

Abstract

The pharmacological properties desired in newly developed drugs such as solubility, circulating half-time, controlled release over precise durations and specific site-targeted delivery, can be improved by combining them with the concept of nanochemistry. In this thesis various nanomaterials based on carbon, silica, aluminosilicate and iron oxide were synthesized using co-precipitation and solvothermal methods for their further utilization as drug carriers. In addition, numerous active organic ligands and molecules were covalently attached to the surface of nanoparticles (carbon spheres and aluminosilicate) *via* 1,3-dipolar cycloaddition protocols (click chemistry). Furthermore, new concept for nanoparticles were developed based on carbodiimide coupling reactions. Later the modified NPs were studied for their cellular uptake activity and antimicrobial properties.

In the first part, core structure of ciprofloxacin was chemically modified *via* click chemistry by conjugating azide-modified ciprofloxacin and alkyne-functionalized piperazine rings. With the intentions of elaborating structure activity relationships six new compounds carrying 1,2,3-triazole ring were tested against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacterium. All new products showed diverse activity profiles towards tested bacteria, suggesting that the antibacterial effect significantly depends on the nature of substituents attached to the parental compound.

In the second part of this thesis, coupling reaction was performed at the surface of various metal oxide nanoparticles to conjugate different types of nanoparticles in one ensemble. In a typical reaction NH_2 -capped $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ spheres (40 nm) were reacted with citrate functionalized SiO_2 (300 nm) or Fe_3O_4 (180 nm) nanospheres under mild reaction conditions to obtain $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ and $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-Fe}_3\text{O}_4$ conjugates. Transmission electron microscopy and X-ray diffraction analysis of the covalently built nanoparticle-assemblies confirmed their structural integrity and bimodal nature. The surface of both particles, offered active functional (amine/carboxylic) groups, which were tested for the conjugation of natural substance such as curcumin and ciprofloxacin *via* carbodiimide reactions. The successful conjugation of drug molecules was determined by FT-IR, UV-Vis, ζ -potential studies, and elemental analysis. The ciprofloxacin-capped assembly was tested for Minimum Inhibition Concentration (MIC) with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to evaluate the active action of the conjugated drugs in dose-dependent

method. Antibacterial activity of functionalized assembly exhibited stronger effect on Gram-negative bacteria in comparison to Gram-positive due to stronger affinity of ciprofloxacin to Gram-negative microbes. Cellular uptake of curcumin-capped assembly by HeLa cancer cells showed improved uptake of drug-capped nanoparticles compared to the free biomolecules at different time points. The results show their potential in controlled drug delivery and bioimaging (*in vivo*) applications.

The third part focused on the synthesis and functionalization of two types of hollow nanoparticles namely hollow carbon spheres (HCS) and hollow aluminosilicate (HMAS) for their use as nanocarriers for drug transport. The synthesis of nanoparticles was achieved using silica dioxide particles as template. The exterior surfaces of as-prepared particles were functionalized *via* click chemistry to covalently immobilize fluorescein as a fluorescent tracer. Furthermore, the interior hollow cavities were filled with antituberculosis antibiotic isoniazid in three different solvents. In both hollow systems, the antibiotic drug showed significant differences in the release profiles, investigated by UV-Vis spectroscopy. Pristine, HCS possess hydrophobic properties limited the uptake of water soluble isoniazid, however the attachment of fluorescein molecules making the particle exterior hydrophilic that facilitated the infiltration of isoniazid in HCS which was verified by 5-fold higher release concentration. The same particles were investigated for their antibacterial activity against *Mycobacterium smegmatis* that showed time dependent relationship between the drug release and bacterial growth inhibition. The as-synthesized hollow nanoparticles holds potential for target-specific drug delivery applications.

The fourth part described *in vivo* toxicity testing of Congo red-Fe₃O₄ nanoparticles (CR@Fe₃O₄) applied to an aquatic species, zebrafish (*Danio rerio*) which was chosen as a model animal in this study to investigate the bioavailability of nanoprobe administered orally. For this purpose, a number of zebrafish embryos were selected and exposed to the nanoparticles covered with Congo red dye. The data of toxicity investigation showed hatching delays but negligible mortality of embryos incubated with functionalized nanoparticles. In the second part, zebrafish larvae were exposed to CR@Fe₃O₄ and after 72 h their survival rate was significantly decreased at high concentrations (600-800 µg/ml). Interestingly, the CR@Fe₃O₄ did not show any dose-dependent malformations of fish larvae. This study revealed that zebrafish exhibit a countless potential in *in vivo* preliminary toxicity assays of

new synthesized and functionalized NPs and high homology with human genome together with transparent body provides an unexplored opportunity for diagnostic applications. In this content, the experiments reported in this thesis act as pointer for future research potential and possible application of surface-functionalized nanostructures for drug-delivery and bioimaging applications.

Kurzzusammenfassung

Die Wirkung von Arzneimitteln und Wirkstoffen kann durch gezielte chemische Modifikationen sowie neue Konzepte des Wirkstofftransportes, z. B. mit Hilfe Medikament-beladener Nanopartikel, gesteigert werden. Diese Prozesse können einen bedeutenden Einfluss auf wichtige pharmakologische Eigenschaften wie Löslichkeit, zirkulierende Halbwertszeit und zeitabhängige Freisetzung der Wirkstoffe am Zielort ausüben. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Herstellung von Nanopartikeln mittels Copräzipitation- und Solvothermal-Synthese und deren Einsatz als Transportsysteme für bestimmte Wirkstoffe. Des Weiteren wurde die Oberfläche verschiedenartiger Nanopartikel (Kohlenstoff-Hohlpartikel, Aluminosilikate und Eisenoxide) mit unterschiedlichen organischen Liganden und Molekülen modifiziert, um die Bioaktivität der Oberfläche zu verbessern. Hierzu wurden die Konzepte der Click- (Kupplung von Azid-Alkyl-Gruppen mit CuSO_4 als Katalysator sowie Natriumascorbat als Reduktionsmittel) und der Kreuzkupplungs-Chemie (speziell Carboxylamin-Kreuzkupplung mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid) angewandt. Die modifizierten Nanopartikel wurden anschließend auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften und auf ihre Aufnahme durch HeLa-Zellen getestet.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mittels Click-Chemie verschiedene Ciprofloxacin-Derivate synthetisiert. Durch die Kupplung von Azid-modifizierten Ciprofloxacin mit Alkin-funktionalisierten Piperazin-Ringen konnte eine Bibliothek an Verbindungen aufgebaut werden, von welchen sechs mit 1,2,3-Triazol-Ringen versehene Ciprofloxacin-Strukturen auf ihre antibakterielle Aktivität gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien untersucht wurden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die antibakteriellen Eigenschaften stark von den Substituenten am Ciprofloxacin-Gerüst beeinflusst wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Entwicklung neuartiger Konzepte der Selbstassemblierung (self-assembly) behandelt, indem durch Carbodiimid-Kupplungsreaktionen funktionelle Gruppen an die Oberfläche von metalloxidischen Nanopartikeln aufgebracht wurden. Unter milden Bedingungen wurden die mit NH_2 -Gruppen versehenen $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanopartikeln mit Citrat-funktionalisierten SiO_2 - und Fe_3O_4 -Partikeln zur Reaktion gebracht. Charakterisierungen der Nanopartikel-Assemblies durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigten eine homogene Verteilung der kleineren Partikel auf der Oberfläche der Größeren. Röntgenanalysen deuteten auf eine hohe

Kristallinität der Partikel hin. Die funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der α -Fe₂O₃-Nanopartikeln konnten selektiv mit Ciprofloxacin (antibakteriell), die auf der Partikeloberfläche der Fe₃O₄-Partikeln selektiv mit Curcumin (antikrebs) als Bestandteile des Nanopartikel-Assemblys mit Hilfe von Kupplungsreaktionen umgesetzt werden. Die erfolgreiche kovalente Bindung der Wirkstoffe konnte anhand von FT-IR-, UV-Vis-, Zeta-Potential-Messungen und Elementaranalyse verifiziert werden. Zur Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK) des antibakteriellen Wirkstoffes Ciprofloxacin in Kombination mit dem Nanopartikel-Assembly wurden konzentrationsabhängige Studien an den Bakterienstämmen *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Nanopartikel-Assembly eine höhere Wirkung auf gram-negative als auf gram-positive Bakterien ausübte. Die intrazelluläre Aufnahme des Curcumin-beladenen Assemblys durch HeLa-Krebszellen zeigte einen zeitabhängigen Effekt. Die Gesamtergebnisse schildern das hohe Potential der kontrollierten Freisetzung der Wirkstoffe Ciprofloxacin und Curcumin und deren Einsatz im Bereich der Wirkstofffreisetzung und des Bio-Imagings.

Der dritte Teil der Arbeit umfasste die Synthese und Funktionalisierung von hohlen Kohlenstoff- (HCS) und Aluminosilikat-Nanopartikeln (HMAS) und der nachfolgenden Wirkstoff-Beladung dieser hergestellten Partikel. Die Synthese beider Strukturen erfolgte mit Hilfe von SiO₂-Nanopartikeln, die als Templat dienten. Anschließend wurde der Farbstoff Fluorescein in Funktion eines Fluoreszenzmarkers kovalent an die Oberfläche der Nanopartikel via Click-Chemie gebunden. Zudem wurden die hohlen Kohlenstoff- und Aluminosilikat-Nanopartikeln mit dem Antituberkulotikum Isoniazid – gelöst in drei unterschiedlichen Lösungsmitteln – beladen. Die Ergebnisse der UV-Vis-Spektroskopie der beiden Nanopartikelsorten wiesen auf große Unterschiede in der Wirkstofffreisetzung vor und nach der Oberflächenmodifizierung mit Fluorescein hin. Abschließend wurden die hohlen Kohlenstoff- und Aluminosilikat-Partikel auf ihre antibakterielle Aktivität gegenüber *Mycobacterium smegmatis* getestet. Dabei konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen zeitabhängiger Wirkstofffreisetzung und Inhibierung der Bakterien- wachstumsrate nachgewiesen werden.

Der vierte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit *In-vivo*-Toxizitätsstudien, die mit Kongorot- α -Fe₂O₃ Nanopartikeln (CR@ α -Fe₂O₃) in Zebrafischen (*Danio rerio*) durchgeführt wurden. Diese Fische dienten als Modell für die Bioverfügbarkeit der oral verabreichten Nanoproben. Zu Beginn der Studie wurde eine bestimmte Anzahl an Embryos selektiert und Farbstoff-

beladen sowie nicht-beladen Partikeln ausgesetzt. Die Toxizitätsstudie mit den funktionalisierten Nanopartikeln zeigte ein verspätetes Ausschlüpfen und eine vernachlässigbare Mortalität der Embryos auf. Nach 72 Stunden der oralen Verabreichung der CR@ α -Fe₂O₃ Partikel wurde eine deutliche Erhöhung der Sterberate der Zebrafische erkennbar. Diese Studie verdeutlichte, dass die Zebrafische ein unschätzbares Potential innerhalb der *in vivo* durchgeführten toxikologischen Teststudien bezüglich neu synthetisierter und funktionalisierter NPs haben. Die hohe Homologie mit dem menschlichen Genom sowie die Transparenz der Zebrafische ermöglicht eine vielversprechende Möglichkeit zur Diagnostik. Im Rahmen dessen sind die hier dargestellten Experimente ein Ansatz für die Zukunft zur Erforschung von potentiell möglichen Anwendung der Oberflächen-funktionalisierten Nanostrukturen zum Medikamententransport und im Bio-imaging.