



## 1 Zusammenfassung

Metallkomplexe und metallbasierte Nanopartikel stellen, verglichen mit organischen Substanzen, einen interessanten Ansatz für die Entwicklung von zytostatischen Therapeutika dar. Durch die strenge Regulation des intrazellulären Metallionenhaushalts ergibt sich sowohl das Potential als auch die Herausforderung bei der Entwicklung therapeutischer Metallkomplexe. Sowohl über direkte Bindungen als auch über nicht-kovalente Interaktionen können Metallionen oder die daran gebundenen Liganden mit Proteinen, DNA, oder anderen Molekülen aus ihrer Umgebung interagieren. Auf der Suche nach einer Alternative zu Cisplatin wurden in dieser Arbeit platinbasierte Komplexe mit Cyclooctadien-Liganden untersucht, die in *in vitro* Versuchen eine, verglichen mit Cisplatin, verminderte Toxizität zeigen. Allerdings fällt die Wirkung so gering aus, dass weitergehend untersucht werden muss, ob bei vertretbaren Dosen überhaupt ein therapeutischer Effekt besteht. Weiterhin wurden verschiedene Goldkomplexe mit Paracyclophan-Liganden untersucht, die aufgrund ihres verträglicheren Zentralatoms ebenfalls geeignete Kandidaten für die Krebstherapie darstellen. Hierbei erwies sich insbesondere SBCS209 als vielversprechender Kandidat, da er ein interessantes toxikologisches Profil zeigt. Mit Hilfe der FACS-Analyse und einer Anfärbung der Mikrotubuli wurden die der Toxizität zugrunde liegenden Mechanismen näher charakterisiert. Das generelle Problem bei derartig kleinen Molekülen bleibt aber die potentielle Induktion von mitunter starken Nebenwirkungen, da sie so gut wie jedes Endothel passieren und an unerwünschten Stellen aus der Blutbahn austreten können. Dies führt langfristig zu einer Limitierung der Dosis und kann die Bildung von Resistenzen begünstigen. Aufgrund ihrer Simplität besteht nur eine minimale Möglichkeit zur Modifikation, um diesen Problemen entgegen zu wirken.

Anders hingegen verhält es sich mit Nanopartikeln. Aufgrund ihrer großen Oberfläche bieten sie nicht nur eine ausreichend große Plattform für Modifikationen, auch verleihen sie der Substanz oft neue Eigenschaften, wie eine erhöhte katalytische Aktivität. So eignen sich die in dieser Arbeit untersuchten  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub>-Nanopartikel für die Photokatalyse und zeigten in *in vitro* Versuchen eine Phototoxizität, die nur bei lokaler Belichtung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge induziert wird und auf der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies basiert. Gegenüber den Metallkomplexen ergibt sich dadurch der entscheidende Vorteil, dass  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> trotz mangelnder Selektivität an sich zunächst völlig unbedenklich ist und die Induktion von Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert wird. Neben der Evaluation der Phototoxizität in Zellen wurde auch der Einfluss von  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> auf die Tumorprogression sowie das Nebenwirkungsprofil von  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> analysiert und dabei dem gängigen Chemotherapeutikum Doxorubicin gegenübergestellt. Mittels ICP-MS wurden die Tumoren auf eine Anreicherung von  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> untersucht.



Durch eine geeignete Größenjustierung und Ausnutzung des EPR-Effekts kann eine verstärkte Anreicherung im Tumor ohne Notwendigkeit weiterer Targeting-Strategien erzielt werden. Die örtliche und zeitliche Heterogenität des Tumorgewebes spielt bei dieser Form des Targetings eine untergeordnete Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene metallbasierte Nanocontainer zur Verkapselung von Doxorubicin, DOX@AlO(OH) und DOX@Gd<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, untersucht, welche beide *in vitro* ein vielversprechendes toxikologisches Profil zeigen und sich aufgrund der Fluoreszenz von Doxorubicin gut lokalisieren lassen. Durch die Verwendung von Nanocontainern kann *in vivo* einer vorzeitigen Metabolisierung von Doxorubicin entgegen gewirkt werden. Basierend auf der Größe und Säurelabilität des Nanocontainers erlauben diese eine passive Anreicherung im Tumorgewebe sowie die kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs im sauren Tumormilieu. Die Freisetzungskinetik von Doxorubicin wurde in diesem Zusammenhang in *in vitro* Versuchen evaluiert. In Anbetracht einer biomedizinischen Anwendung kann das Nanocontainermaterial das System mit weiteren, hilfreichen Eigenschaften versehen. So eignen sich Gd<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-basierte Nanocontainer aufgrund ihrer Fähigkeit zur Gewebekontrastierung neben der Verkapselung von Wirkstoffen für eine Anwendung in der Diagnostik bzw. Theranostik.

Weitere Ziele dieser Arbeit umfassten die Kombination mehrerer therapeutischer Ansätze in einem einzigen Drug Delivery System. Mit Hilfe einer säurelabilen, CPPa-vermittelten Verankerung von Doxorubicin und dem Einbau von Goldnanopartikeln (sAuNP) als Radiosensitizer wurden Strahlen- und Chemotherapie in einem Liposomen-basierten Drug Delivery System kombiniert. Ein liposomales Grundgerüst senkt hier im Vergleich zu metallbasierten Nanocontainern die Immunogenität des Systems, unter Umständen jedoch auch dessen Stabilität, weshalb man über weitere Modifikationen der Partikeloberfläche nachdenken sollte. Auch bietet dieses System eine Absicherung gegen Leckagen, da Doxorubicin und sAuNP in der Liposomenmembran verankert sind, kein diffusionsbedingter Austritt auftritt und Doxorubicin selbst bei einem Zerfall des Liposoms noch CPPa-gekuppelt vorliegt. Allerdings sind derartig komplexe Formulierungen deutlich schwieriger zu etablieren und erfordern, gerade im Hinblick auf eine Zulassung als Therapeutikum, umfangreiche toxikologische Prüfungen.



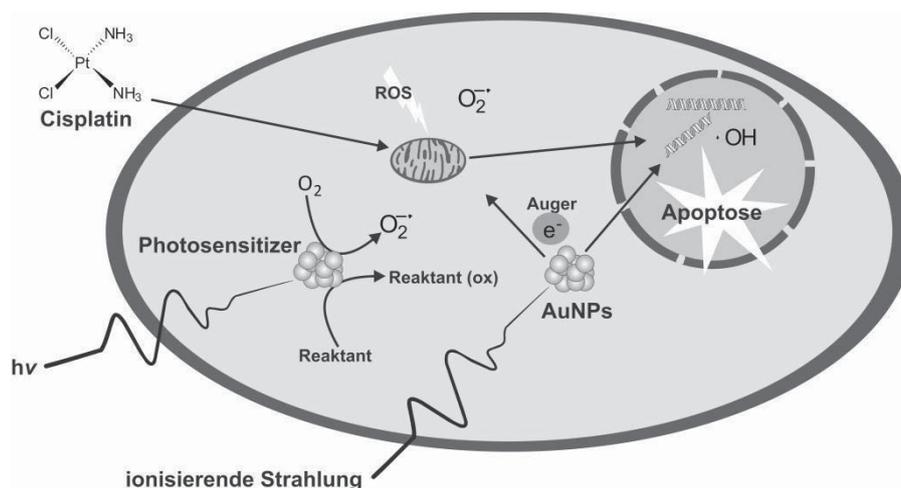
## 2 Einleitung

### 2.1 Krebsproblematik und konventionelle Behandlungsmethoden

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen noch immer die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Die wachsende Anzahl an Krebserkrankungen hängt unter anderem mit der wachsenden und immer älter werdenden Gesellschaft zusammen, sowie mit der zunehmenden Verbreitung von Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel. Neben der Erkrankung der Verdauungsorgane sind Lungen- und Bronchialkrebs die häufigsten Krebsarten, bei Frauen spielen außerdem Brustkrebserkrankungen eine entscheidende Rolle.<sup>[1]</sup> Bei einigen Patienten beruht die Krebserkrankung auf angeborenen Veränderungen in bestimmten Genen. Krebs entsteht außerdem in Folge der Schädigung von DNA durch karzinogene Faktoren (Chemikalien<sup>[2]</sup>, Strahlung<sup>[3]</sup>, Aflatoxine aus Schimmelpilzen<sup>[4]</sup>, Papillomviren<sup>[5]</sup> etc.). Um die Vervielfältigung eines DNA-Schadens zu unterbinden, wird zunächst die Zellteilung eingestellt. Geringe Defekte werden anschließend durch interne Reparaturmechanismen, z.B. durch die Nukleotidexzisionsreparatur bei Einzelstrangbrüchen oder „non-homologous end joining“ bei Doppelstrangbrüchen, behoben und können außerdem die Induktion einer Immunantwort nach sich ziehen.<sup>[6]</sup> Bei irreparablen Schäden verlieren die Zellen dauerhaft ihre Teilungsfähigkeit oder werden durch den programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Eine Störung dieser Kontroll- und Reparaturmechanismen, z.B. durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie p53, führt zum Verlust der Kontrolle über Zellzyklus und Zellteilung.<sup>[7]</sup> In einem weiteren Schritt erfährt die Zelle dann unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren (z.B. Östrogene) einen Wachstumsstimulus, wobei die Mutation im Erbgut auf sämtliche Tochterzellen übertragen wird und es zum vermehrten Auftreten weiterer Mutationen und zur unkontrollierten Zellproliferation kommt.<sup>[8]</sup> Durch die zahlreiche Neubildung versorgender Blutgefäße (Angiogenese) sorgt der entstehende Tumor für die konstante Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, was sein schnelles Wachstum weiter begünstigt.<sup>[9]</sup> Oft bleibt das Tumorstadium nicht lokal begrenzt (benigner Tumor). Einzelne Krebszellen können über Blut und Lymphe im Körper wandern und sich in anderen Geweben als Metastasen ansiedeln (Progression, maligner Tumor).<sup>[10]</sup> Bei der Behandlung von Krebs stellen Metastasen die größte Herausforderung dar, da die meisten Therapieansätze nur den soliden Tumor effektiv bekämpfen.<sup>[11]</sup> Der Organbefall durch Metastasen führt zu einer wesentlichen Beeinträchtigung wichtiger Organfunktionen.<sup>[12]</sup> Bei der Behandlung des Primärtumors haben einige Methoden zur Früherkennung und Therapie deutliche Verbesserungen bewirkt. Konventionelle Behandlungsmethoden der Krebstherapie gehen allerdings noch immer mit starken Nebenwirkungen einher<sup>[13]</sup> und zeigen oft nur begrenzte Effektivität.<sup>[14]</sup> Eine operative Entfernung des verkapselten Tumors kann dann helfen, wenn noch keine Metastasen ausgebildet worden sind. Spätestens mit dem Auftreten von Metastasen müssen



allerdings weitere Behandlungsmethoden wie die Chemo- und/oder Strahlentherapie hinzugezogen werden. Die Wirkung von Chemotherapeutika beruht auf dem Eingriff in essentielle Prozesse der Zellteilung, beispielsweise durch Mitosehemmer<sup>[15, 16]</sup> wie Paclitaxel, Antimetabolite<sup>[17]</sup> wie 5-Fluoruracil, Alkylantien<sup>[18]</sup> wie Busulfan oder Topoisomerasehemmer<sup>[19]</sup> wie Topotecan und Doxorubicin. Jedoch ist insbesondere eine Chemotherapie mit starken Nebenwirkungen verbunden, da die eingesetzten Zytostatika nicht nur Tumorzellen sondern jegliches proliferierende Gewebe schädigen. Die behandelten Patienten leiden daher unter anderem an Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen und Blutarmut.<sup>[20]</sup> Die Stärke der Nebenwirkungen ist zumeist der dosislimitierende Faktor. Allerdings kann die unvollständige Abtötung der Krebszellen die erhöhte Expression und Aktivität sogenannter MDR (Multidrug Resistance)-Transporter und damit das Auftreten von Resistenzen begünstigen. Durch eine Multidrug Resistance kann es dazu kommen, dass die eingesetzten Substanzen keine Wirkung zeigen oder diese verlieren, da sie über Efflux-Transporter wie z.B. P-gp<sup>[21]</sup> aus der Zelle geschleust werden, noch bevor sie ihre Zielstrukturen erreicht haben.<sup>[14, 22-25]</sup> Die Bildung von P-gp wird durch die Expression des MDR1-Gens induziert und wurde unter anderem mit einer Resistenz gegenüber Anthracyclinen in Verbindung gebracht.<sup>[24, 26]</sup> Die Multidrug Resistance kann sich nicht nur im Zuge der Behandlung entwickeln, sondern tritt auch inhärent auf. Um das Ansprechen des Tumors auf die Behandlung vorübergehend wieder zu steigern, können kombinatorische Therapien aus zwei bis drei Zytostatika verabreicht werden. Ein zweiter, weit verbreiteter Therapieansatz ist die Strahlentherapie. Diese beruht auf einer direkten oder indirekten Schädigung biologisch aktiver Moleküle (DNA, Enzyme, etc.) durch ionisierende Strahlung, wie z.B. Gamma- oder Röntgenstrahlung.<sup>[27]</sup>



**Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen, die zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen können.** Der Metallkomplex Cisplatin induziert neben Inter- bzw. Intrastrangverbindungen in der DNA auch die Bildung von ROS. Photosensitizer induzieren die Generierung von ROS unter Einwirkung von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Goldnanopartikel (AuNP) können als Radiosensitizer fungieren, welche bei Kontakt mit ionisierender Strahlung Sekundärprodukte produzieren und so lokal die Strahlendosis erhöhen. Auch hier kommt es zur Bildung von ROS.



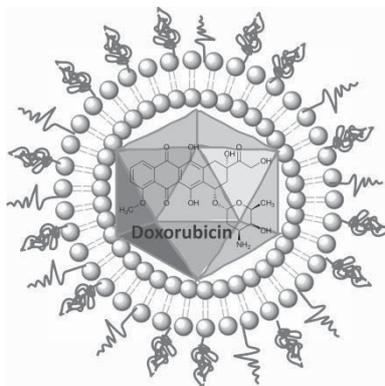
Indirekte Schädigungen gehen vor allem auf die Ionisierung von Wassermolekülen und damit auf die Entstehung freier Radikale zurück.<sup>[27]</sup> Trotz hoch präziser Geräte, welche die Strahlung zielgenau auf den Tumor bündeln, bleibt es jedoch auch hier eine Herausforderung, das den Tumor umgebende, gesunde Gewebe nicht zu schädigen und die höchste Strahlendosis im Tumor selbst zu erzielen.<sup>[28-30]</sup> Mit Hilfe sogenannter Radiosensitizer kann die Sensitivität gegenüber einer Bestrahlung allerdings lokal erhöht werden (vgl. Kapitel 2.2 und Abbildung 1).<sup>[31]</sup>

## 2.2 Neue Behandlungsmethoden auf Basis nanopartikulärer Substanzen

Mit dem Einzug der Nanotechnologie in das Feld der Krebsforschung sollte derartigen Problemen Abhilfe geschaffen werden. Die Geburtsstunde der Nanotechnologie wurde wesentlich durch den Vortrag „There’s Plenty of Room at the Bottom“<sup>[32]</sup> von R.P. Feynman geprägt, in welchem er 1959 den Paradigmenwechsel hin zur Nanotechnologie postulierte. Als Nanopartikel werden Verbände von Atomen oder Molekülen bezeichnet, deren Durchmesser 100 nm strenggenommen nicht überschreitet.<sup>[33]</sup> Verglichen mit makroskopischen Festkörpern haben Nanopartikel eine außerordentlich große Oberfläche, weshalb sie besondere Eigenschaften wie eine erhöhte katalytische Aktivität oder Reaktivität aufweisen. In den verschiedensten Industriezweigen konnte man sich dies zunutze machen und auch in der Medizin haben nanopartikuläre Substanzen Einzug gefunden. So können Nanopartikel selbst als Therapeutikum eingesetzt werden, da sie je nach Beschaffenheit in der Lage sind, lokal die Temperatur<sup>[34]</sup>, Strahlensensibilität<sup>[31]</sup> oder Photosensibilität<sup>[35]</sup> zu erhöhen. Zu den am besten charakterisierten Nanopartikeln gehören zweifelsohne Goldnanopartikel, welche sich insbesondere durch ihre Fähigkeit, Amin- und Thiol-Funktionalitäten zu binden, auszeichnen<sup>[36]</sup> und die als Carrier<sup>[37]</sup>, Radiosensitizer<sup>[38]</sup>, Kontrastierungsreagenz<sup>[39]</sup> und in der photothermischen Therapie<sup>[40]</sup> Anwendung finden. Eisenoxid-Nanopartikel (NanoTherm®) wandeln die Energie eines magnetischen Feldes in Wärme um und induzieren durch Hyperthermie die Zerstörung oder Sensibilitätssteigerung der Krebszellen.<sup>[41]</sup> Die Bestrahlung intrazellulär akkumulierter Goldnanopartikel induziert die Bildung von Auger-Elektronen, welche ihrerseits zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen, die Doppelbindungen spalten.<sup>[42]</sup> Zahlreiche weitere Nanomaterialien, wie z.B. multimodale Quantumdots für die Theranostik<sup>[43]</sup> und Polymer-basierte siRNA-Carrier für die Tumorthherapie<sup>[44]</sup>, zeigen großes Potential, befinden sich jedoch Großteils noch in der klinischen Phase.<sup>[45]</sup>

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit stellt die Verkapselung einer Wirkstoffkomponente in sogenannten Drug Delivery Systemen dar. Durch den Einsatz von Hochdurchsatzverfahren wurde in den vergangenen Jahrzehnten im Bereich der Wirkstoffforschung eine Vielzahl potentiell hochwirksamer Substanzen identifiziert. Obwohl derart viele Wirkstoffkandidaten bekannt sind, liegt das eigentliche Problem in deren eingeschränkter Nutzbarkeit, hervorgerufen durch (i) geringe

Löslichkeit in biologischen Medien, (ii) vorzeitigen enzymatischen Abbau oder Derivatisierung im Organismus, (iii) toxische Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe, (iv) mangelnde Überwindung physiologischer Barrieren, (v) ungenügende Pharmakokinetik und (vi) Resistenzmechanismen. Die Verkapselung oder Immobilisierung von Therapeutika mit Dendrimeren<sup>[46]</sup>, Liposomen<sup>[47-49]</sup>, Polymeren<sup>[50]</sup>, metallischen Nanopartikeln<sup>[51]</sup> und anderen Nanocontainern entwickelte sich als vielversprechende Strategie, um derartige Einschränkungen konventioneller Darreichungsformen zu umgehen und die Verweildauer im Organismus zu erhöhen, indem beispielsweise einer frühzeitigen Metabolisierung im Blutkreislauf entgegen gewirkt wird.<sup>[52, 53]</sup> Eine zusätzliche Dekoration mit Antikörpern, welche in Krebszellen überexprimierte oder nur dort exprimierte Antigene binden, ermöglicht zudem ein aktives Ansteuern des Zielgewebes. Diese Maßnahmen ermöglichen dann auch prinzipiell den Einsatz höherer Dosen, da das Verteilungsvolumen im Vergleich zum freien Wirkstoff deutlich reduziert und somit maßgeblich auf die Pharmakokinetik des Wirkstoffs Einfluss genommen werden kann.<sup>[54]</sup> Umgekehrt sind aufgrund des kleineren Verteilungsvolumens und verlängerter Halbwertszeiten aber nur geringere Dosen erforderlich.<sup>[55]</sup> Viele Wirkstoffmoleküle können gleichzeitig und dicht gepackt transportiert werden, und auch eine Kombination verschiedener Therapeutika in einem Drug Delivery System ist denkbar.<sup>[56]</sup> Es wurde bereits postuliert, dass die Verwendung nanopartikulärer Therapeutika auch das Risiko P-gp vermittelter Resistenzen verringern könnte.<sup>[57, 58]</sup> Die Forschung an nanopartikulären Therapeutika hat in den letzten Jahren stark zugenommen, aufgrund der Komplexität mancher Formulierungen aber bisher noch vergleichsweise wenige Zulassungen hervorgebracht.<sup>[45]</sup> Die meisten der derzeit zugelassenen, nanoformulierten Substanzen basieren auf Liposomen.<sup>[41]</sup> Ein Erfolgsbeispiel aus dem Bereich der Drug Delivery Systeme ist das seit 1995 durch die FDA zugelassene, liposomale Doxorubicin (Doxil<sup>®</sup>, Abbildung 2)<sup>[59]</sup>, mit dem erstmals eine deutliche Verbesserung des Nebenwirkungsprofils von Doxorubicin erzielt werden konnte. Jedoch birgt auch liposomales Doxorubicin noch einige, wenn auch teils harmlosere Nebenwirkungen wie die Schwellung und Rötung von Fußsohlen und Handflächen beim Hand-Fuß-Syndrom<sup>[60]</sup>, weshalb weiterhin Forschungsbedarf besteht.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von Doxil.** Der Wirkstoff Doxorubicin ist liposomal verkapselt. Eine PEGylierung auf der Außenseite gewährleistet eine lange Verweildauer im Blutkreislauf.