdichten bisher nicht getestet wurden. Eine Optimierung der MPI-Empfindlichkeit der magnetischen Polymersome könnte auf Basis der Untersuchungen von Eberbeck et al. möglicherweise durch dichtere Magnet-Partikel-Cluster nach dem Vorbild von Resovist® erreicht werden, was wiederum durch eine Erhöhung der Eisenoxid-Beladung möglich sein könnte.

Magnetische Polymersome bieten also für die Anwendung als MRT-Kontrastmittel wie auch als Tracer für das MPI-Verfahren gute Voraussetzungen. Die gleichzeitige Verwendung magnetischer Polymersome als Wirkstoffträgersystem eröffnet somit neue Möglichkeiten, einen multifunktionalen, theranostischen Wirkstofftransporter zu entwickeln.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit entstand aus der Motivation, zu einer effizienten und sicheren Behandlung gefährlicher Krankheiten wie Krebs beizutragen, deren konventionelle Therapien oft mit schweren Nebenwirkungen einhergehen. Gegenwärtig werden beispielsweise Polymer-Konjugate und liposomale Arzneimittel bereits als Therapeutika in der Medizin eingesetzt. Weitere Wirkstoffträgersysteme wie polymere Mizellen sind zum Teil ebenfalls zugelassen oder stehen kurz vor der Marktreife. Dennoch sind die Ansprüche an ein Wirkstoffträgersystem sehr hoch. Mit dem Ziel, die therapeutische Wirkung zu maximieren und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkung zu vermeiden, werden derzeit verschiedenste Ideen zu nanopartikulären Transportsystemen weiterentwickelt und auf ihr Potenzial für die klinische Anwendung geprüft. Das gemeinsame Ziel ist dabei, ein sicheres, multifunktionales, theranostisches Wirkstoffträgersystem zu schaffen, das den therapeutischen Cargo an seinen Wirkort bringt, dort freisetzt und möglichst gleichzeitig in Echtzeit verfolgt werden kann, um die Therapie individuell einzustellen.

Die Entwicklung eines solchen vielseitigen Wirkstoffträgersystems setzt gewisse Grundlagen voraus. Dazu zählt das Verständnis über mögliche erwünschte oder auch unerwünschte Wechselwirkungen dieser Nanosysteme mit der biologischen Umgebung, also dem menschlichen Körper.

Vor diesem Hintergrund wurden polymere Nanostrukturen aus Polybutadien-*block*-Polyethylenoxid mit unterschiedlicher Morphologie hergestellt, charakterisiert und auf ihre Wechselwirkung mit menschlichen Zellen untersucht. Um materialspezifische Einflüsse auszuschließen, wurden die unterschiedlichen Nanostrukturen durch eine kontrollierte Selbstorganisation aus identischen amphiphilen Blockcopolymeren erzeugt. Zur Kontrolle über die Selbstorganisation wurde u.a. ein Mikromischer-basiertes System verwendet, das durch die Variation der Mischparameter Einfluss auf die Strukturbildung ermöglicht. Bei sehr kurzen Mischzeiten, welche in der Größenordnung der Kinetik der Selbstorganisation der verwendeten Blockcopolymeren liegen, lassen sich z.T. auch „kinetisch gefängene“ Strukturen wie beispielsweise Kugelmizellen als Vorstufe zur Vesikelstruktur erhalten. Im Rahmen einer Zytotoxizitätsstudie wurde eine Morphologieabhängigkeit der Nanopartikel-Zell-Interaktionen festgestellt. So riefen vesikuläre Strukturen im Allgemeinen kaum zytotoxische Effekte hervor, während

kleinere kugelmizellare Strukturen eine auf die Massekonzentration bezogene erhöhte Toxizität aufwiesen. Die Behandlung der Testzellen mit zylindrischen Polymerstrukturen zeigte starke zytotoxische Effekte. Die genauen Mechanismen der Toxizität konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend untersucht werden, dennoch scheint klar erkennbar, dass die Morphologie der Nanostrukturen durchaus eine entscheidende Rolle bei der biologischen Antwort im Körper spielt.

Wird ein Nanotransporter zur systemischen Behandlung intravenös verabreicht, wird er unmittelbar mit den Komponenten des Bluts in Kontakt kommen. Der menschliche Körper besitzt Mechanismen, um Fremdstoffe schnell zu markieren und aus dem Körper zu eliminieren. Bei diesen Prozessen spielen die Serumproteine eine entscheidende Rolle. Die Art und Anzahl der adsorbierten Proteine hat im Allgemeinen einen wichtigen Einfluss auf den Verbleib des Nanotransporters im Körper. Daher wurden auch zu diesem Thema grundlegende Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe einer speziellen Methode, welche auf der dynamischen Lichtstreuung beruht, ist es möglich, auch komplexere Systeme wie Nanopartikel in einem natürlichen Medium wie beispielsweise Blutserum zu untersuchen. Diese Multikomponentenanalyse ermöglicht die Detektion von Agglomeraten mehrerer Partikel. Insbesondere für in den Blutstrom injizierte Partikel ist es sehr wichtig, das Agglomerationsverhalten im Vorfeld zu untersuchen. Andernfalls könnte es zur Bildung größerer Agglomerate kommen, welche kleinere Blutgefäße, wie beispielsweise Lungenkapillaren, verstopfen könnten und so zu schweren bis tödlichen Nebenwirkungen führen könnten. Für keines der in dieser Arbeit untersuchten Polymer-Systeme wurde die Bildung solcher großen Agglomerate beobachtet. Dennoch wurden Hinweise auf die Ausbildung einer Proteinkorona auf der Oberfläche polymerer Vesikel gefunden. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen Proteinadsorption und der Kettenlänge des hydrophilen Blocks beobachtet. Demnach ist für die Wechselwirkung zwischen Polymerstrukturen also nicht ausschließlich die Morphologie der Nanostrukturen, sondern erwartungsgemäß auch die Oberfläche verantwortlich. Die Endgruppen, also die Oberflächenladung, zeigten nur untergeordneten Einfluss.

Im Hinblick auf ein multifunktionales, theranostisches Wirkstoffträgersystem wurde zudem die Möglichkeit der Verkapselung von Eisenoxid-Nanopartikeln untersucht. Letztere werden bereits seit über 20 Jahren als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie in der Medizin angewendet. Durch die Kombination aus polymeren Nanotransportern mit magnetischen Nanopartikeln soll das

Anwendungsspektrum erweitert bzw. die Grundlage für die Entwicklung eines theranostischen Systems geschaffen werden.

Neben grundlegenden Untersuchungen zur Beladungsmöglichkeit von polymeren Vesikeln wurden auch weitergehende Experimente zur Entwicklung eines „realen“ Wirkstoffträgersystems aus einem kommerziell erhältlichen Polymer durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde Pluronic® L121 gewählt, welches bereits für einige Anwendungen eine Zulassung durch die FDA (*Food and Drug Administration*) erfahren hat und nachweislich auf Grund des geringen Molekulargewichts aus dem Körper ausgeschieden werden kann.

Mit Hilfe der zuvor erwähnten Mikromischer-Technologie war es möglich, uniforme Polymervesikel herzustellen. Diese konnten *in situ*, also während der Polymer-Selbstorganisation, mit verschiedenen Komponenten beladen werden. Es wurde unter anderem das Zytostatikum Camptothecin in die vesikuläre Struktur eingebaut. Eine *In-Vitro*-Freisetzungsstudie zeigte eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung aus den Polymervesikeln über mehrere Tage. Eine *In-Vitro*-Zytotoxizitätsstudie mit Prostatakrebszellen PC-3 demonstrierte zudem, dass durch die Polymersom-Formulierung die zytotoxische Wirkung des schwer wasserlöslichen, hydrolyseempfindlichen Wirkstoffs auf Krebszellen im Vergleich zum freien Wirkstoff deutlich gesteigert werden konnte.

Gleichzeitig konnten im Mikromischer-Verfahren auch Eisenoxid-Nanopartikel in hoher Konzentration in die Vesikel eingebaut werden. Dies führte zum einen zu einer Stabilisierung der vesikulären Struktur und zum anderen zu einer Erweiterung des Anwendungsspektrums der Polymervesikel. Messungen zur magnetischen Charakterisierung bestätigten das Potenzial, magnetische Polymersome als MRT-Kontrastmittel einsetzen zu können. Des Weiteren wurden die Hybrid-Polymersome als mögliche Tracer für ein neu entwickeltes medizinisches Bildgebungsverfahren, das MPI (*Magnetic Particle Imaging*), vielversprechend getestet. Dieses Verfahren bietet eine hohe Empfindlichkeit und eine gute räumliche Auflösung. Da anders als beim MRT die magnetischen Nanopartikel beim MPI direkt gemessen werden, könnten magnetische Polymersome so im Körper in Echtzeit verfolgt werden. Zudem würde der Körper dabei im Gegensatz zu radiologischen Untersuchungen keiner schädlichen Strahlung ausgesetzt.

Mit dem Ziel, in der späteren Therapie-Anwendung die Effizienz zu steigern und Nebenwirkungen möglichst zu reduzieren, wurde zusätzlich eine Oberflächen-funktionalisierung der Hybridvesikel vorgenommen. Damit sollte neben dem passiven Targeting, welches auf dem EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*) beruht, zusätzlich eine aktive Targetingstrategie verfolgt werden.

Dazu wurde ein krebszellspezifisches Targeting-Peptid (Bombesin) an die Polymersom-Oberfläche gekuppelt. Eine zusätzliche Fluoreszenzmarkierung ermöglichte den Nachweis einer rezeptorspezifischen Zellaufnahme in Prostatakrebszellen PC-3 mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Mit Hilfe des Targeting-Liganden konnte die Zellaufnahme funktionalisierter Polymersome im Vergleich zu unfunktionalisierten Polymersomen um den Faktor 2 gesteigert werden. Durch ein Konkurrenzexperiment mit einem Überschuss an freiem Ligand konnte zudem die Rezeptorspezifität der Zellaufnahme nachgewiesen werden.

Die Spezifität eines Nanotransporters, welcher sowohl vom EPR-Effekt profitiert als auch über einen spezifischen Targeting-Liganden verfügt, ist sicherlich im Vergleich zu unfunktionalisierten Wirkstoffträgersystemen erhöht. Dennoch wäre es wünschenswert, den Transport an den Wirkort noch effizienter zu gestalten.

Ein einfacher Versuch mit einem Stabmagneten zeigte, dass sich magnetische Polymersome mit Hilfe eines äußeren Magnetfeldes aus der Dispersion separieren lassen. Die Möglichkeit die magnetischen Polymersome mit Hilfe eines externen Magnetfeldes zu bewegen, könnte auch für ein potenzielles magnetisches Targeting von Interesse sein. Bealle et al. demonstrierten diese Möglichkeit mit Eisenoxid-beladenen Liposomen bereits im Zellversuch, bei welchem durch ein Magnetfeld eine erhöhte Zellaufnahme der Liposomen induziert werden konnte.²⁶⁵

Eine zusätzliche Unterstützung (neben passivem und aktivem Targeting), den Nanotransporter mit einem externen Magnetfeld an seinen Wirkort zu geleiten, könnte eine spezifische Biodistribution fördern und somit dem Ziel, eine maximale Wirkung bei minimierten Nebenwirkungen zu erreichen, ein Stück näher kommen.

Um diese Anwendung genauer zu evaluieren, sollten an den magnetischen Polymersomen künftig Messungen zur magnetophoretischen Mobilität in Abhängigkeit des Eisenoxid-Gehaltes durchgeführt werden. Daneben wären auch Versuche zur Magnetfeld-induzierten Hitzeentwicklung interessant, welche zu Entwicklungen im Bereich der

Hyperthermie-Behandlung führen würden, wie sie bereits von *MagForce Nanotechnologies AG* bei der Therapie von Hirntumoren eingesetzt wird. Damit könnten magnetische Polymersome nicht nur der Diagnostik in der medizinischen Bildgebung dienen, sondern auch therapeutische Funktionen übernehmen.

Des Weiteren wäre eine Magnetfeld-induzierte Wirkstofffreisetzung denkbar. Hierzu wurden bereits sehr interessante Ergebnisse von Sanson et al. publiziert.¹⁵⁴ Die Forschergruppe konnte zeigen, dass mit Hilfe eines externen alternierenden Feldes eine gezielte Wirkstofffreisetzung aus Eisenoxid-beladenen Polymersomen erreicht werden kann.

Magnetische Polymersome bieten viele Grundvoraussetzungen für ein multifunktionales, theranostisches Wirkstoffträgersystem. Zudem ermöglicht die hier vorgestellte Mikromischer-Technologie als kontinuierliche, reproduzierbare Methode auch die Herstellung von beladenen Polymersomen im größeren Maßstab. Die Wahl eines biokompatiblen, FDA-zugelassenen Polymers wie Pluronic® L121 als Ausgangsmaterial der Polymersome wird zudem vermutlich die Schritte in Richtung einer klinischen Entwicklung erleichtern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur sehr grundlegende *In-Vitro*-Studien durchgeführt. Vor dem Eintritt in klinische Studien und damit auch in den Menschen wären noch umfassende *In-Vivo*-Studien notwendig. Jüngste Beispiele zeigen jedoch, dass Polymerbasierte Systeme in der Nanomedizin angekommen sind und vermutlich auch zukünftig eine steigende Präsenz in der Medizin haben werden (vgl. Abschnitt 1.2.5). Bisher gibt es keine theranostischen Wirkstoffträgersysteme auf dem Markt, vielleicht haben aber magnetische Polymersome, insbesondere auf Grund ihrer einfachen, schnellen und reproduzierbaren Herstellung und vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten eines Tages eine Chance, sich in der Klinik durchzusetzen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Polyethylenoxid-*block*-Polypropylenoxid-*block*-Polyethylenoxid (Pluronic® L121), (S)-(+)-Camptothecin, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), 2-(N-Morpholinoethansulfonsäure (MES), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC) Hydrochlorid, N-Hydroxysuccinimid (NHS), Ethylendiamin, Rinderserumalbumin (BSA), Fluoresceindiacetat, Rhodamin B und Bernsteinsäureanhydrid wurden von Sigma-Aldrich (Germany oder St. Louis, MO, USA) bezogen. Gibco® RPMI Medium 1640, fetales Rinderserum (FBS), Penicillin Streptomycin (Pen Strep), WGA-Fluorescein-Konjugat, ProLong® Gold Färbungsreagenz mit DAPI und Alexa Fluor® 647 NHS-Ester kamen von Invitrogen (Carlsbad CA, USA). Die humane Prostatakrebszelllinie PC-3 sowie die humane Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa wurde von American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) bezogen. DMEM-Medium und PBS-Pufferlösung für die Zellkultur wurden von PAA Laboratories GmbH erhalten. [Lys³]-Bombesin wurde von Kinexus Bioinformatics Corporation (Vancouver, Kanada) synthetisiert. Fluoraldehyde™ (OPA) Reagenzlösung, Dimethylsulfoxid (DMSO), Triethylamin, Tetrahydrofuran (THF) und Acetonitril (HPLC grade) wurden von Pierce Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA) bezogen. Das Ferrofluid wurde von Webcraft GmbH (Germany, www.supermagnete.de) erworben und vor der Verwendung gegen THF dialysiert (MWCO 1 kDa). Dialyse-Membranen (MWCO: 1 und 12 kDa) wurden von Spectrum® Laboratories Inc., Rancho Dominguez, USA, erhalten. Gelfiltrationssäulen DextraSEC PRO 10 sowie Phloxin B wurden bei Appllichem (Germany) erworben. Polycarbonat-Extrusionsmembranen mit 100 nm Porengröße wurden von Avestin Europe GmbH (Germany) bezogen. Spritzenfilter Millex®-LCR oder -PVDF mit jeweils 0,45 µm Porengröße waren von Millipore (Germany).

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für alle Experimente wurde vollentsalztes Wasser eingesetzt, welches zusätzlich über ein Arium® Ultrapure Water System (Sartorius Stedim Biotech) aufgereinigt wurde.

Das verwendete Polybutadien-*block*-Polyethylenoxid wurde von Michael Maskos und Oliver Rheingans synthetisiert, charakterisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Synthese wurde wie 2006 von Michael Maskos publiziert durchgeführt.⁷⁹ Die hydrophilen Eisenoxid-Nanopartikel wurden mittels Nanopräzipitation von Christoph Hönnscheidt hergestellt.²²¹

6.2 Herstellung und Beladung von polymeren Nanostrukturen

6.2.1 Kontinuierliche Herstellung im Mikromischer

Die Hauptkomponenten der verwendeten Mikromischer-Anlage bestanden aus zwei HPLC-Pumpen (Smartline, Knauer GmbH) und einem Edelstahl-Raupenmikromischer (Modell CPMM-V.1.2-R300, Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH). Der prinzipielle Aufbau der Mischer-Anlage ist in Abschnitt 2.3.2.1 gezeigt. Sämtliche Polymerlösungen wurden in THF hergestellt und vor der Verwendung durch einen Millex®-LCR 5 µm Spritzenfilter filtriert. Gegebenenfalls wurden Vormischungen mit Reinstwasser hergestellt. Flussraten und Mischverhältnisse wurden ebenfalls an den gewünschten Selbstorganisationsprozess der Blockcopolymeren angepasst. Das verbleibende Lösungsmittel in der Polymersom-Dispersion wurde durch Abdampfen entfernt (Geruchs- und Gewichtskontrolle). Die Beladung von hydrophilen Komponenten wie Rutin-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln (0,8 g/L) oder den Farbstoffen Phloxin B (0,08 g/L) und Rhodamin B (0,01 g/L) wurden durch Zugabe in das Wasserreservoir erreicht. Freier Farbstoff wurde durch Gelfiltration durch eine DextraSEC PRO10-Säule abgetrennt. Die hydrophobe Beladung wurde durch Zugabe der hydrophoben Eisenoxid-Partikel in die Polymer-Startlösung realisiert. Polymersom-Herstellung aus dem Pluronic® L121 wurde analog durchgeführt, jedoch gleichbleibend bei 10 g/L Startkonzentration in reinem THF und eine Gesamtflussrate von 10 mL/min bei einem Mischverhältnis von 1 : 10 (Polymer:Wasser). Die Beladung wurde auch hier durch Zugabe der hydrophoben Komponenten in die Start-Polymerlösung erreicht. Eisenoxid-Nanopartikel wurden in verschiedenen Konzentrationen zwischen 4 % und 50 % (w/w) bezogen auf die Polymerkonzentration eingesetzt. Die Camptothecin-Konzentration bei der Wirkstoffbeladung betrug 260 µg/mL in der Polymerlösung. Verbleibendes THF wurde durch Dialyse gegen Wasser entfernt.

6.2.2 Filmrehydration

Ausgehend von 1 mL der Polymerlösung (5 g/L PB₃₂-PEO₂₉ in THF) wurde ein dünner Film in einem Kolben präpariert. Der Film wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels bei 50 °C im Vakuum getrocknet. Nach Zugabe von 5 mL Wasser wurde der Polymerfilm durch Ultraschallbehandlung resolubilisiert. Anschließend wurde die Polymersom-Dispersion durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert (50 Extrudierschritte). Zur Beladung mit hydrophoben Nanopartikeln wurden die Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Partikel (Ferrofluid) zunächst gegen THF dialysiert und nach Trocknung gravimetrisch der Feststoffgehalt bestimmt. Die Eisenoxid-Nanopartikel in THF wurden in definierter Konzentration dann zu der Start-Polymerlösung gegeben (20 % (w/w) bezogen auf die Polymerkonzentration) und die nachfolgenden Schritte analog durchgeführt. Der hydrophile Farbstoff wurde dem Wasser zur Rehydration in einer Konzentration von 0,05 g/L zugesetzt. Freier Farbstoff wurde durch Gelfiltration mit einer DextraSEC PRO10-Säule von der Polymersom-Dispersion entfernt.

6.2.3 Co-Lösemittel-Methode

Die Polymerlösung (mit 2,4 g/L PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH) in THF wurde in einem Rundkolben vorgelegt, unter Rühren wurden hydrophile Rutin-stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel (2 g/L) in Wasser unter Rühren mit 9,9 mL/h zugegeben bis der Wassergehalt über 70 % lag. Anschließend wurde verbleibendes THF in der Polymersom-Dispersion durch Abdampfen vollständig entfernt (Geruchs- und Gewichtskontrolle). Durch nachträgliche Zudosierung von Wasser wurde die Polymerkonzentration auf 1 g/L eingestellt.

6.3 Charakterisierungsmethoden

6.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Fixierung der PB-*b*-PEO-Nanostrukturen zur Analyse im trockenen Zustand in der Transmissionselektronenmikroskopie wurde durch Gammastrahlen-induzierte Vernetzung erreicht. Dazu wurden die Polymerdispersion in Wasser mit Konzentrationen < 1 g/L von Isotron Deutschland GmbH (Allershausen, Deutschland) mit einer Durchschnittsdosis von 60 kGy (Co⁶⁰) bestrahlt.

Die TEM Aufnahmen wurden an einem FEI Tecnei 12 oder Philips Elektronenmikroskop EM420 gemacht. Die Proben wurden dafür zunächst auf Kohlenstoff-beschichteten Kupfergrids getrocknet. Die TEM-Bilder wurden bei 120 kV Beschleunigungsspannung mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Für die Cryo-TEM-Aufnahmen wurden ein Vitrobot (FEI) zur Vitrifizierung der Proben zur Hilfe genommen. Die Grids (Holey Carbon Films R2/1, Quantifoil) wurden im Plasma-Ofen im Argon-Sauerstoff-Strom gereinigt und anschließend 5 μ L Probe aufgetragen. Die Probe wurde in kondensiertem Propan unter Kühlen mit flüssigem Stickstoff vor der TEM-Analyse schockgefroren. Ein Großteil der in dieser Arbeit gezeigten TEM-Analysen wurde dankenswerterweise von (oder nach Anleitung von) Raphael Thiermann an Geräten der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

6.3.2 Lichtstreuung- und Zeta-Potenzial-Messungen

Die Lichtstremessungen wurden an einem ALV-CGS-3 MD Goniometer-System, mit einem 632 nm Helium-Neon-Laser, acht Single-Photon-Detektoren und zwei ALV-7004 Multiple Tau Digital Real Time Korrelatoren durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proben durch 0,45 μ m Spritzenfilter (Millex LCR oder PVDF, Millipore) filtriert. Die Datenanalyse erfolgte mit einem auf dem Simplex-Algorithmus basierenden Fit-Programm (HDRC, programmiert von Oliver Nirschl, Arbeitskreis Prof. Dr. Manfred Schmidt, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz). Zur Bestimmung des apparenten Diffusionskoeffizienten wurde je nach Anwendung ein mono-, di- oder triexponentieller Fit sowie kombinierte Fit-Funktionen für die Multikomponenten-Analyse angewandt. Die winkelabhängigen Ergebnisse wurden anschließend für $q \rightarrow 0$ extrapoliert und über die Stokes-Einstein-Gleichung der mittlere hydrodynamische Radius berechnet. Die Ergebnisse zur statischen Lichtstreuung wurden mit dem ALV Statik Programm der Lichtstreuanlage ausgewertet. Zeta-Potenzial-Messungen wurden in Wasser mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) durchgeführt.

6.3.3 Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration und Aggregationstemperatur

Die Messung der kritischen Aggregationskonzentration wurde an der Lichtstreuanlage durchgeführt. Dazu wurde jeweils die Streuintensität bei einem Winkel von 90° gemessen. Um die aus der Verdünnung resultierende Verringerung der Streuintensität zu

eliminieren, wurde die Streuintensität auf die jeweilige Konzentration normiert. Die kritische Aggregationskonzentration wurde am Schnittpunkt der durch lineare Regression angepassten Datenpunkte ermittelt. Zur Bestimmung der kritischen Aggregations-temperatur wurde die Polymersom-Dispersion sukzessive in der Lichtstreuapparatur abgekühlt und jeweils an 8 Winkeln dynamische Lichtstreuung gemessen. Die mittleren hydrodynamischen Radien wurden wie zuvor beschrieben nach Extrapolation $q \rightarrow 0$ mit dem Diffusionskoeffizienten über die Stokes-Einstein-Gleichung berechnet.

6.4 Proteinadsorption

6.4.1 DLS-Multikomponenten-Analyse

Das Agglomerationsverhalten der Polymersom-Dispersionen wurde nach der Methode von Rausch et al. mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung beurteilt.¹⁹⁰ Zunächst wurden dazu sowohl Zellkulturmedium mit zugesetztem FCS als auch die Polymersom-Dispersion einzeln vermessen werden. Anschließend werden die Polymersome direkt in das Protein-enhaltende Zellkulturmedium filtriert und erneut vermessen. Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben mit Hilfe der HDRC-Software (programmiert von Oliver Nirschl, Arbeitskreis Prof. Dr. Manfred Schmidt, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz).

6.4.2 Bestimmung der Beladungseffizienz

Der Camptothecin-Gehalt der beladenen Polymersome wurde mit Hilfe einer HPLC-Methode nach Warner et al. bestimmt.²⁷⁰ Dazu wurde die Polymersom-Dispersion getrocknet und anschließend 1 mg der wirkstoffbeladenen Polymersome in 1 mL DMSO gelöst und vor der Analyse in der HPLC mit 20 mM Phosphat-Puffer pH 6 ausreichend verdünnt. Die Analyse wurde an einem Waters Millenium System mit einer Novapak C₁₈ Waters Säule und einer photometrischen Detektion bei 368 nm durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus 23 % (v/v) Acetonitril und 77 % Triethylamin-Acetat-Puffer (1 % (v/v) Triethylamin in Wasser, angesäuert auf pH 5,5 mit Eisessig). Die Flussrate wurde auf 1 mL/min eingestellt.

Die Beladungseffizienz der hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel wurde mittels thermogravimetrischer Analyse mit einem TGA Q500 Instrument (TA Instruments)

durchgeführt. Die Beladung mit Farbstoffen wurde mit kombinierten photometrischen und fluorometrischen Messungen quantifiziert.

6.4.3 In-Vitro-Freisetzungsstudien

Die Polymersom-Dispersion mit einer bekannten Konzentration an Farb- bzw. Wirkstoff wurde in einen Dialysebeutel (MWCO: 1 kDa, Spektrum®) gegeben. Die Freisetzung erfolgte in einem temperierten FreisetzungsmEDIUM (Wasser oder PBS-Puffer pH 7,4) mit genügend großen Volumen, um sogenannte *Sink conditions*, d.h. die vollständige Lösung des freigesetzten Stoffes, zu gewährleisten. In bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und entnommenes Volumen durch frisches Medium ersetzt. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch für Camptothecin bei 368 nm und für Phloxin B fluorometrisch (Anregung 490 nm, Emission 560 nm) mit einem BioTec Synergy Multi-Mode Microplate Reader. Die prozentuelle Freisetzung bezieht sich jeweils auf die zu Beginn des Versuchs eingesetzte Menge an Farb- oder Wirkstoff innerhalb des Dialyse-Beutels.

6.4.4 Zellviabilitäts-Assay

6.4.4.1 Fluoresceindiacetat-Assay

Humane Zervixcarcinoma-Zellen (HeLa-Zellen) wurden 24 h vor Versuchsbeginn in einer Dichte von 10000 Zellen / well (96-well plate) eingesät und in DMEM-Medium mit 10 % FCS bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium, welches die Testsubstanzen in definierter Konzentration enthielt und ebenfalls 10 % FCS zugesetzt hatte, ersetzt. Nach 48 h Inkubation wurde das relative Zellüberleben mit einem auf der enzymatischen Spaltung des Fluoresceindiacetats basierenden Assays ermittelt.¹⁹³ Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit 200 µL Fluoresceindiacetat (10 µg/mL) in PBS inkubiert. Die Zellviabilität wurde durch fluorometrische Messung bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlänge von 538nm bestimmt. Die Zellviabilität wurde prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollzellgruppe angegeben. Die Zellkulturexperimente wurden an der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hendrik Fuchs, mit Unterstützung von Dr. Diana Bachran durchgeführt.

6.4.4.2 MTT-Assay

Die humane Krebszelllinie PC-3 wurde in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % (w/v) Penicillin/Steptomycin bei 37 °C in 5 % CO₂ kultiviert. Die *In-Vitro*-Zytotoxizität wurde mit Hilfe des MTT-Assay evaluiert, welcher auf die mitochondriale Metabolisierung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolimbromid (MTT) in blaue Formazan-Kristalle durch lebende Zellen basiert.¹⁹⁴ PC-3-Zellen wurden in einer Dichte von 5000 Zellen/well in 96-well plates 24 h vor Versuchsbeginn eingesät. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen für 72 h in frischen Zellkulturmedium mit 10 % FCS. Nach Beendigung der Versuchszeit wurde der Zellüberstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. 100 µL Zellkulturmedium und zusätzlich 20 µL einer 5 mg/mL MTT Lösung wurden auf die Zellen gegeben und für weitere 3 h im Zellkulturschrank bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgezogen 150 µL DMSO zugegeben. Zum Auflösen der intrazellulären Formazankristalle wurde die Zellkulturplatte 1 h bei 400 rpm auf einem Eppendorf Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption bei 540 nm gemessen und die Zellviabilität im Vergleich zu einer unbehandelten Zellkontrolle (Inkubation mit Medium ohne Testsubstanz, jedoch analoge Behandlung mit MTT) ermittelt. Diese Zellkulturexperimente wurden an der University of British Columbia in Vancouver, Canada, Faculty of Pharmaceutical Sciences in der Gruppe von Dr. Urs O. Häfeli, Associate Professor, während des DAAD-geförderten Auslandsaufenthalts, durchgeführt.

6.4.5 Durchflusszytometrie (FACS)

HeLa Zellen wurden in einer Dichte von 150000 Zellen /well in 12-well plates eingesät und 24 Stunden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und anschließend für eine Stunde bei 4 °C mit den Polymersomen (0,5 g/L) in PBS bzw. in DMEM-Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 2,3 mM EDTA in PBS von der Kulturschale abgelöst und in einem Beckman Coulter Epics XL Flow Cytometer mit einem 488 nm Laser vermessen. Die Fluoreszenzintensität wurde im FL2 Kanal (575 nm/Bandpass) detektiert. Zur Datenauswertung wurden basierend auf dem Dot plot (Forward-scatter/Side-scatter) Zelldebris für die Analyse ausgeschlossen. Die Daten wurden mit Hilfe der Cyflogic Software (Cyflo Ltd., Finnland) analysiert. Diese

Zellkulturexperimente wurden an der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hendrik Fuchs, mit Unterstützung von Dr. Diana Bachran durchgeführt.

Die FACS-Versuche zur Bestimmung der spezifischen Zellbindung Bombesin-funktionalisierter Polymersome an PC-3-Zellen wurde analog wie oben beschrieben durchgeführt. Jedoch wurden die Zellen für 3 h bei 37 °C mit den Polymersomen inkubiert und die Analyse wurde nach Ablösung mit 2,3 mM EDTA-PBS-Lösung an einem BDTM LSR II Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) im FL3 Kanal durchgeführt. Diese FACS-Experimente wurden an der University of British Columbia in Vancouver, Canada, in der ubcFLOW Cytometry Facility, während des DAAD-geförderten Auslandsaufenthalts, durchgeführt.

6.5 Funktionalisierung

6.5.1 Carboxylierung von Pluronic® L121

Die Veresterung von Pluronic® L121 wurde mit einem 20-fachen Überschuss an Bernsteinsäureanhydrid in THF unter Rückfluss durchgeführt. Nach 72 h Reaktionszeit wurde überschüssiges Bernsteinsäureanhydrid durch Dialyse (MWCO, 1 kDa) gegen THF entfernt. Schließlich wurde das Lösungsmittel abrotiert. Die Analyse mit Infrarot-Spektroskopie zeigte die typische Carbonyl-Bande zwischen 1670 und 1820 cm^{-1} , wodurch die erfolgreiche Carboxylierung des Polymers bestätigt wurde. Das IR-Spektrum befindet sich im Anhang, Abb. 9.2.

6.5.2 Farbstoffmarkierung und Biokonjugation

Die Farbstoffmarkierung mit Alexa Fluor® 647 als auch die Biokonjugation mit dem Targeting-Peptid [Lys³]-Bombesin wurde mit Hilfe gängiger Carbodiimid-Chemie durchgeführt. Polymersome (2 g/L bezogen auf die Polymerkonzentration) aus carboxyliertem Pluronic® L121 wurden mit EDC Hydrochlorid (5 mM) und NHS (5 mM) in 0,1 M MES Pufferlösung pH 5,5 für 1 h bei 20 °C und 700 rpm in einem Eppendorf Thermomixer aktiviert. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde nachfolgend auf pH 7 mit 0,2 M Boratpuffer angepasst und 560 nmol [Lys³]-Bombesin pro 10 mg Polymer wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für weitere 20 h bei 20 °C und 700 rpm weitergeführt. Verbleibende Aktivester-Gruppen wurden durch Zugabe von

1,5 mM Ethylendiamin innerhalb weiterer 6 h bei 20 °C vollständig abgesättigt. [Lys³]-Bombesin-funktionalisierte Polymersome wurden mittels Dialyse (MWCO: 12 kDa) aufgereinigt und anschließend mit Alexa Fluor® 647 NHS-Ester nach dem Hersteller-Protokoll farbstoffmarkiert. Es folgte ein weitere Dialyse-Aufreinigungsschritt (MWCO: 12 kDa). Kontrollproben ohne [Lys³]-Bombesin wurden analog hergestellt, jedoch wurde anstelle des Peptides das identische Volumen an Wasser zugegeben. Die Fluoreszenzintensitäten beider farbstoffmarkierten Polymersom-Dispersionen unterschieden sich weniger als 10 % in ihrer Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzspektren befinden sich ebenfalls im Anhang, Abb. 9.5).

6.5.3 Quantifizierung des Peptids auf der Polymersom-Oberfläche

Die Bestimmung des [Lys³]-Bombesins auf der Polymersom-Oberfläche wurde mit Hilfe einer quantitativen HPLC-basierten Aminosäuren-Analyse nach Bartolomeo und Miasano durchgeführt.²⁷⁷ Um eine saure Hydrolyse des Peptids zu erzielen, wurden ca. 6 mg getrocknetes, funktionalisiertes Polymer mit 1 mL 5 N HCl bei 110 °C über Nacht behandelt. Nach Abkühlen, Neutralisation mit NaOH und Filtration (um präzipitiertes Polymer abzutrennen) wurde eine Vorsäulen-Derivatisierung mit FluoraldehydeTM (ortho-Phthaldialdehyd, kurz OPA) Reagenzlösung wie folgt durchgeführt: 50 µL Boratpuffer (50 mM, pH 9) und 50 µL Probe wurden für 30 Sekunden gemischt, 50 µL OPA-Reagenz wurde nachfolgen zugegeben und für 90 Sekunden gemischt, schließlich erfolgt eine Zugabe von 600 µL Acetat-Puffer (50 mM, pH 7) und erneutes Mischen über 30 Sekunden. Die Analyse wurde direkt an die Derivatisierung anschließend an einem HPLC Waters Millennium System mit Novapak C₁₈ Waters Säule und einer photometrischen Detektion bei 338 nm durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus A: 50 mM Acetat-Puffer pH 7 und B: Acetonitril (Gradient startete nach 7 min A mit 10 % Acetonitril und endete mit 80 % Acetonitril nach weiteren 5 min). Es wurden je 10 µL Probe injiziert. Die Flussrate wurde auf 1 mL/min gesetzt. Eine Kalibrierreihe wurde mit Glutaminsäure durchgeführt und die Wiederfindung nach der Hydrolyse des Tripeptids Glutathion bestimmt. Die HPLC-Messungen wurden an der University of British Columbia in Vancouver, Canada, Faculty of Pharmaceutical Sciences, während des DAAD-geförderten Auslandsaufenthalts, durchgeführt.

6.5.4 *In-Vitro*-Zellbindung- und Zellaufnahme-Studie

Die Zellbindung und Zellaufnahme von Farbstoff-markierten [Lys³]-Bombesin-Polymersomen wurde neben der Durchflusszytometrie mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) und einem Fluoreszenz-basierten Aufnahmetest evaluiert. Letztere ermöglicht, zwischen Zelloberflächen-gebundenen und aufgenommenen Polymersomen zu unterscheiden. PC-3-Zellen wurden mit einer Dichte von 150.000 Zellen/well in 12-well plates eingesät und übernacht bei 37 °C, 5 % CO₂ in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptavidin kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Zellen mit Alexa Fluor® 647-markierten Polymersomen (0,3 g/L Polymerkonzentration, jeweils mit und ohne [Lys³]-Bombesin-Funktionalisierung) in PBS mit 5 % BSA bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 h inkubiert. Konkurrenzexperimente, um die Rezeptorspezifität zu bestätigen, wurden nach einer Prä-Inkubation mit einem Überschuss an freiem Bombesin (15 µM) durchgeführt. Die Durchflusszytometrie-Experimente sind bereits in Abschnitt 6.4.5 beschrieben. Für den *In-Vitro*-Aufnahmetest wurden die Zellen nach der Inkubation mit Glycin-HCl pH 2,2 behandelt, um gebundene Polymersome von der Zelloberfläche zu entfernen. Die entfernte Fraktion wurde gesammelt und fluorometrisch vermessen (Anregung 630 nm, Emission 650 nm). Anschließend wurden die Zellen mit 0,3 M NaOH lysiert und ebenfalls fluorometrisch analysiert. Die prozentuelle Aufnahme wurde wie folgt dargestellt: % Zellaufnahme = (Fluoreszenzintensität des Zelllysats)/(Fluoreszenzintensität der Polymersome, welche zur Inkubation auf die Zellen gegeben wurden).

Für die konfokale LSM-Studie wurden die Zellen in vergleichbarer Dichte auf Polylysin-beschichtete Deckgläschen gesät und nach der Inkubation ebenfalls dreimal mit PBS gewaschen. Mit einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung wurden die Zellen anschließend fixiert und mit einem WGA-Fluorescein-Konjugat nach Hersteller-Anweisung gefärbt. Schließlich wurden die Deckgläschen mit einem DAPI-beinhaltenen Mounting-Medium Prolong® Gold auf Glas-Mikroskop-Objektträgern befestigt. Die Aufnahmen entstanden an einem Olympus FV10i Konfokal-Mikroskop mit Unterstützung von Kevin Hodgson von der Bioimaging Facility an der University of British Columbia in Vancouver, Kanada.

6.6 Magnetische Charakterisierung

6.6.1 Relaxometrie-Messungen

Die Relaxometrie-Messungen wurden von Urs O. Häfeli mit Unterstützung von Michael J. House und Timothy G. St. Pierre an der University of Western Australia durchgeführt. Die Proton-Relaxationsraten wurden seriell an Polymersom-Proben unterschiedlicher Konzentrationen bei 25 °C und einem magnetischen Feld von 1,4 Tesla an einem Bruker Minispec mq60 NMR Analyzer gemessen. Die longitudinale (T_1) und die transversalen (T_2) Relaxationskurven wurden durch ein Inversion Recovery Spin Experiment bzw. einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Spin-Echo Pulssequenz ermittelt. Alle Ergebnisse sind als dosisabhängige Relaxationsraten gegen die Eisenkonzentration aufgetragen, dargestellt.

6.6.2 Magnetic Particle Spectroscopy (MPS)

Die Leistungsfähigkeit der magnetischen Polymersome für das MPI-Verfahren wurde durch Messungen an einem Magnetic Particle Spectrometer (Bruker Biospin) evaluiert. Die Messungen wurden von Norbert Löwa an der Physikalisch Technischen Bundesanstalt in Berlin durchgeführt. Es wurde ein dynamisches Wechselfeld von 25 mT und eine Anregungsfrequenz f_0 von 25,25 kHz für die Messung eingestellt. Das Signalspektrum wurde auf den Eisengehalt der Polymersome normiert.

7 Literaturverzeichnis

1. Taniguchi, N. On the Basic Concept of 'Nano-Technology'. *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, Tokyo, Part II* (1974).
2. Koch, K., Bhushan, B., Jung, Y.C. & Barthlott, W. Fabrication of artificial Lotus leaves and significance of hierarchical structure for superhydrophobicity and low adhesion. *Soft Matter* **5**, 1386-1393 (2009).
3. Potyrailo, R.A. et al. Morpho butterfly wing scales demonstrate highly selective vapour response. *Nature Photonics* **1**, 123-128 (2007).
4. Hu, S.H., Xia, Z.H. & Dai, L.M. Advanced gecko-foot-mimetic dry adhesives based on carbon nanotubes. *Nanoscale* **5**, 475-486 (2013).
5. Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K. & Sparreboom, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer* **37**, 1590-1598 (2001).
6. Bertrand, N. & Leroux, J.-C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. *Journal of Controlled Release* **161**, 152-163 (2012).
7. Chao, P.Y. et al. Pulmonary targeting microparticulate camptothecin delivery system: anticancer evaluation in a rat orthotopic lung cancer model. *Anti-Cancer Drugs* **21**, 65-76 (2010).
8. Chollet, P., Favrot, M.C., Hurbin, A. & Coll, J.L. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *Journal of Gene Medicine* **4**, 84-91 (2002).
9. Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P. & De Geest, B. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Therapy* **15**, 1193-1199 (2008).
10. Ogawara, K. et al. Uptake by hepatocytes and biliary excretion of intravenously administered polystyrene microspheres in rats. *Journal of Drug Targeting* **7**, 213-221 (1999).
11. Paek, H.-J. et al. Modulation of the pharmacokinetics of zinc oxide nanoparticles and their fates in vivo. *Nanoscale* **5**, 11416-11427 (2013).
12. Lankveld, D.P.K. et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* **31**, 8350-8361 (2010).
13. Tenzer, S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology* **8**, 772-U1000 (2013).
14. Tenzer, S. et al. Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona: A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis. *Acs Nano* **5**, 7155-7167 (2011).

15. Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A. & McNeil, S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 428-437 (2009).
16. Ogawara, K. et al. Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **100**, 451-455 (2004).
17. Cortes, J. & Saura, C. Nanoparticle albumin-bound (nab (TM))-paclitaxel: improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer. *Ejc Supplements* **8**, 1-10 (2010).
18. Wasan, K.M., Brocks, D.R., Lee, S.D., Sachs-Barrable, K. & Thornton, S.J. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 84-99 (2008).
19. Allen, T.M. A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **640**, 385-397 (1981).
20. Wolfrum, C. et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nature Biotechnology* **25**, 1149-1157 (2007).
21. Kreuter, J. et al. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *Journal of Controlled Release* **118**, 54-58 (2007).
22. Petri, B. et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Revisiting the role of surfactants. *Journal of Controlled Release* **117**, 51-58 (2007).
23. Rensen, P.C.N. et al. Selective liver targeting of antivirals by recombinant chylomicrons - A new therapeutic approach to hepatitis B. *Nature Medicine* **1**, 221-225 (1995).
24. Gessner, A. et al. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *International Journal of Pharmaceutics* **196**, 245-249 (2000).
25. Dodo, C.G., Senna, P.M., Custodio, W., Leme, A.F.P. & Cury, A.A.D. Proteome analysis of the plasma protein layer adsorbed to a rough titanium surface. *Biofouling* **29**, 549-557 (2013).
26. Owens, D.E. & Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **307**, 93-102 (2006).
27. Chanan-Khan, A. et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Annals of Oncology* **14**, 1430-1437 (2003).
28. Reddy, S.T. et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nature Biotechnology* **25**, 1159-1164 (2007).

29. Chen, H. et al. Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo Förster resonance energy transfer imaging. *Langmuir* **24**, 5213-5217 (2008).
30. Chen, H. et al. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 6596-6601 (2008).
31. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* **65**, 271-284 (2000).
32. Hobbs, S.K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4607-4612 (1998).
33. Azzopardi, E.A., Ferguson, E.L. & Thomas, D.W. The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 257-274 (2013).
34. Svenson, S. Clinical translation of nanomedicines. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **16**, 287-294 (2012).
35. Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **13**, 238- & (1965).
36. Barenholz, Y. Doxil (R) - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* **160**, 117-134 (2012).
37. Torchilin, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 145-160 (2005).
38. Batist, G. et al. Safety, Pharmacokinetics, and Efficacy of CPX-1 Liposome Injection in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* **15**, 692-700 (2009).
39. Bayne, W.F., Mayer, L.D. & Swenson, C.E. Pharmacokinetics of CPX-351 (Cytarabine/Daunorubicin HCl) Liposome Injection in the Mouse. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **98**, 2540-2548 (2009).
40. Haussecker, D. The Business of RNAi Therapeutics in 2012. *Molecular therapy. Nucleic acids* **1**, e8 (2012).
41. Yuan, X., Naguib, S. & Wu, Z. Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery* **8**, 521-536 (2011).
42. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V. & Alakhov, V.Y. Pluronic((R)) block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 759-779 (2002).
43. Werner, M.E. et al. Preclinical Evaluation of Genexol-PM, a Nanoparticle Formulation of Paclitaxel, as a Novel Radiosensitizer for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **86**, 463-468 (2013).
44. Lee, K.S. et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **108**, 241-250 (2008).

45. Bae, Y., Nishiyama, N. & Kataoka, K. In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-Sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments. *Bioconjugate Chemistry* **18**, 1131-1139 (2007).
46. Gong, J., Chen, M.W., Zheng, Y., Wang, S.P. & Wang, Y.T. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. *Journal of Controlled Release* **159**, 312-323 (2012).
47. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V. & Miller, D.W. Pluronic® block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 151-164 (2003).
48. Batrakova, E. et al. Fundamental Relationships Between the Composition of Pluronic Block Copolymers and Their Hypersensitization Effect in MDR Cancer Cells. *Pharmaceutical Research* **16**, 1373-1379 (1999).
49. Armstrong, A. et al. SP1049C as first-line therapy in advanced (inoperable or metastatic) adenocarcinoma of the oesophagus: A phase II window study. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 198S-198S (2006).
50. Valle, J.W. et al. A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Investigational New Drugs* **29**, 1029-1037 (2011).
51. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**, 347-360 (2003).
52. Duncan, R., Ringsdorf, H. & Satchi-Fainaro, R. Polymer therapeutics: Polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: Past, present and future opportunities. *Polymer Therapeutics I: Polymers as Drugs, Conjugates and Gene Delivery Systems* **192**, 1-8 (2006).
53. Gros, L., Ringsdorf, H. & Schupp, H. Polymeric anti-tumor agents on a molecular and on a cellular level. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **20**, 305-325 (1981).
54. Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium*, 135-153 (1975).
55. Sigma-Tau Pharmaceuticals Inc. .
http://www.sigmatau.com/products/products_prescription.asp, abgerufen am 22. November 2013.
56. Haag, R. Supramolecular drug-delivery systems based on polymeric core-shell architectures. *Angewandte Chemie-International Edition* **43**, 278-282 (2004).
57. Starpharma Holdings Limited.
http://www.starpharma.com/drug_delivery/dep_docetaxel, abgerufen 10. März 2014.
58. Lucks, J.-S. & Mueller, R.H. Arzneistoffträger aus festen lipidteilchen (feste lipidnanosphären (sln)). *Europäisches Patent*, EP 0605497 (1996).
59. Shegokar, R., Singh, K.K. & Mueller, R.H. Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles-From lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics* **416**, 461-470 (2011).

60. Dr. Rimpler GmbH.
<http://www.drrimpler.de/de/products/series/cutanova/productdetails.html?id=43&uid=1&pid=7662&type=product>, abgerufen am 10. März 2014.
61. Dr. Rimpler GmbH. <http://www.lancray.de/de/products/series/surmer.html>, abgerufen am 10. März 2014.
62. Joshi, M.D. & Mueller, R.H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **71**, 161-172 (2009).
63. Reddy, L.H. & Couvreur, P. Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases. *Journal of Hepatology* **55**, 1461-1466 (2011).
64. Svenson, S., Wolfgang, M., Hwang, J., Ryan, J. & Eliasof, S. Preclinical to clinical development of the novel camptothecin nanopharmaceutical CRLX101. *Journal of Controlled Release* **153**, 49-55 (2011).
65. Hrkach, J. et al. Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile. *Science Translational Medicine* **4** (2012).
66. Sankhala, K.K. et al. A phase I pharmacokinetic (PK) study of MBP-426, a novel liposome encapsulated oxaliplatin. *Journal of Clinical Oncology* **27** (2009).
67. Zhao, J., Schlaad, H., Weidner, S. & Antonietti, M. Synthesis of terpene-poly(ethylene oxide)s by t-BuP4-promoted anionic ring-opening polymerization. *Polymer Chemistry* **3**, 1763-1768 (2012).
68. Schlaad, H. et al. Poly(2-oxazoline)s as Smart Bioinspired Polymers. *Macromolecular Rapid Communications* **31**, 511-525 (2010).
69. Geng, Y., Discher, D.E., Justynska, J. & Schlaad, H. Grafting Short Peptides onto Polybutadiene-block-poly(ethylene oxide): A Platform for Self-Assembling Hybrid Amphiphiles. *Angewandte Chemie* **118**, 7740-7743 (2006).
70. Schlaad, H., Kukulka, H., Rudloff, J. & Below, I. Synthesis of alpha,omega-heterobifunctional poly(ethylene glycol)s by metal-free anionic ring-opening polymerization. *Macromolecules* **34**, 4302-4304 (2001).
71. Justynska, J. & Schlaad, H. Modular synthesis of functional block copolymers. *Macromolecular Rapid Communications* **25**, 1478-1481 (2004).
72. Hawker, C.J. Advances in 'living' free-radical polymerization: Architectural and structural control. *Trends in Polymer Science* **4**, 183-188 (1996).
73. Reeves, J.P. & Dowben, R.M. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *Journal of Cellular Physiology* **73**, 49-& (1969).
74. Tanford, C. Hydrophobic effect and organization of living matter. *Science* **200**, 1012-1018 (1978).
75. Blokzijl, W. & Engberts, J. Hydrophobic effects - opinions and facts. *Angewandte Chemie-International Edition* **32**, 1545-1579 (1993).
76. Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. & Ninham, B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **72**, 1525-1568 (1976).
77. Hyde, S.T. Curvature and the global structure of interfaces in surfactant-water systems. *Journal De Physique* **51**, C7209-C7228 (1990).

78. Discher, D.E. & Ahmed, F. Polymersomes. *Annual Review of Biomedical Engineering* **8**, 323-341 (2006).
79. Maskos, M. Influence of the solvent and the end groups on the morphology of cross-linked amphiphilic poly(1,2-butadiene)-b-poly(ethylene oxide). *Polymer* **47**, 1172-1178 (2006).
80. Antonietti, M. & Forster, S. Vesicles and liposomes: A self-assembly principle beyond lipids. *Advanced Materials* **15**, 1323-1333 (2003).
81. Forster, S., Zisenis, M., Wenz, E. & Antonietti, M. Micellization of strongly segregated block copolymers. *Journal of Chemical Physics* **104**, 9956-9970 (1996).
82. Matsen, M.W. & Bates, F.S. Unifying weak- and strong-segregation block copolymer theories. *Macromolecules* **29**, 1091-1098 (1996).
83. Forster, S. & Plantenberg, T. From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials. *Angewandte Chemie-International Edition* **41**, 689-714 (2002).
84. Matsen, M.W. & Bates, F.S. Block copolymer microstructures in the intermediate-segregation regime. *Journal of Chemical Physics* **106**, 2436-2448 (1997).
85. Espanol, P. & Warren, P. Statistical-mechanics of dissipative particle dynamics. *Europhysics Letters* **30**, 191-196 (1995).
86. Shillcock, J.C. Spontaneous Vesicle Self-Assembly: A Mesoscopic View of Membrane Dynamics. *Langmuir* **28**, 541-547 (2012).
87. Marrink, S.J., Tieleman, D.P. & Mark, A.E. Molecular dynamics simulation of the kinetics of spontaneous micelle formation. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 12165-12173 (2000).
88. Lohse, B., Bolinger, P.Y. & Stamou, D. Encapsulation Efficiency Measured on Single Small Unilamellar Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14372-14373 (2008).
89. Vanhest, J.C.M., Delnoye, D.A.P., Baars, M., Vangenderen, M.H.P. & Meijer, E.W. Polystyrene-dendrimer amphiphilic block-copolymers with a generation-dependent aggregation. *Science* **268**, 1592-1595 (1995).
90. Zhang, L.F. & Eisenberg, A. Multiple morphologies of crew-cut aggregates of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) block-copolymers. *Science* **268**, 1728-1731 (1995).
91. Discher, B.M. et al. Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* **284**, 1143-1146 (1999).
92. Nikova, A.T. et al. Swollen vesicles and multiple emulsions from block copolymers. *Macromolecules* **37**, 2215-2218 (2004).
93. Marsden, H.R. et al. Detergent-Aided Polymersome Preparation. *Biomacromolecules* **11**, 833-838 (2010).
94. Mueller, W. et al. Hydrophobic Shell Loading of PB-*b*-PEO Vesicles. *Macromolecules* **42**, 357-361 (2008).

95. Luo, L.B. & Eisenberg, A. Thermodynamic stabilization mechanism of block copolymer vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 1012-1013 (2001).
96. Hauschild, S. et al. Direct Preparation and Loading of Lipid and Polymer Vesicles Using Inkjets. *Small* **1**, 1177-1180 (2005).
97. Lorenceau, E. et al. Generation of polymersomes from double-emulsions. *Langmuir* **21**, 9183-9186 (2005).
98. Shum, H.C., Kim, J.W. & Weitz, D.A. Microfluidic fabrication of monodisperse biocompatible and biodegradable polymersomes with controlled permeability. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 9543-9549 (2008).
99. Seth, A., Bealle, G., Santanach-Carreras, E., Abou-Hassan, A. & Menager, C. Design of Vesicles Using Capillary Microfluidic Devices: From Magnetic to Multifunctional Vesicles. *Advanced Materials* **24**, 3544-3548 (2012).
100. Habault, D. et al. Droplet Microfluidics to Prepare Magnetic Polymer Vesicles and to Confine the Heat in Magnetic Hyperthermia. *Ieee Transactions on Magnetics* **49**, 182-190 (2013).
101. Yube, K. & Mae, K. Efficient Oxidation of Aromatics with Peroxides under Severe Conditions Using a Microreaction System. *Chemical Engineering & Technology* **28**, 331-336 (2005).
102. Jähnisch, K. et al. Direct fluorination of toluene using elemental fluorine in gas/liquid microreactors. *Journal of Fluorine Chemistry* **105**, 117-128 (2000).
103. Nagaki, A. et al. Cation Pool-Initiated Controlled/Living Polymerization Using Microsystems. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 14702-14703 (2004).
104. Wu, T., Mei, Y., Cabral, J.T., Xu, C. & Beers, K.L. A New Synthetic Method for Controlled Polymerization Using a Microfluidic System. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 9880-9881 (2004).
105. Ziegenbalg, D., Kompter, C., Schönfeld, F. & Kralisch, D. in Green Processing and Synthesis 211 (2012).
106. Muller, W., Maskos, M., Metzke, D. & Lob, P. Synthesis of block copolymer vesicles in a micromixer. *Houille Blanche-Revue Internationale De L Eau*, 125-128 (2009).
107. Thiermann, R. Selbstorganisation amphiphiler Block-Copolymere in Mikromischern. *Dissertation*, Technische Universität Berlin. (2014).
108. Thiermann, R. et al. Size controlled polymersomes by continuous self-assembly in micromixers. *Polymer* **53**, 2205-2210 (2012).
109. Schönfeld, F., Hessel, V. & Hofmann, C. An optimised split-and-recombine micro-mixer with uniform 'chaotic' mixing. *Lab on a Chip* **4**, 65-69 (2004).
110. IMM. Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Katalog. 40-43 (2006).
111. Jain, S. & Bates, F.S. Consequences of Nonergodicity in Aqueous Binary PEO-PB Micellar Dispersions. *Macromolecules* **37**, 1511-1523 (2004).
112. Maskos, M. & Harris, J.R. Double-shell vesicles, strings of vesicles and filaments found in crosslinked micellar solutions of poly(1,2-butadiene)-block-

- poly(ethylene oxide) diblock copolymers. *Macromolecular Rapid Communications* **22**, 271-273 (2001).
113. Won, Y.-Y., Davis, H.T. & Bates, F.S. Giant Wormlike Rubber Micelles. *Science* **283**, 960-963 (1999).
114. Shen, H.W. & Eisenberg, A. Block length dependence of morphological phase diagrams of the ternary system of PS-b-PAA/dioxane/H₂O. *Macromolecules* **33**, 2561-2572 (2000).
115. Discher, D.E. & Eisenberg, A. Polymer Vesicles. *Science* **297**, 967-973 (2002).
116. Mueller, W. et al. pH-change protective PB-b-PEO polymersomes. *Polymer* **52**, 1263-1267 (2011).
117. Rodriguez-Garcia, R. et al. Polymersomes: smart vesicles of tunable rigidity and permeability. *Soft Matter* **7**, 1532-1542 (2011).
118. Barreiro-Iglesias, R. et al. Solubilization and stabilization of camptothecin in micellar solutions of pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers. *Journal of Controlled Release* **97**, 537-549 (2004).
119. Kabanov, A.V. & Alakhov, V.Y. Pluronic (R) block copolymers in drug delivery: From micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **19**, 1-72 (2002).
120. Kabanov, A.V., Lemieux, P., Vinogradov, S. & Alakhov, V. Pluronic((R)) block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 223-233 (2002).
121. Chiappetta, D.A. & Sosnik, A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **66**, 303-317 (2007).
122. Singh-Joy, S.D. & McLain, V.C. Safety Assessment of Poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, Poloxamer 105 Benzoate, and Poloxamer 182 Dibenzoate as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology* **27**, 93-128 (2008).
123. McKeage, K. & Wagstaff, A.J. Subcutaneous interferon-beta-1a new formulation. *Cns Drugs* **21**, 871-876 (2007).
124. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V. & Alakhov, V.Y. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 759-779 (2002).
125. Pec, E.A., Wout, Z.G. & Johnston, T.P. Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **81**, 626-630 (1992).
126. Grindel, J.M., Jaworski, T., Piraner, O., Emanuele, R.M. & Balasubramanian, M. Distribution, metabolism, and excretion of a novel surface-active agent, purified poloxamer 188, in rats, dogs, and humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **91**, 1936-1947 (2002).
127. Schmolka, I.R. Review of block polymer surfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society* **54**, 110-116 (1977).

128. Kulthe, S.S. et al. Mixed micelle formation with hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers: Implications for controlled and targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **88**, 691-696 (2011).
129. Linse, P. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block-copolymers in aqueous solution. *Macromolecules* **26**, 4437-4449 (1993).
130. Bryskhe, K., Jansson, J., Topgaard, D., Schillen, K. & Olsson, U. Spontaneous vesicle formation in a block copolymer system. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 9710-9719 (2004).
131. Schillen, K., Bryskhe, K. & Mel'nikova, Y.S. Vesicles formed from a poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in dilute aqueous solution. *Macromolecules* **32**, 6885-6888 (1999).
132. Bryskhe, K., Schillen, K., Lofroth, J.E. & Olsson, U. Lipid-block copolymer immiscibility. *Physical Chemistry Chemical Physics* **3**, 1303-1309 (2001).
133. Li, F. et al. Pluronic polymersomes stabilized by core cross-linked polymer micelles. *Soft Matter* **5**, 4042-4046 (2009).
134. Li, F. et al. Stabilization of Polymersome Vesicles by an Interpenetrating Polymer Network. *Macromolecules* **40**, 329-333 (2006).
135. Wall, M.E. et al. Plant anti tumor agents. I. Isolation and structure of camptothecin a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata. *Journal of the American Chemical Society* **88**, 3888-3890 (1966).
136. Hertzberg, R.P., Caranfá, M.J. & Hecht, S.M. On the mechanism of topoisomerase-I inhibition by camptothecin - evidence for binding to an enzyme DNA complex. *Biochemistry* **28**, 4629-4638 (1989).
137. Morgan, M.T. et al. Dendrimer-encapsulated camptothecins: Increased solubility, cellular uptake, and cellular retention affords enhanced anticancer activity in vitro. *Cancer Research* **66**, 11913-11921 (2006).
138. Fassberg, J. & Stella, V.J. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **81**, 676-684 (1992).
139. Anastasi, A., Bucci, M. & Erspamer, V. Isolation and amino-acid sequences of alytesin and bombesin 2 analogous active tetradecapeptides from skin of european discoglossid frogs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **148**, 443-& (1972).
140. Qin, Y.F. et al. Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibit growth of SW-1990 human pancreatic adenocarcinoma and production of cyclic AMP. *International Journal of Cancer* **63**, 257-262 (1995).
141. Markwalder, R. & Reubi, J.C. Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Research* **59**, 1152-1159 (1999).
142. Gugger, M. & Reubi, J.C. Gastrin-Releasing Peptide Receptors in Non-Neoplastic and Neoplastic Human Breast. *The American Journal of Pathology* **155**, 2067-2076 (1999).
143. Fleischmann, A., Waser, B. & Reubi, J.C. Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors in tumor-associated blood vessels of human ovarian neoplasms. *Analytical Cellular Pathology* **29**, 421-433 (2007).

144. Ambrosini, V., Fani, M., Fanti, S., Forrer, F. & Maecke, H.R. Radiopeptide Imaging and Therapy in Europe. *Journal of Nuclear Medicine* **52**, 42S-55S (2011).
145. Parry, J., Andrews, R. & Rogers, B. MicroPET Imaging of Breast Cancer Using Radiolabeled Bombesin Analogs Targeting the Gastrin-releasing Peptide Receptor. *Breast Cancer Research and Treatment* **101**, 175-183 (2007).
146. Yang, Y.-S., Zhang, X., Xiong, Z. & Chen, X. Comparative in vitro and in vivo evaluation of two ⁶⁴Cu-labeled bombesin analogs in a mouse model of human prostate adenocarcinoma. *Nuclear Medicine and Biology* **33**, 371-380 (2006).
147. Cornelio, D., Roesler, R. & Schwartzmann, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Annals of Oncology* **18**, 1457-1466 (2007).
148. Taupitz, M., Schmitz, S. & Hamm, B. Superparamagnetic iron oxide particles: Current state and future development. *Rofo-Fortschritte Auf Dem Gebiet Der Rontgenstrahlen Und Der Bildgebenden Verfahren* **175**, 752-765 (2003).
149. Maier-Hauff, K. et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* **103**, 317-324 (2011).
150. MagForce AG. <http://www.magforce.de/produkte/nanothermr-therapie.html>, abgerufen am 15. November 2013.
151. Chorny, M., Fishbein, I., Forbes, S. & Alferiev, I. Magnetic Nanoparticles for Targeted Vascular Delivery. *Iubmb Life* **63**, 613-620 (2011).
152. Delyagina, E., Li, W.Z., Ma, N. & Steinhoff, G. Magnetic targeting strategies in gene delivery. *Nanomedicine* **6**, 1593-1604 (2011).
153. Kuznetsov, A.A. et al. Biodistribution of doxorubicin and nanostructured ferrocenyl carrier particles in organism during magnetically controlled drug delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **321**, 1575-1579 (2009).
154. Oliveira, H. et al. Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release* **169**, 165-170 (2013).
155. Choi, K.Y., Liu, G., Lee, S. & Chen, X. Theranostic nanoplatfoms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale* **4**, 330-342 (2012).
156. Lammers, T., Aime, S., Hennink, W.E., Storm, G. & Kiessling, F. Theranostic Nanomedicine. *Accounts of Chemical Research* **44**, 1029-1038 (2011).
157. Riedel, E. Anorganische Chemie (Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2012).
158. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *Ieee Transactions on Magnetism* **17**, 1247-1248 (1981).
159. Behrens, S. Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions. *Nanoscale* **3**, 877-892 (2011).
160. Hyeon, T., Lee, S.S., Park, J., Chung, Y. & Bin Na, H. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 12798-12801 (2001).

161. Yin, Y. & Alivisatos, A.P. Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface. *Nature* **437**, 664-670 (2005).
162. Inouye, K. et al. Oxygenation of ferrous-ions in reversed micelle and reversed micro-emulsion. *Journal of Physical Chemistry* **86**, 1465-1469 (1982).
163. Vogel, H. Gerthsen Physik (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1997).
164. Philippova, O., Barabanova, A., Molchanov, V. & Khokhlov, A. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. *European Polymer Journal* **47**, 542-559 (2011).
165. Cademartiri, L. & Ozin, G.A. Concepts of Nanochemistry (Wiley-VCH, Weinheim, 2009).
166. Dave, S.R. & Gao, X. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **1**, 583-609 (2009).
167. Rosensweig, R.E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **252**, 370-374 (2002).
168. Gilchrist, R.K. et al. Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of surgery* **146**, 596-606 (1957).
169. Thiesen, B. & Jordan, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia* **24**, 467-474 (2008).
170. Borrelli, N.F., Luderer, A.A. & Panzarino, J.N. Hysteresis heating for the treatment of tumors. *Physics in Medicine and Biology* **29**, 487-494 (1984).
171. Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics* **36**, R167-R181 (2003).
172. Debye, P. in *Congres International d'Electricite* 12 pp.-12 pp. (1932).
173. Trahms, L. in *Colloidal Magnetic Fluids* (ed. Odenbach, S.) 334-365 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009).
174. Hergt, R. & Dutz, S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **311**, 187-192 (2007).
175. Hergt, R. et al. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 80-86 (2005).
176. Gruettner, C., Mueller, K., Teller, J. & Westphal, F. Synthesis and functionalisation of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. *International Journal of Hyperthermia* **29**, 777-789 (2013).
177. Andra, W., d'Ambly, C.G., Hergt, R., Hilger, I. & Kaiser, W.A. Temperature distribution as function of time around a small spherical heat source of local magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **194**, 197-203 (1999).

178. Dutz, S. & Hergt, R. Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy. *International Journal of Hyperthermia* **29**, 790-800 (2013).
179. Jordan, A., Maier-Hauff, K., Wust, P., Rau, B. & Johannsen, M. Thermotherapie mit magnetischen Nanopartikeln. *Onkologie* **13**, 894-902 (2007).
180. Gossuin, Y., Gillis, P., Hocq, A., Vuong, Q.L. & Roch, A. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **1**, 299-310 (2009).
181. Gleich, B. & Weizenecker, R. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature* **435**, 1214-1217 (2005).
182. Weizenecker, J., Gleich, B., Rahmer, J., Dahnke, H. & Borgert, J. Three-dimensional real-time in vivo magnetic particle imaging. *Physics in Medicine and Biology* **54**, L1-L10 (2009).
183. Biederer, S. et al. Magnetization response spectroscopy of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging. *Journal of Physics D-Applied Physics* **42** (2009).
184. Rahmer, J., Weizenecker, J., Gleich, B. & Borgert, J. Signal encoding in magnetic particle imaging: properties of the system function. *BMC medical imaging* **9**, 4-4 (2009).
185. Ferguson, R.M., Minard, K.R., Khandhar, A.P. & Krishnan, K.M. Optimizing magnetite nanoparticles for mass sensitivity in magnetic particle imaging. *Medical Physics* **38**, 1619-1626 (2011).
186. Eberbeck, D., Wiekhorst, F., Wagner, S. & Trahms, L. How the size distribution of magnetic nanoparticles determines their magnetic particle imaging performance. *Applied Physics Letters* **98** (2011).
187. Gleich, B. Method and apparatus for improved determination of spatial non-agglomerated magnetic particle distribution in an area of examination. *Patent*, WO2004091398 A2 (2004).
188. Schärftl, W. Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions (Springer, 2007).
189. Tieke, B. Makromolekulare Chemie: Eine Einführung (Wiley-VCH, 2005).
190. Rausch, K., Reuter, A., Fischer, K. & Schmidt, M. Evaluation of Nanoparticle Aggregation in Human Blood Serum. *Biomacromolecules* **11**, 2836-2839 (2010).
191. Malvern Instruments Ltd., Zetasizer Nano Series User Manuel. (2004).
192. Lottspeich, F. & Engels, J.W. Bioanalytik (Elsevier, München, 2006).
193. Nygren, P. et al. Detection of tumor-specific cytotoxic drug activity in-vitro using the fluorometric microculture cytotoxicity assay and primary cultures of tumor-cells from patients. *International Journal of Cancer* **56**, 715-720 (1994).
194. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63 (1983).
195. Blokzijl, W. & Engberts, J.B.F.N. Hydrophobic Effects. Opinions and Facts. *Angewandte Chemie International Edition in English* **32**, 1545-1579 (1993).

196. Southall, N.T., Dill, K.A. & Haymet, A.D.J. A view of the hydrophobic effect. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 521-533 (2002).
197. Rheingans, O. Nanopartikel durch Strukturfixierung mizellarer Assoziate aus amphiphilen, endgruppenfunktionalisierten Diblockcopolymeren, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. (2000).
198. Won, Y.Y., Brannan, A.K., Davis, H.T. & Bates, F.S. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) of micelles and vesicles formed in water by poly(ethylene oxide)-based block copolymers. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 3354-3364 (2002).
199. Kelley, E.G., Smart, T.P., Jackson, A.J., Sullivan, M.O. & Epps, T.H., III. Structural changes in block copolymer micelles induced by cosolvent mixtures. *Soft Matter* **7**, 7094-7102 (2011).
200. Riegel, I.C., Samios, D., Petzhold, C.L. & Eisenberg, A. Self-assembly of amphiphilic di and triblock copolymers of styrene and quaternized 5-(N,N-diethylamino) isoprene in selective solvents. *Polymer* **44**, 2117-2128 (2003).
201. Müller, W. Hydrophobe und hydrophile Beladung polymerer Vesikel. *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. (2009).
202. Bermudez, H., Brannan, A.K., Hammer, D.A., Bates, F.S. & Discher, D.E. Molecular weight dependence of polymersome membrane structure, elasticity, and stability. *Macromolecules* **35**, 8203 (2002).
203. Pispas, S. & Hadjichristidis, N. Aggregation behavior of poly(butadiene-*b*-ethylene oxide) block copolymers in dilute aqueous solutions: Effect of concentration, temperature, ionic strength, and type of surfactant. *Langmuir* **19**, 48-54 (2003).
204. Safran, S.A. Statistical thermodynamics of soft surfaces. *Surface Science* **500**, 127-146 (2002).
205. Wilcoxon, J. & Schurr, J.M. Dynamic light-scattering from thin rigid rods - anisotropy of translational diffusion of tobacco mosaic-virus. *Biopolymers* **22**, 849-867 (1983).
206. Santos, N.C. & Castanho, M. Teaching light scattering spectroscopy: The dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophysical Journal* **71**, 1641-1650 (1996).
207. Lonetti, B. et al. Full Characterization of PB-PEO Wormlike Micelles at Varying Solvent Selectivity. *Macromolecules* **44**, 3583-3593 (2011).
208. Jiang, X.P., Ortiz, C. & Hammond, P.T. Exploring the rules for selective deposition: Interactions of model polyamines on acid and oligoethylene oxide surfaces. *Langmuir* **18**, 1131-1143 (2002).
209. Schmidt, M. & Brown, W. *Dynamic Light Scattering* (Clarendon Press, Oxford, 1993).
210. Bantle, S., Schmidt, M. & Burchard, W. Simultaneous static and dynamic light scattering. *Macromolecules* **15**, 1604-1609 (1982).
211. Won, Y.-Y., Brannan, A.K., Davis, H.T. & Bates, F.S. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) of Micelles and Vesicles Formed in Water by

- Poly(ethylene oxide)-Based Block Copolymers. *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 3354-3364 (2002).
212. Almgren, M., Brown, W. & Hvidt, S. Self-aggregation and phase-behavior of poly(ethylene oxide) poly(propylene oxide) poly(ethylene oxide) block-copolymers in aqueous-solution. *Colloid and Polymer Science* **273**, 2-15 (1995).
213. Schick, M.J. Nonionic Surfactants: Physical Chemistry (Marcel Dekker, New York, 1987).
214. Won, Y.Y., Davis, H.T. & Bates, F.S. Molecular exchange in PEO-PB micelles in water. *Macromolecules* **36**, 953-955 (2003).
215. Walther, A. & Mueller, A.H.E. Formation of hydrophobic bridges between multicompart ment micelles of miktoarm star terpolymers in water. *Chemical Communications*, 1127-1129 (2009).
216. Grzesiek, S. & Dencher, N.A. Dependency of delta-pH-relaxation across vesicular membranes on the buffering power of bulk solutions and lipids. *Biophysical Journal* **50**, 265-276 (1986).
217. Discher, B.M. et al. Cross-linked polymersome membranes: Vesicles with broadly adjustable properties. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 2848-2854 (2002).
218. Lim, S.K., De Hoog, H.-P., Parikh, A.N., Nallani, M. & Liedberg, B. Hybrid, Nanoscale Phospholipid/Block Copolymer Vesicles. *Polymers* **5**, 1102-1114 (2013).
219. Sanson, C. et al. Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy. *Acs Nano* **5**, 1122-1140 (2011).
220. Hickey, R.J., Haynes, A.S., Kikkawa, J.M. & Park, S.-J. Controlling the Self-Assembly Structure of Magnetic Nanoparticles and Amphiphilic Block-Copolymers: From Micelles to Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 1517-1525 (2011).
221. Hönnscheidt, C., Girod, M., Thünemann, A. & Maskos, M. in 7th International Conference on Biomedical Applications of Nanotechnology (Berlin, Germany, 2010).
222. Inglis, D.W., Riehn, R., Austin, R.H. & Sturm, J.C. Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation. *Applied Physics Letters* **85**, 5093 (2004).
223. Reichert, S. et al. Size-Dependant Cellular Uptake of Dendritic Polyglycerol. *Small* **7**, 820-829 (2011).
224. Florez, L. et al. How Shape Influences Uptake: Interactions of Anisotropic Polymer Nanoparticles and Human Mesenchymal Stem Cells. *Small* **8**, 2222-2230 (2012).
225. Schrade, A., Mailander, V., Ritz, S., Landfester, K. & Ziener, U. Surface Roughness and Charge Influence the Uptake of Nanoparticles: Fluorescently Labeled Pickering-Type Versus Surfactant-Stabilized Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience* **12**, 1459-1471 (2012).
226. Kasper, J. et al. Interactions of silica nanoparticles with lung epithelial cells and the association to flotillins. *Archives of Toxicology* **87**, 1053-1065 (2013).

227. Kisin, E.R. et al. Genotoxicity of carbon nanofibers: Are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? *Toxicology and Applied Pharmacology* **252**, 1-10 (2011).
228. Poland, C.A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology* **3**, 423-428 (2008).
229. Cai, S.S., Vijayan, K., Cheng, D., Lima, E.M. & Discher, D.E. Micelles of different morphologies - Advantages of worm-like filomicelles of PEO-PCL in paclitaxel delivery. *Pharmaceutical Research* **24**, 2099-2109 (2007).
230. Geng, Y. et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nature Nanotechnology* **2**, 249-255 (2007).
231. Christian, D.A. et al. Flexible Filaments for in Vivo Imaging and Delivery: Persistent Circulation of Filomicelles Opens the Dosage Window for Sustained Tumor Shrinkage. *Molecular Pharmaceutics* **6**, 1343-1352 (2009).
232. Cabral, H. & Kataoka, K. Multifunctional nanoassemblies of block copolymers for future cancer therapy. *Science and Technology of Advanced Materials* **11** (2010).
233. Zhang, K., Fang, H.F., Chen, Z.Y., Taylor, J.S.A. & Wooley, K.L. Shape effects of nanoparticles conjugated with cell-penetrating peptides (HIV Tat PTD) on CHO cell uptake. *Bioconjugate Chemistry* **19**, 1880-1887 (2008).
234. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* **377**, 159-169 (2004).
235. Venkataraman, S. et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 1228-1246 (2011).
236. Canton, I. & Battaglia, G. Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews* **41**, 2718-2739 (2012).
237. Chithrani, B.D. & Chan, W.C.W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters* **7**, 1542-1550 (2007).
238. Bjorling, M., Karlstrom, G. & Linse, P. Conformational adaption of poly(ethylene oxide) - a C-13 NMR-study. *Journal of Physical Chemistry* **95**, 6706-6709 (1991).
239. Bjorling, M., Linse, P. & Karlstrom, G. Distribution of segments for terminally attached poly(ethylene oxide) chains. *Journal of Physical Chemistry* **94**, 471-481 (1990).
240. Oesterhelt, F., Rief, M. & Gaub, H.E. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water. *New Journal of Physics* **1**, 6.1-6.11 (1999).
241. Oelmeier, S.A., Dismer, F. & Hubbuch, J. Molecular dynamics simulations on aqueous two-phase systems - Single PEG-molecules in solution. *Bmc Biophysics* **5** (2012).
242. Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G.M. & Laibinis, P.E. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on

- gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 426-436 (1998).
243. Chithrani, B.D., Ghazani, A.A. & Chan, W.C.W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* **6**, 662-668 (2006).
244. Jiang, W., Lai, K.L., Wu, Y. & Gu, Z.W. Protein corona on magnetite nanoparticles and internalization of nanoparticle-protein complexes into healthy and cancer cells. *Archives of Pharmacal Research* **37**, 129-141 (2014).
245. Yan, Y. et al. Differential Roles of the Protein Corona in the Cellular Uptake of Nanoporous Polymer Particles by Monocyte and Macrophage Cell Lines. *Acs Nano* **7**, 10960-10970 (2013).
246. Panyam, J. & Labhasetwar, V. Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharmaceutical Research* **20**, 212-220 (2003).
247. Cao, B.H. & Kim, M.W. Molecular-weight dependence of the surface-tension of aqueous poly(ethylene oxide) solutions. *Faraday Discussions* **98**, 245-252 (1994).
248. Saeki, S., Kuwahara, N., Nakata, M. & Kaneko, M. Upper and lower critical solution temperature in poly(ethylene glycol) solutions. *Polymer* **17**, 685-689 (1976).
249. Efremova, N.V., Sheth, S.R. & Leckband, D.E. Protein-induced changes in poly(ethylene glycol) brushes: Molecular weight and temperature dependence. *Langmuir* **17**, 7628-7636 (2001).
250. Currie, E.P.K., Van der Gucht, J., Borisov, O.V. & Stuart, M.A.C. Stuffed brushes: theory and experiment. *Pure and Applied Chemistry* **71**, 1227-1241 (1999).
251. Bleul, R. et al. Probing Polymersome-Protein and -Cell Interactions: Influence of Different End-Groups and Environments. *Macromolecular Symposia* **309-310**, 134-140 (2011).
252. Mortensen, N.P. et al. Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale* **5**, 6372-6380 (2013).
253. Rocker, C., Potzl, M., Zhang, F., Parak, W.J. & Nienhaus, G.U. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **4**, 577-580 (2009).
254. Ehrenberg, M.S., Friedman, A.E., Finkelstein, J.N., Oberdoerster, G. & McGrath, J.L. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials* **30**, 603-610 (2009).
255. Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W. & Seal, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* **28**, 4600-4607 (2007).
256. Baier, G. et al. BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake. *Macromolecular Bioscience* **11**, 628-638 (2011).

257. Photos, P.J., Bacakova, L., Discher, B., Bates, F.S. & Discher, D.E. Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight. *Journal of Controlled Release* **90**, 323-334 (2003).
258. Alexandridis, P., Holzwarth, J.F. & Hatton, T.A. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous-solutions - Thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* **27**, 2414-2425 (1994).
259. Svensson, B., Olsson, U. & Alexandridis, P. Self-assembly of block copolymers in selective solvents: Influence of relative block size on phase behavior. *Langmuir* **16**, 6839-6846 (2000).
260. Bryskhe, K., Schillen, K., Olsson, U., Yaghmur, A. & Glatter, O. Formation of internally nanostructured triblock copolymer particles. *Langmuir* **21**, 8597-8600 (2005).
261. Noolandi, J., Shi, A.C. & Linse, P. Theory of phase behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules* **29**, 5907-5919 (1996).
262. Svensson, M., Alexandridis, P. & Linse, P. Modeling of the phase behavior in ternary triblock copolymer/water/oil systems. *Macromolecules* **32**, 5435-5443 (1999).
263. Foster, T., Dorfman, K.D. & Davis, H.T. Rapid Ejection of Giant Pluronic L121 Vesicles from Spreading Double Emulsion Droplets†. *Langmuir* **26**, 9666-9672 (2010).
264. Brown, J.C., Pusey, P.N. & Dietz, R. Photon correlation study of polydisperse samples of polystyrene in cyclohexane. *Journal of Chemical Physics* **62**, 1136-1144 (1975).
265. Bealle, G. et al. Ultra Magnetic Liposomes for MR Imaging, Targeting, and Hyperthermia. *Langmuir* **28**, 11843-11851 (2012).
266. Bleul, R. et al. Continuously manufactured magnetic polymersomes - a versatile tool (not only) for targeted cancer therapy. *Nanoscale* **5**, 11385-11393 (2013).
267. Lee, E.S. et al. Binary mixing of micelles using Pluronics for a nano-sized drug delivery system. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **82**, 190-195 (2011).
268. Zhou, Z.K. & Chu, B. Light-scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene-oxide and propylene-oxide in aqueous-solution. *Journal of Colloid and Interface Science* **126**, 171-180 (1988).
269. Almgren, M. et al. Static and dynamic properties of a (PEO-PPO-PEO) block copolymer in aqueous-solution. *Journal of Colloid and Interface Science* **151**, 157-165 (1992).
270. Warner, D.L. & Burke, T.G. Simple and versatile high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of the lactone and carboxylate forms of camptothecin anticancer drugs. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **691**, 161-171 (1997).
271. Cortesi, R., Esposito, E., Maietti, A., Menegatti, E. & Nastruzzi, C. Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics* **159**, 95-103 (1997).

272. Bleul, R., Thiermann, R., Saatchi, K., Häfeli, U.O. & Maskos, M. Multifunctional nanocarriers for biomedical applications. *SPIE Proceedings*, 85951N-85951N (2013).
273. Markwalder, R. & Reubi, J.C. Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Res* **59**, 1152-1159 (1999).
274. Reubi, J.C. & Maecke, H.R. Peptide-Based Probes for Cancer Imaging. *Journal of Nuclear Medicine* **49**, 1735-1738 (2008).
275. Chen, X. et al. microPET and Autoradiographic Imaging of GRP Receptor Expression with ⁶⁴Cu-DOTA-[Lys³]Bombesin in Human Prostate Adenocarcinoma Xenografts. *Journal of Nuclear Medicine* **45**, 1390-1397 (2004).
276. Na, H.B., Song, I.C. & Hyeon, T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Advanced Materials* **21**, 2133-2148 (2009).
277. Bartolomeo, M.P. & Maisano, F. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *Journal of biomolecular techniques : JBT* **17**, 131-7 (2006).

8 Verzeichnis erfolgter Publikationen

Zeitschriftenartikel

Bleul, R., Thiermann, R., Marten, G.U., House, M.J., St. Pierre, T.G., Häfeli, U.O., Maskos, M. Continuously Manufactured Magnetic Polymersomes – A Versatile Tool (Not Only) For Targeted Cancer Therapy, *Nanoscale*, 5, 11385–11393 (2013).

Bleul, R., Thiermann, R., Saatchi, K., Häfeli, U.O., Maskos, M.; Multifunctional nanocarriers for biomedical applications, *Proc. of SPIE*, 8595, 85951N-1-9 (2013).

Bleul, R., Bachran, D., Thiermann, R., Bertin, A., Fuchs, H., Maskos, M.; Probing Polymersome-Protein and -Cell Interactions: Influence of different end-groups and environments, *Macromolecular Symposia*, 309-310(1), 134–140 (2011).

Buchkapitel

Bleul, R., Maskos, M.; Polymersomes and their biological implications. In: Bio- and Bioinspired Naomaterials, Wiley-VCH, 2014, angenommen.

Konferenz-Beiträge

Bleul, R., Thiermann, R., Marten, G.U., House, M.J., St. Pierre, T.G., Häfeli, U.O., Maskos, M. Continuously Manufactured Magnetic Polymersomes – A Versatile Tool (Not Only) For Targeted Cancer Therapy, EMRS, 27.–31. Mai 2013, Straßburg, Frankreich, **Vortrag**.

Bleul, R., Bachran, D., Thiermann, R., Bertin, A., Fuchs, H., Maskos, M. Magnetic Polymersomes – Multifunctional Carriers for Biomedical Applications, Magnetic Carrier Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA, 21.–27. Mai 2012, **Posterpräsentation, ausgezeichnet mit dem Posterpreis**.

Bertin, A., Garchow, T., **Bleul, R.**, Pichon, B., Hartmann, J. Efficient one-pot synthesis of polymer-coated USPIOs for image-guided nanoparticle-mediated cancer gene therapy, Magnetic Carrier Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA, 21.–27. Mai 2012, **Posterpräsentation**.

Bleul, R., Bachran, D., Thiermann, R., Bertin, A., Fuchs, H., Maskos, M. Functional Polymersomes – Potential Multi-Tool for Targeted Cancer Therapy, NanoBiomed, Frankfurt/Main, 6. – 7. März 2012, **Posterpräsentation**

Bleul, R., Bertin, A., Maskos, M., Braun, U. Polymers in Biomedicine: Molecular Structure and Material Characteristics, Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien, Gießen, 10. – 12. November 2011, **Posterpräsentation.**

Bleul, R., Thiermann, R., Bachran, D., Maskos, M. Probing polymersome-protein and -cell interactions: structural characterization, quantitative analysis and *in vitro* investigations, Advanced Functional Polymers for Medicine, University of Twente, Enschede, Niederlande. 15. – 17. Juni 2011, **Posterpräsentation**

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACUPA	(S,S-2-[3-[5-amino-1-carboxypentyl]-ureido]-Pentandisäure
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAC	kritische Aggregationstemperatur (<i>Critical Aggregation Temperature</i>)
CFD	Numerische Strömungsmechanik (<i>Computational Fluid Dynamics</i>)
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
CPMM	Raupenmikromischer (<i>Caterpillar Micromixer</i>)
CT	Computertomographie
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPD	Dissipative Partikel-Dynamik
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR-Effekt	<i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFP	Feldfreier Punkt
FID	freier Induktionsabfall <i>Free (Indication Decay)</i>
Gew.-%	Gewichtsprozent
Gl.	Gleichung

GRP	<i>Gastrin Releasing Peptide</i>
GRPR	<i>Gastrin Releasing Peptide Receptor</i>
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicles</i>
HER 2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LCST	untere kritische Lösungstemperatur (<i>Lower Critical Solution Temperature</i>)
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectroscopy</i>
MD	Molekulardynamik
MDR	Multi-Drug-Resistenz
MPI	<i>Magnetic Particle Imaging</i>
MPS	Mononukleäre Phagozytensystem
MPS	<i>Magnetic Particle Spectroscopy</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolimbromid
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NNI	<i>National Nanotechnology Initiative</i>
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
PB	Polybutadien
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphat Buffered Saline</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PET	Positronen-Emissionstomographie
PETA	Pentaerythritoltetraacrylat
PLA	Poly(D,L-Lactid), (<i>Poly(D,L-lactic acid)</i>)
PPO	Polypropylenoxid
PSMA	Prostata-spezifisches Membran-Antigen
RES	Retikuloendothelial-System
SAR	Spezifische Absorptionsrate
SAR-Prinzip	<i>Split-and-recombine-Prinzip</i>

SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt (<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>)
SDBS	Natriumdodecylbenzolsulfonat
siRNA	<i>Short interfering ribonucleic acid</i>
SLS	Statische Lichtstreuung
SPARC	Osteonectin, (<i>Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine</i>)
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie, (<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>)
SPIO	Superparamagnetisches Eisenoxid, (<i>Superparamagnetic iron oxide</i>)
SSL	Grenzbereich starker Segregation (<i>Strong Segregation Limit</i>)
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
Vd	Verteilungsvolumen (<i>Volume of Distribution</i>)
WSL	Grenzbereich schwacher Segregation (<i>Weak Segregation Limit</i>)

Allgemeine Symbole und Formelzeichen

c	Konzentration
T	Absolute Temperatur
η	Viskosität
k_B	Boltzmann-Konstante
r	Radius
d	Durchmesser

Formelzeichen zur Theorie der Selbstorganisation von Amphiphilen

a_0	Fläche, die durch hydrophile Kopfgruppe eingenommen wird
l_c	Konturlänge des Moleküls
P_c	Kritischer Packungsparameter
v	Volumen des hydrophoben Volumens
N	Polymerisationsgrad
γ	Linienspannung
κ	Biegemodul
χ	Flory-Huggins-Interaktionsparameter

Formelzeichen zur Theorie des Magnetismus

B	Magnetische Induktion oder Flussdichte
C	Wärmekapazität
f	Frequenz
H	Magnetische Feldstärke
h	Plancksches Wirkungsquantum
H _c	Koerzitivfeldstärke
K	Anisotropie-Konstante
M	Magnetisierung
m	Magnetisches Moment
M _R	Remanente Magnetisierung
M _s	Sättigungsmagnetisierung
r _{1,2}	Relaxivitätsrate
R _{1,2}	Relaxivität
T _{1,2}	Relaxationszeit
T _B	Blockingtemperatur
V _c	Volumen des magnetischen Kerns
γ	Gyromatisches Verhältnis
λ	Thermische Leitfähigkeit
μ ₀	Magnetische Feldkonstante (Permeabilität des Vakuums)
τ _B	Brown Relaxationszeit
τ _{eff}	Effektive Zeitkonstante
τ _N	Neel Relaxationszeit
χ	Magnetische Suszeptibilität
ω ₀	Larmor-Frequenz

Formelzeichen zur Theorie der Lichtstreuung

a	Wichtungsfaktor
A ₂	2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks
b ² , K	Streukontrast
D _{app}	Apparenter Diffusionskoeffizient
<D> _z	z-Mittel des Diffusionskoeffizient

dn_D/dc	Brechungsindexinkrement
D_t	Translatationaler Diffusionskoeffizient
I_0	Intensität des Primärstrahls
I_s	Streuintensität
M_n	Zahlenmittel der Molmasse
M_w	Gewichtsmittel der Molmasse
N_A	Avogadro-Konstante
n_D	Brechungsindex
$P(q)$	Partikelformfaktor
q	Betrag des Streuvektors
r	Abstand des Detektors von der Probe
R	Rayleigh-Verhältnis
$R_{g,s}$	Trägheitsradius (<i>radius of gyration</i> , Schwerpunktsradius)
R_h	Hydrodynamischer Radius
α	Polarisierbarkeit
θ	Streuwinkel
$\kappa_{1,2}$	1., 2. Kumulant
λ_0	Wellenlänge des eingehenden Strahls im Vakuum
μ_2	Maß für die Polydispersität ($\sigma_D = \mu_2^{0,5}$)
ρ	ρ -Verhältnis (R_g/R_h)
σ_D	Verteilungsfunktion des Diffusionskoeffizienten
σ_R	Partikelgrößenpolydispersität
τ	Korrelationszeit

Formelzeichen zur Theorie des Zeta-Potentials ζ

ϵ	Dielektrizitätskonstante des Mediums
κ^{-1}	Dicke der diffusen Schicht
μ	Elektrophoretische Mobilität
$f(\kappa, a)$	Henry-Funktion
r	Partikelradius

9.2 Zusätzliche Daten und Abbildungen

Ergänzungen zu Abschnitt 4.1

Tab. 9.1: Dichteabschätzung der Polymerphase für PB-PEO-Mizellen und -Vesikel in Wasser

$\langle R_h \rangle$ (nm)	V_m (m ³ /mol)	M_w (g/mol)	ρ (kg/m ³)	Morphologie
22	26,8	$1,0 \cdot 10^7$	373	Kugelmizelle
30	67,2	$2,6 \cdot 10^7$	387	Vesikel
44	191,5	$7,8 \cdot 10^7$	407	Vesikel
65	505,9	$2,4 \cdot 10^8$	474	Vesikel

$\langle R_h \rangle$ aus dynamischer Lichtstreuung.

V_m berechnet aus R_h für Mizellen, für Vesikel aus R_h und mit der Annahme einer Gesamtmembrandicke von 23 nm.

Die mittlere Dichte ρ wurde über V_m und M_w berechnet

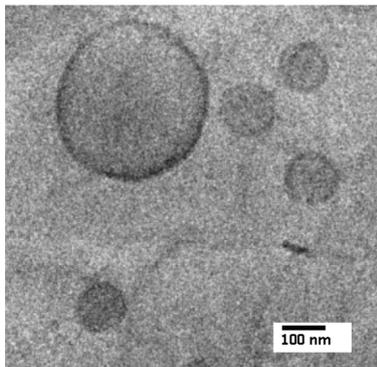


Abb. 9.1: Kryo-TEM-Aufnahme von Vesikeln aus PB₂₉-PEO₃₂-COOH bei pH 1

Ergänzungen zu Abschnitt 4.2

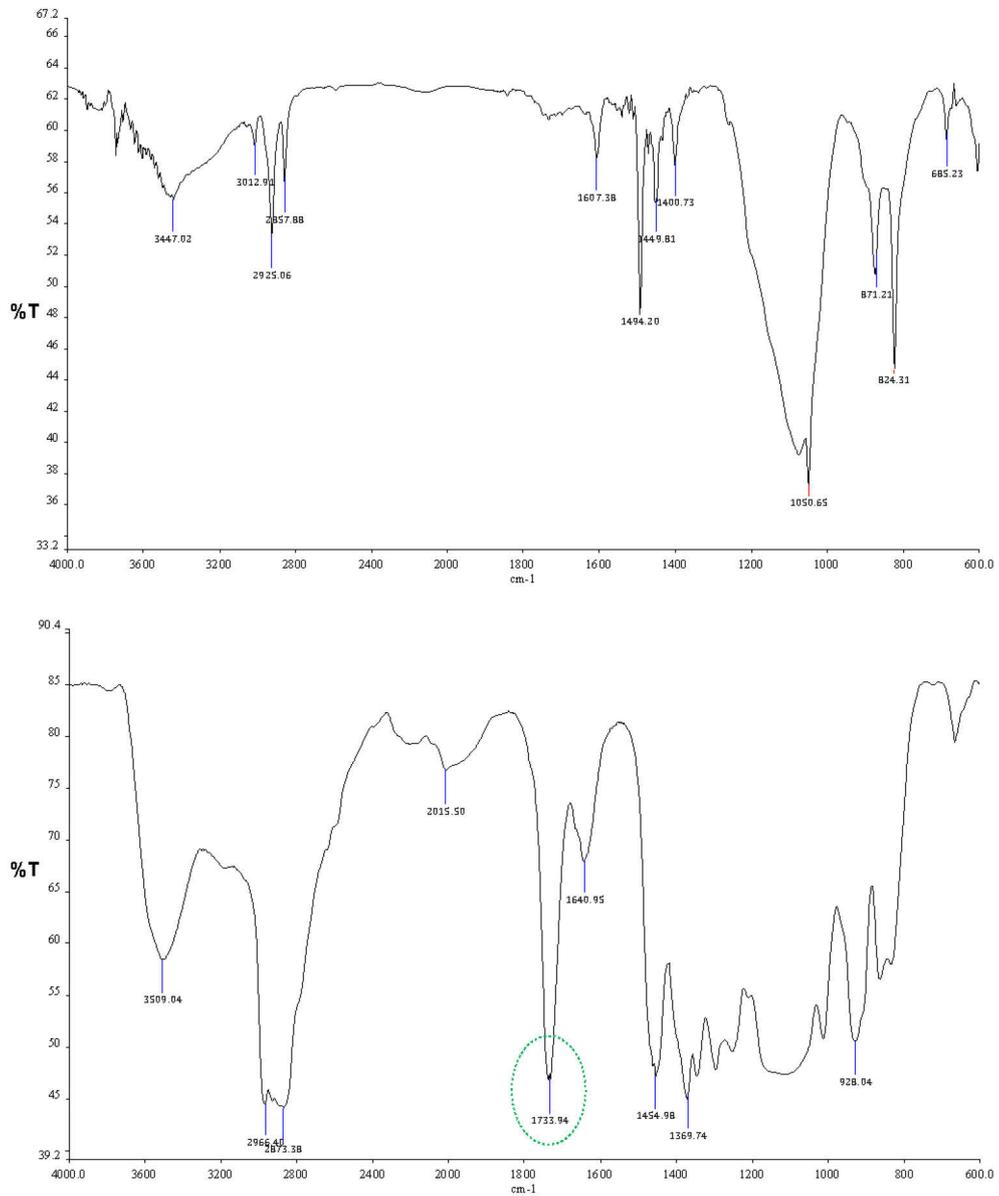


Abb. 9.2: IR-Spektren des Pluronic® L121 vor (oben) und nach der Carboxylierung (unten).

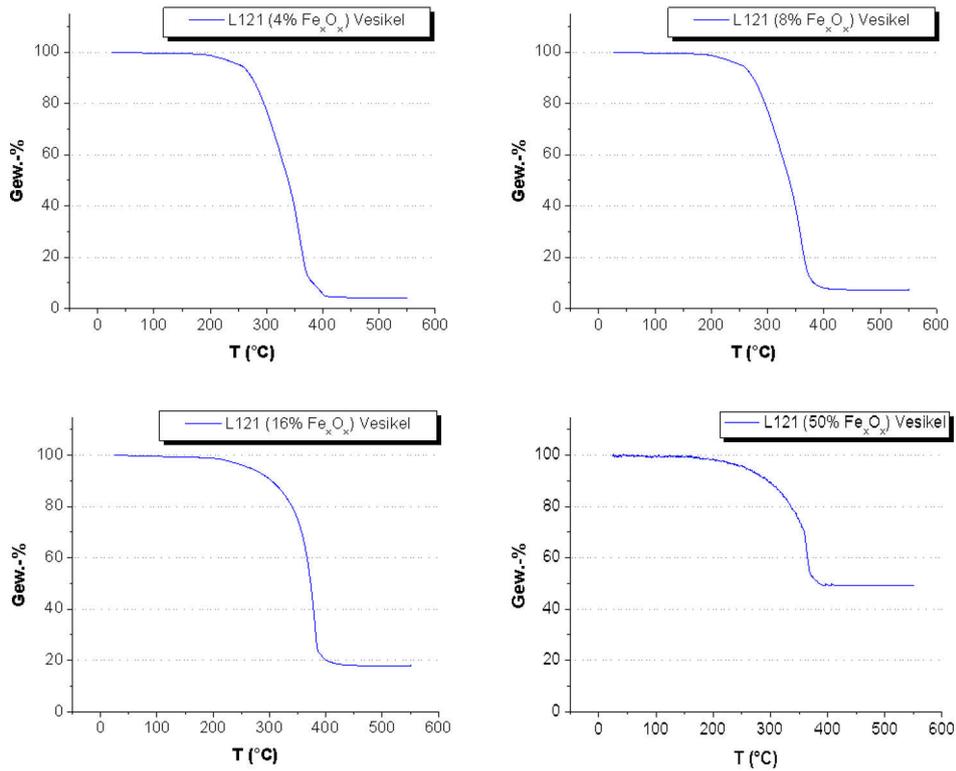


Abb. 9.3: Thermogravimetrische Analyse von magnetischen Pluronic®-L121-Vesikeln mit unterschiedlicher Beladung mit Eisenoxid-Nanopartikeln. Es wurden je ca. 10-20 mg trockene Probe für die Messung verwendet.

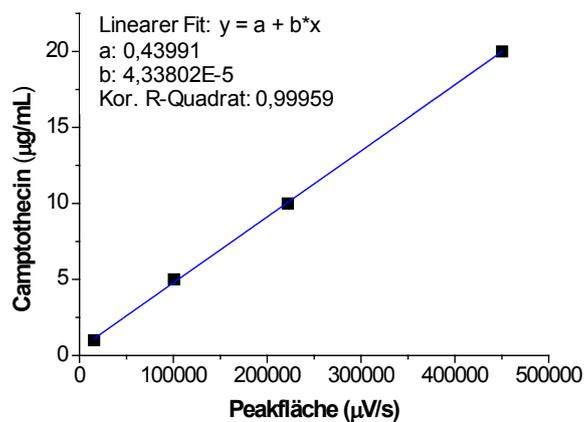


Abb. 9.4: Kalibrierung der HPLC-Analyse zur Camptothecin-Quantifizierung

Tab. 9.2: Bestimmung des Camptothecin-Gehalts von beladenen Pluronic®-L121-Polymersomen

Probe	Peakfläche (µV/s)	CPT _{HPLC-Probe} ¹ (µg/mL)	Verdünnungs- faktor	CPT _{Gesamt} (µg/mL)	CPT ² µmol/g
L121-Vesikel (CPT ¹)	19645	1,21	20	24,2	69
	19986				
	17654				
L121-Vesikel (CPT, 8% Fe _x O _y)	19645	1,30	20	26,0	75
	23876				
	21963				

¹CPT = Camptothecin, Berechnung nach Kalibrierung Abb. 9.4
²Camptothecin-Gehalt bezogen auf die Polymermasse (1 mg/mL Polymer)

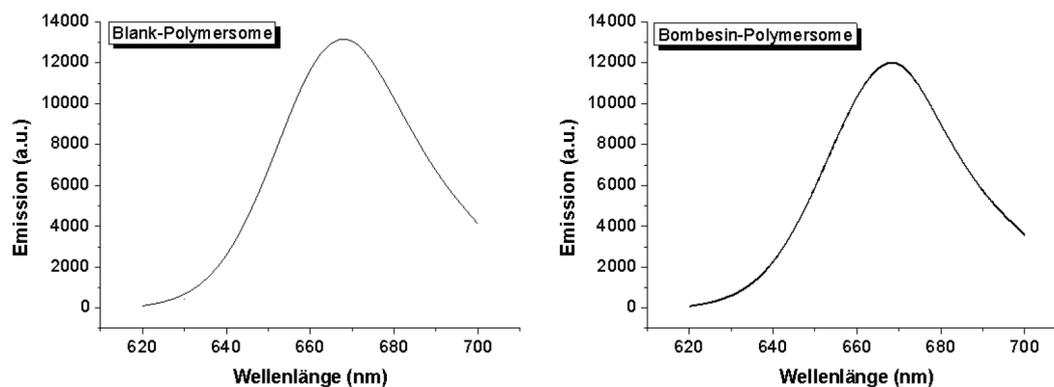


Abb. 9.5: Fluoreszenzspektren Alexa Fluor® 647-markierter L121-Vesikel. Die Polymerkonzentration betrug jeweils 0,1 mg/L. Die Anregung erfolgte bei 600 nm.

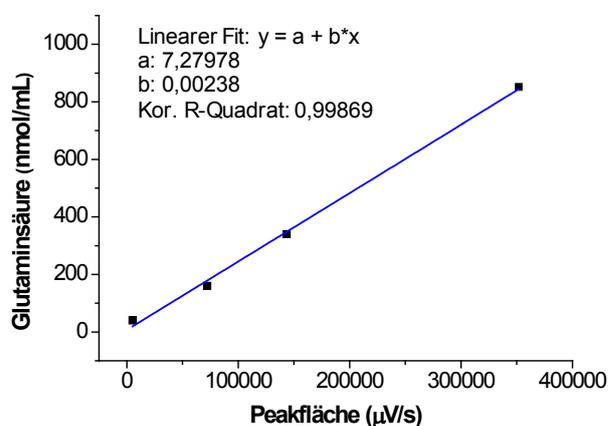


Abb. 9.6: Kalibrierung der HPLC-Glutaminsäure-Analyse zur Quantifizierung von [Lys³]-Bombesin

Tab. 9.3 Quantifizierung des [Lys³]-Bombesins auf der Polymersom-Oberfläche

Probe	Peakfläche (µV/s)	Glx _{HPLC-Probe} ¹ (nmol/mL)	Verdünnungs- faktor	Glx _{Hydrolysat} (nmol/mL)	[Lys ³]-Bombesin ² nmol/mg
Bombesin- Polymersome	7237 11235 9084	29,2	30	876	49
Blank-Polymersome	unterhalb des LOD*		30	–	–

¹Glx = Glutaminsäure, Berechnung nach Kalibrierung Abb. 9.6

²[Lys³]-Bombesin-Konzentration bezogen auf die Polymerkonzentration (3 mol Glx pro mol [Lys³]-Bombesin-Hydrolysat, 6 mg/mL Polymer)

*LOD = Limit of Detection