



Kristina Sabljo (Autor)

## **Anorganisch-organische Hybridnanopartikel mit theranostischen Eigenschaften**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8699>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# 1 Einleitung

Nanomaterialien haben in der Medizin zu enormem Fortschritt bei der gezielten Wirkstofffreisetzung und für die multimodale Diagnostik geführt. Ein aktuelles Beispiel ist der COVID-19-Impfstoff *Comirnaty*<sup>®</sup> der Firma *BioNTech*. Ein wesentlicher Bestandteil dieses Impfstoffes sind Lipidnanopartikel (LNP), die eine *in-vivo*-Verabreichung der empfindlichen mRNA (*engl. Messenger Ribonucleic Acid*) ermöglichen. Einerseits verhindern LNPs den Abbau der Nukleinsäure durch Enzyme (Ribonukleasen) im extrazellulären Raum und andererseits unterstützen diese die Aufnahme der mRNA in die Zellen.<sup>[1]</sup>

Ein ausschlaggebender Aspekt für die medizinische Anwendung ist die Größe der Nanopartikel, die per Definition im Größenbereich von 1-100 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9}$ ) liegt.<sup>[2]</sup> Da diese Größenordnung der von biologischen Makromolekülen ähnelt, werden Nanopartikel von Zellen (10-100  $\mu\text{m}$ ) aufgenommen und können somit zur gezielten Wirkstoffabgabe eingesetzt werden.<sup>[3]</sup> Die Entwicklung nanopartikulärer Wirkstofftransporter (*engl. Drug Delivery Systems*) soll die derzeitigen Einschränkungen wie systemische Exposition und dosislimitierende Toxizität der konventionellen Therapie, vor allem in der Krebstherapie, überwinden.<sup>[4]</sup> Neben der gezielten Freisetzung ermöglichen Wirkstofftransporter den Schutz vor enzymatischem Abbau und verlängerte Expositionszeiten, was zu einer verbesserten therapeutischen Wirksamkeit und reduzierten Nebenwirkungen führt.<sup>[5,6]</sup> Darüber hinaus können solche Wirkstofftransporter sowohl eine Kombination therapeutischer Wirkstoffe enthalten als auch vielfältige Optionen für die Detektion von bildgebenden Verfahren bieten.<sup>[7,8]</sup>

Zytostatika-beladene Nanopartikel sind die ersten von noch wenigen Wirkstofftransportern, die bereits klinische Zulassungen erhalten haben. Hierzu zählen zum Beispiel PEGyliertes liposomales Doxorubicin (*Doxil*<sup>®</sup>, *Caelyx*<sup>®</sup>), PEGyliertes liposomales Irinotecan (*Onivyde*<sup>®</sup>) oder mit Paclitaxel beladene Albumin-Nanopartikel (*AbraCane*<sup>®</sup>).<sup>[9,10]</sup> Bei diesen Systemen handelt es sich um Nanopartikel, die auf einer passiven Anreicherung basieren. Dies kann auf die pathophysiologischen Eigenschaften von Tumoren und ihrer Umgebung zurückgeführt werden.<sup>[11]</sup> Die schnelle Proliferation von Tumorgewebe erfordert die Ausbildung eines vaskulären Systems zur Versorgung dieses



Gewebes. Daraus resultiert, dass die Blutgefäße sogenannte Fenestrierungen ausbilden, durch welche auch Makromoleküle und Nanopartikel in das Gewebe eindringen können. Hinzu kommt zudem ein mangelhaftes Lymphsystem, wodurch der Abtransport der Nanopartikel aus dem Gewebe erschwert wird, was eine lokale Anreicherung zur Folge hat. Dieser Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention wird auch als EPR-Effekt (*engl. Enhanced Permeability and Retention*) bezeichnet.<sup>[6,11]</sup> Alternativ kann die aktive Anreicherung von Nanopartikeln über die gezielte Ansteuerung zellspezifischer Rezeptoren ermöglicht werden (*engl. Targeting*). Hierfür wird die Oberfläche von Nanopartikeln mit hochaffinen Liganden (z. B. Antikörper), die eine solche Tumorspezifität aufweisen, funktionalisiert.<sup>[6,12]</sup> Weiterhin können Nanopartikel mit Substanzen funktionalisiert werden, die in molekularer Form von Tumorzellen aufgrund ihres erhöhten Energiebedarfs zunehmend aufgenommen werden. Dazu zählen beispielsweise Albumin sowie Mono- und Polysaccharide.<sup>[13,14]</sup>

Derzeit klinisch zugelassene Wirkstofftransporter bestehen hauptsächlich aus lipidbasierten Nanoträgern (Liposomen, Mizellen) oder polymeren Nanopartikeln, wie bereits die zuvor genannten Beispiele belegen. Darüber hinaus existieren weitere Materialien wie Dendrimere, Kohlenstoffnanoröhrchen sowie Metall- (z. B. Gold) und Metalloxidnanopartikel (z. B.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ ), die im Fokus der Forschung stehen.<sup>[15-17]</sup> Hierbei werden die Wirkstoffe entweder innerhalb der Nanopartikel eingeschlossen oder auf der Nanopartikeloberfläche immobilisiert.<sup>[18]</sup> Neben der Verabreichung von Wirkstoffen wurden diese Nanopartikel auch zur Bildgebung und photothermischen Ablation von Tumoren eingesetzt.<sup>[9,19]</sup> Für eine klinische Translation müssen Wirkstofftransportsysteme biokompatibel und biologisch abbaubar sein sowie eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs ermöglichen.<sup>[6]</sup> Ein weiterer wichtiger Aspekt stellt eine hohe Wirkstoffbeladung dar, die durch die Art des Nanomaterials bestimmt wird.<sup>[20]</sup> Die zuvor genannten Transportsysteme basieren auf Trägermaterialien, für die jedoch nur ein geringer Wirkstoffbeladungsgrad (in der Regel  $<10$  Gew.-%) erreicht wird.<sup>[18,20]</sup> Um die erforderliche Wirkstoffdosis am Zielort zu verabreichen, müssen große Mengen an Trägermaterial verwendet werden, was wiederum zu einer zusätzlichen Belastung durch Abbau, Metabolisierung und Ausscheidung dieser Trägermaterialien führt und somit die klinische Zulassung erschwert.

Vor diesem Hintergrund wurde in unserer Arbeitsgruppe um *Prof. Feldmann* das Materialkonzept der anorganisch-organischen Hybridnanopartikel entwickelt.<sup>[21]</sup> Dabei

handelt es sich um Nanopartikel mit einer salzartigen Zusammensetzung aus einem anorganischen Kation und einem organischen Anion. Besonders geeignet sind Zirkoniumphosphat-basierte Hybridnanopartikel, die sich formal aus einem Zirkonylkation ( $[\text{ZrO}]^{2+}$ ) und einem funktionellen Organophosphatanion ( $[\text{RFunktionOPO}_3]^{-}$ ) zusammensetzen.<sup>[22-24]</sup> Als funktionelle Anionen wurden bereits eine Vielzahl von Wirkstoffen aus verschiedenen Wirkstoffklassen (Zytostatika, Antibiotika, Antiinflammatorika, Virostatika) oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, wodurch therapeutische oder bildgebende Eigenschaften erfolgreich eingeführt werden konnten.<sup>[25,24]</sup> Diese Nanopartikel zeichnen sich durch eine wasserbasierte Synthese, geringe Materialkomplexität sowie hohe Wirkstoffbeladung (70-90 Gew.-%) aus. Nach Etablierung des Konzepts der Phosphat-basierten Hybridnanopartikel wurden auch Hybridnanopartikel entwickelt, die Anionen mit Sulfonat- ( $[\text{RFunktionSO}_3]^{-}$ ) und Carboxylat-Funktionalitäten ( $[\text{RFunktionCOO}]^{-}$ ) enthalten.<sup>[26-28]</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch das paramagnetische Gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) als Kation eingesetzt werden kann.<sup>[28,29]</sup> Dadurch kann nicht nur über das organische Anion, sondern auch über das Kation, eine Funktionalität eingeführt werden, die es ermöglicht Hybridnanopartikel als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) einzusetzen.<sup>[30,29]</sup> Es ergibt sich eine einzigartige Modularität der Hybridnanopartikel, die ein breites biomedizinisches Anwendungsspektrum erschließen. Die bisher in der Arbeitsgruppe hergestellten Hybridnanopartikel sind in ein dichtes Kooperationsnetzwerk eingebunden, an welchem Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler aus Biologie und Medizin beteiligt sind. Darauf begründet sich häufig auch die getroffene Wirkstoffauswahl. Diese wirkstoffhaltigen Hybridnanopartikel zeigten bereits sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* vielversprechende therapeutische Wirksamkeit.<sup>[21]</sup>

Kernziel dieser Arbeit ist die Synthese und Charakterisierung neuartiger anorganisch-organischer Hybridnanopartikel, die zum einen das Wirkungsspektrum erweitern und zum anderen neue Anwendungsbereiche in der Bildgebung erschließen. Dabei liegt ein Schwerpunkt in der Darstellung von Zytostatika-haltigen Hybridnanopartikeln zur Behandlung des duktales Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse (*engl. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*, PDAC). PDAC ist einer der tödlichsten Krebsarten, da es an frühzeitigen diagnostischen Markern und wirksamen Therapeutika mangelt.<sup>[31]</sup> In der Chemotherapie wird zur Erstlinienbehandlung das Nukleosidanalogen Gemcitabin (Gem) eingesetzt, welches eine 5-fach höhere Wirkung als 5-Fluoruracil (5-FU) aufweist.<sup>[32]</sup>



Aufgrund seiner schlechten Pharmakokinetik besteht jedoch Bedarf an neuen Behandlungsstrategien für eine effizientere Therapie. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit anorganisch-organische Hybridnanopartikel mit Gemcitabin als neuer Therapieansatz entwickelt. Darüber hinaus werden neue Möglichkeiten ausgelotet, um eine zellspezifische Aufnahme von Zytostatika-haltigen Hybridnanopartikeln zu fördern. Neben den therapeutischen Eigenschaften wird auch die Einführung bildgebender Eigenschaften untersucht, um Hybridnanopartikel auch für theranostische Zwecke einsetzbar zu machen.



## 2 Analytische Methoden

### 2.1 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren, mit welcher nanoskalige Proben in hoher Auflösung untersucht werden können. Unter Verwendung von beschleunigten Elektronen wird das Auflösungsvermögen von herkömmlichen Lichtmikroskopen überschritten. Dabei hängt die Auflösungsgrenze gemäß *Abbé* von der Wellenlänge des Lichts ab (Gleichung 2.1).<sup>[33]</sup>

$$2.1 \quad d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha}$$

*d*: Auflösungsgrenze;  $\lambda$ : Wellenlänge;  $n \cdot \sin \alpha$ : numerische Apertur

Die Wellenlänge von beschleunigten Elektronen ist nach *de Broglie* abhängig von deren Geschwindigkeit bzw. der angelegten Beschleunigungsspannung (Gleichung 2.2).

$$2.2 \quad \lambda = \frac{h}{m_0 \cdot v} = \frac{h}{\sqrt{2m_0 \cdot e \cdot U}}$$

$\lambda$ : Wellenlänge;  $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum;  $m_0$ : Ruhemasse;  $v$ : Geschwindigkeit;  
 $e$ : Elementarladung;  $U$ : Beschleunigungsspannung

Die verwendeten Beschleunigungsspannungen liegen typischerweise im Kilovolt-Bereich. Unter Berücksichtigung von relativistischen Effekten ergeben sich dadurch Wellenlängen im Pikometerbereich, die nach *Abbé* zu einem deutlich höheren Auflösungsvermögen führen. Allerdings wird in der Praxis das Auflösungsvermögen eines Elektronenmikroskops durch apparative Gegebenheiten begrenzt.<sup>[33,34]</sup>

Ein Elektronenmikroskop besteht typischerweise aus einer Elektronenquelle, gefolgt von einem System aus elektromagnetischen Linsen und Blenden sowie einem Probenträger. Als Elektronenquelle wird eine Feldemissionskathode verwendet, die in der Regel aus ZrO<sub>2</sub>-beschichtetem Wolfram besteht. Die Kathodenoberfläche wird durch eine Extraktorspannung einem starken, elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch Elektronen aus dem Kathodenmaterial austreten. Diese Elektronen werden durch eine angelegte Spannung auf die gewünschte Energie beschleunigt. Zur Fokussierung des Elektronenstrahls wird ein System aus elektromagnetischen Linsen eingesetzt. Dabei wird im Hochvakuum gearbeitet,

um Kollisionen zwischen Elektronen und Gasmoleküle zu vermeiden. Trifft der fokussierte Primärstrahl auf die zu untersuchende Probe, sind innerhalb der sogenannten Anregungsbirne verschiedene Wechselwirkungen möglich (Abbildung 2.1). Rückstreu- und Sekundärelektronen entstehen durch elastische bzw. inelastische Streuung und werden in bildgebenden Verfahren verwendet. Des Weiteren kann es zur Freisetzung von charakteristischer Röntgenstrahlung kommen, die in der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (*engl. Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*, EDX, Kapitel 2.1.3) zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Probenzusammensetzung herangezogen wird. Bei sehr dünnen Proben und hohe Beschleunigungsspannungen kann der Primärstrahl unter elastischer oder inelastischer Beugung durchstrahlen. Diese Elektronen werden in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet.

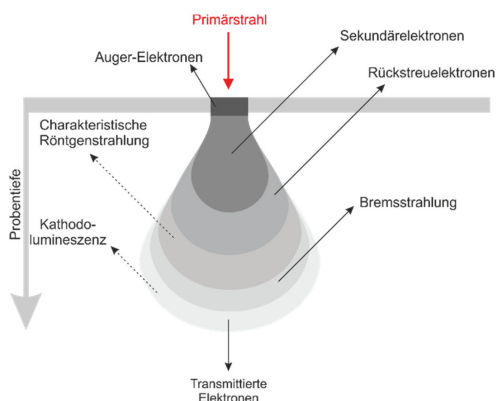


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkungen eines fokussierten Primärelektronenstrahls mit einer Probe (modifizierte Wiedergabe nach <sup>[35]</sup>).

### 2.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird ein fokussierter Elektronenstrahl durch elektromagnetische Ablenkspulen zeilenweise über eine Probe bewegt. Dabei treten Wechselwirkungen zwischen den Primärelektronen und der Probe auf. Rückstreuerelektronen (RE) entstehen durch elastische Streuung an den Atomkernen der Probe und entstammen aus tieferen Schichten der Probe. Die Streuintensität nimmt mit größeren Ordnungszahlen zu, wodurch sich ein Materialkontrast ergibt. Dagegen entstehen



Sekundärelektronen (SE) infolge von inelastischer Streuung aus der obersten Schicht der Probe und geben die Topographie der Probe wieder. Ferner wird bei Sekundärelektronen zwischen Elektronen erster Ordnung (SE1), erzeugt vom Primärstrahl, und Elektronen zweiter Ordnung (SE2), erzeugt von Rückstreuielektronen, unterschieden. Die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden überwiegend mit einem *In-Lens*-Detektor aufgenommen. Dieser sitzt oberhalb der Probe im Strahlengang und kann aufgrund seiner Anordnung selektiv SE1 detektieren. Ein weiterer Detektor, ist der seitlich der Probe angeordnete *Everhart-Thornley*-Detektor, der hauptsächlich SE2 detektiert.<sup>[34,35]</sup>

In dieser Arbeit wurde das Rasterelektronenmikroskop *Supra 40VP* der Firma *Zeiss* (Oberkochen) mit einer Feldemissionskathode aus Zirkoniumoxid auf Wolfram verwendet. Die Messungen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV und einem Arbeitsabstand von 2-4 mm durchgeführt. Zur Probenpräparation wurden verdünnte, suspendierte Proben auf Siliziumwafer, die mit Leitsilber auf Aluminiumprobenträger fixiert sind, mittels eines Ultraschallverneblers aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilungen wurden statistische Auszählungen von mindestens 100 Partikeln mithilfe des Programms *ImageJ* (Version 1.48, *Wayne Rasband*) durchgeführt.

### 2.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Im Vergleich zur REM (<30 kV) wird die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit deutlich höheren Beschleunigungsspannungen (80-400 kV) betrieben. Daraus ergeben sich niedrigere Auflösungsgrenzen, die bis zur atomaren Auflösung reichen können.

Der Aufbau eines TEM ist dem eines Lichtmikroskops sehr ähnlich (Abbildung 2.2). Über Kondensorenlinse und -blende wird ein möglichst paralleler Elektronenstrahl erzeugt und auf die Probe geleitet. Dabei können die Primärelektronen entweder die Probe ungehindert durchdringen oder an ihr gestreut werden. Die Stärke der Streuung wird durch die Ordnungszahlen der vorliegenden Elemente und die Dicke der Probe beeinflusst. Da die Bildgebung über transmittierende Elektronen erfolgt, wird die Detektion der Elektronen unterhalb des Probenträgers durchgeführt. Hierzu werden die elastisch gestreuten Elektronen durch Objektivlinsen fokussiert und anschließend mit einer Objektivblende herausgefiltert. Dadurch wird eine sogenannte Hellfeld-Abbildung (*engl. Brightfield*, BF)



erhalten. Über weitere elektromagnetische Linsen kann ein Zwischenbild erzeugt, vergrößert und schließlich auf einen Leuchtschirm oder CCD-Kamera ausgewertet werden.

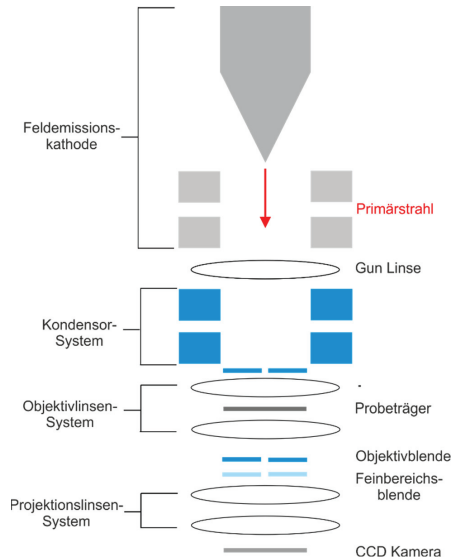


Abbildung 2.2. Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops (modifizierte Wiedergabe nach <sup>[36]</sup>).

Bei der hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (*engl. High-Resolution Transmission Electron Microscopy, HR-TEM*) können für kristalline Probe gemäß der *Bragg-Gleichung* (Gleichung 2.8) zusätzlich Beugungskontraste erhalten werden. In den entsprechenden HR-TEM-Aufnahmen werden Netzebenen beobachtet, deren Abstände mit Literaturdaten abgeglichen und Rückschluss auf die Probenzusammensetzung geben können. Außerdem können HR-TEM-Aufnahmen über eine Fourier-Transformation (FT) in ein Beugungsbild überführt werden. Die erhaltenen FT-Bilder einzelner kristalliner Partikel zeigen diskrete Reflexe, die ebenfalls eine Identifizierung der Probenzusammensetzung ermöglichen.<sup>[37]</sup>

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten TEM-Analysen wurden von *Dr. Radian Popescu* (AG Prof. Gerthsen, Laboratorium für Elektronenmikroskope, KIT) an einem *FEI Osiris* Mikroskop (*FEI*, USA) bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV bzw. einem aberrationskorrigiertem *FEI Titan<sup>3</sup>* Mikroskop (*FEI*, USA) bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV aufgenommen. Die Probenpräparation erfolgte



durch Auftragung einer verdünnten Partikelsuspension auf einem geeigneten TEM-Probenträger und anschließendes Trocknen durch Erhitzen im Vakuum bei 50 °C. Als Probenträger diente ein mit Kohlenstoff beschichteten Kupfernetzchen mit 3 mm Durchmesser der Firma *Plano* (Wetzlar). Die Auswertung der STEM-Aufnahmen erfolgte mithilfe der Software *TIA TEM Imaging and Analysis (TIA, Version 4.6)* und zur Auswertung der TEM-Aufnahmen wurde die Software *Digital Micrograph (DM, Version 2.3)* verwendet.

### 2.1.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

In der Elektronenmikroskopie wird die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) verwendet, um Probenzusammensetzungen sowohl qualitativ als auch quantitativ zu bestimmen. Dazu wird die charakteristische Röntgenstrahlung genutzt, die durch Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Probe entsteht. Die Röntgenstrahlung, die durch elastische Streuung entsteht wird als Bremsstrahlung bezeichnet und tritt als kontinuierlicher Untergrund im EDX-Spektrum auf. Durch inelastische Streuung an der Probe werden Elektronen aus kernnahen Schalen herausgeschlagen. Die entstandene Lücke wird durch Relaxation eines Elektrons aus einer höheren, energiereicheren Schale unter Abgabe eines Röntgenphotons besetzt (Abbildung 2.3). Der Betrag dieser Energie entspricht der Differenz zwischen zwei definierten, elektronischen Niveaus des Atoms und ist deshalb elementspezifisch. Dadurch können die in der Probe enthaltenen Elemente identifiziert werden. Die Zuordnung der Übergänge richtet sich nach den Schalen (K, L, M-Schale), zwischen denen der Übergang stattgefunden hat. So wird beispielsweise der Übergang eines Elektrons von der L-Schale in die K-Schale als  $K_{\alpha}$  benannt, während der Übergang von der M-Schale in die K-Schale als  $K_{\beta}$  bezeichnet wird. Eine Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Elemente ist erst ab der 3. Periode möglich, da die Energiedifferenz der elektronischen Übergänge bei leichteren Elementen zu gering ist, um sie sicher unterscheiden zu können.

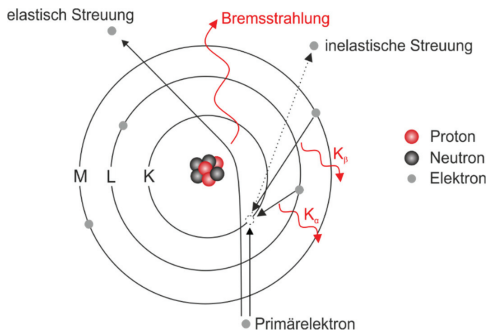


Abbildung 2.3. Schematische Darstellung der Entstehung von kontinuierlicher und charakteristischer Röntgenstrahlung (modifizierte Wiedergabe nach <sup>[38]</sup>).

EDX-Messungen können sowohl im REM als auch im TEM durchgeführt werden. Darüber hinaus ermöglicht die hohe Auflösung im TEM sowie die Verwendung dünner Proben Elementkonzentrationen auch ortsspezifisch zu bestimmen. So können beispielsweise Elementverteilungskarten (*engl. Mapping*) erstellt werden oder Elementkonzentrationen entlang von Linienprofilen (*engl. Line-Scan*) gemessen werden.

EDX-Untersuchungen erfolgten sowohl am Rasterelektronenmikroskop *Supra 40VP* (Zeiss, Oberkochen) als auch am Transmissionselektronenmikroskop *FEI Osiris* (FEI, USA). Für Messungen am *Supra 40VP* wurden pulverförmige Proben auf Kohlenstoffklebepads der Firma *Plano* (Wetzlar) fixiert, die ihrerseits auf Aluminiumprobenhalter aufgeklebt waren. Die Proben wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 30 kV gemessen. Die entstandenen Röntgenquanten wurden mit einem Stickstoff-gekühltem *Sapphire Si(Li)* PV7715/89 Detektor der Firma *EDAX Genesis* (Mahwah, USA) detektiert und anschließend über das Programm *Genesis Spectrum* (Version 4.52) ausgewertet. Zur Durchführung von EDX-Messungen am TEM *FEI Osiris* wurde ein *Bruker Quantax System* (XFlash Detektor) der Firma *Bruker* (Ettlingen) mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV verwendet. Die Probenpräparation erfolgte analog zur Auftragung von TEM-Proben (Kapitel 2.1.2). Die Auswertung wurde mithilfe der Software *ESPRIT* (Version 1.8) von *Bruker* (Ettlingen) durchgeführt.