

**Herstellung von Goldnanopartikel-Konjugaten als
Arzneimittelträgersysteme für die Krebstherapie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. Nat.

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marilyn Anita Kaul

aus Köln

Düsseldorf, November 2025

aus dem Institut für Anorganische Chemie I – Nanoporöse und nanoskalierte Materialien
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität

Berichtersteller:

1. Berichtersteller: Univ.-Prof. Dr. Christoph Janiak

2. Berichtersteller: Univ.-Prof. Dr. Christian Ganter

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2025

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Marilyn Kaul, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Inhalte wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Es wurden keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, der 05.11.2025

Ort, Datum

Unterschrift

In Gedenken an meine Mutter

Danksagung

Zunächst gebührt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Christoph Janiak für die Möglichkeit zur Erarbeitung meiner Dissertation mit diesem lehrreichen und abwechslungsreichen Thema. Ich bedanke mich für die großartige Unterstützung, während meiner Zeit bei Ihnen im Arbeitskreis und vor allem während der Veröffentlichungsprozesse.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Christian Ganter für die Übernahme des Koreferats.

Einen weiteren Dank widme ich meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Ulf Kahlert und Herrn Ahmed Sanin aus der molekularen und experimentellen Chirurgie in Magdeburg, die mit an meinen Veröffentlichungen beteiligt waren. Ich danke euch herzlich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die wertvollen Einblicke in biomedizinische Aspekte.

Desgleichen möchte ich mich bei den technischen Mitarbeiter Marcell Demandt, Annette Ricken und Birgit Tommes für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei fachlichen Problemen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen ganzen Arbeitskollegen bedanken. Ohne euch wäre die Promotion nicht das was sie war. Ich danke meiner immer größer werdenden Nanogruppe Lars Rademacher, Linda Sondermann, Till Strothmann, Dennis Woitassek, Soheil Abdpour, David Geller, Jonas Fabrizi, Lukas Eisenhuth und Quang-Dien Hoang. Ebenso danke ich meinen Heinrich Heinis Thi Hai Yen Beglau, Dietrich Püschel, Marcus Fetzer, Dustin Jordan und Annette Vollrath.

Weiterhin danke ich meiner besten Freundin Nouria Mohseni, die, seit ich denken kann, an meiner Seite ist und mich in jeder Lebenslange unterstützt hat und es auch immer tun wird. Ich danke dir, dass ich das Glück habe, so eine tolle Freundin wie dich in meinem Leben zu haben.

Meinen herzlichsten Dank widme ich meinem Vater Albert Kaul sowie meinen Brüdern Daniel Kaul und Thomas Kaul, den besten Brüdern, die man sich wünschen kann. Ihr habt mich auf meinen gesamten Weg begleitet, mir Mut gegeben, an mich geglaubt und immer lauter applaudiert als der Rest des Raumes, sodass ich diejenigen die nicht geklatscht haben, gar nicht gehört habe.

Besonders danke ich meinem Lebenspartner Leon Hünemeyer für seine Liebe, Geduld und sein Verständnis, auch in stressigen Zeiten. Du warst seit Beginn meines Studiums an meiner Seite und hast jede Freunde, jedes Glück, aber auch Frust und Verzweiflung miterlebt. Gemeinsam haben wir diese Zeit gemeistert und ich freue mich schon jetzt darauf, den nächsten

Lebensabschnitt mit dir zu teilen. Du hast mir nicht nur Halt während meines Studiums und der Promotion gegeben, sondern mir auch gezeigt, wie schön die Welt außerhalb der eigenen Komfortzone ist.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anorganische Nanomaterialien	1
1.2. Synthese von NP	1
1.3. Stabilisierung von NP	4
1.4. Goldnanopartikel (AuNP)	5
1.4.1. Herstellung von AuNP	5
1.4.2. Morphologien von AuNP	6
1.4.3. (Physikochemische) Eigenschaften von AuNP	8
1.4.4. Bindungsaffinität von AuNP zu anderen Molekülen	9
1.5. Medizinische Anwendungen von AuNP	9
1.5.1. Therapie	10
1.5.2. Diagnostik	20
1.6. Ausgewählte aggressive Tumore und therapeutische Ansätze	23
1.6.1. Hochrisiko-Tumore: Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) und Glioblastom (GBM)	23
1.6.2. Tyrosinkinase	24
1.6.3. Tyrosinkinase-inhibitor (Dasatinib)	25
1.6.4. Behandlung von PDAC und GBM mit AuNP	27
2. Zielstellung	28
3. Kumulativer Teil	30
3.1. Nanoformulation of dasatinib cannot overcome therapy resistance of pancreatic cancer cells with low LYN kinase expression	30
3.2. Solvent-dependent stabilization of gold nanoparticles: A comparative study on polymers and the influence of their molecular weight in water and ethanol	72
3.3. Beiträge an weitere Veröffentlichungen	126
4. Zusammenfassung	129
5. Literaturverzeichnis	132

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum vom August 2021 bis November 2025 am Institut für Anorganische Chemie I – Nanoporöse und nanoskalierte Materialien der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Lehrstuhl von Prof. Dr. Christoph Janiak angefertigt.

Publikationsliste

Erst-Autor Veröffentlichungen:

- (1) M. Kaul, A. Y. Sanin, W. Shi, C. Janiak, U. D. Kahlert: „*Nanoformulation of dasatinib cannot overcome therapy resistance of pancreatic cancer cells with low LYN kinase expression*“.

Pharmacol. Rep. **2024**, 76, 793-806. DOI: 10.1007/s43440-024-00600-w.

- (2) M. Kaul, R. L. Vanselow, A. Y. Sanin, U. D. Kahlert, C. Janiak: „*Solvent-dependent stabilization of gold nanoparticles: A comparative study on polymers and the influence of their molecular weight in water and ethanol*“.

Chemistry **2025**, 7, 159. DOI: 10.3390/chemistry7050159.

Co-Autor Veröffentlichungen:

- (1) E. Poonakim, A.-C. Nickel, M. S. Ardestani, L. Rademacher, M. Kaul, E. Apartsin, S. G. Meuth, A. Gorji, C. Janiak, U. D. Kahlert: „*CD133-Functionalized Gold Nanoparticles as a Carrier Platform for Telaglenastat (CB-839) against Tumor Stem Cells*”.

Int. J. Mol. Sci. **2022**, 23, 5479. DOI: 10.3390/ijms23105479.

- (2) F. E. Meva, R. Pereira, S. E. Ngnihamy, A. F. T. Njiemou, A. A. Ntomba, J. B. H. Fokou, T. H. Y. Beglau, M. N. A. Fetzer, M. Kaul, B. Schlierf, U. A. M. Fongang, P. B. E. Kedi, S. V. Fannang, M. Herrmann, C. Janiak: „*Magnesium Hydroxide Nanoneedles Derived from Anthocleista schweinfurthii Gilg (Loganiaceae) Support Mesenchymal Stromal Cell Proliferation and Wound Healing*”.

J. Inorg. Organomet. Polym. **2025**, 1–22. DOI: 10.1007/s10904-025-03833-1.

Kurzfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zählt zu den aggressivsten und am schwersten zu behandelnden Tumorarten. Präklinische Studien mit dem Src (Sarkom, engl.: *sarcoma*)-Inhibitor Dasatinib (DASA) zeigten vielversprechende Wirksamkeiten, welche jedoch in klinischen Studien nicht bestätigt werden konnten. Ein möglicher Ansatz zur Überwindung dieser Limitierung liegt in der Nanomodifikation von DASA mithilfe von Goldnanopartikeln (AuNP). Diese zeichnen sich durch ihre vielseitigen physikochemischen Eigenschaften, ihre Biokompatibilität sowie ihre Stabilität aus und bieten Potenzial für den gezielten Wirkstofftransport.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von Src-Kinasen, insbesondere LYN und BLK, bei PDAC-Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass LYN als Marker für die Sensitivität gegenüber DASA fungiert, da die Zellen mit einer hohen LYN-Expression stärker auf die Therapien ansprachen. BLK hingegen war vor allem bei diabetischen PDAC-Patienten vermehrt exprimiert und mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert. Darüber hinaus wurden Polyvinylalkohol-stabilisierte AuNP (AuNP@PVA) in Wasser synthetisiert und charakterisiert, um den Einsatz der AuNP als Trägersysteme für DASA in Zellversuchen zu untersuchen. Für die DASA Beladung wurden die AuNP@PVA nach dem Zentrifugieren in Ethanol resuspendiert, mit dem in Ethanol gelösten Medikament DASA beladen (AuNP@PVA-DASA) und im Anschluss deren Beladungsmenge quantifiziert. Die nach Beladung erhaltenen monodispersen AuNP@PVA-DASA wiesen eine durchschnittliche Beladung von 2,7 DASA Molekülen pro AuNP@PVA auf, zeigten jedoch im PDAC-Zelllinien keinen signifikanten wachstumshemmenden Effekt im Vergleich zur Anwendung von DASA alleine.

Da die Nanofunktionalisierung von DASA für die praktische Anwendung weiter optimiert werden muss, konzentrierte sich der zweite Teil dieser Arbeit auf die kolloidale Stabilität der AuNP-Konjugate sowohl in Wasser als auch in Ethanol. Hierfür wurde der Einfluss verschiedener Polymerbeschichtungsmethoden sowie unterschiedlicher Polymertypen untersucht. Zum Einsatz kamen sowohl die postsynthetische Additionsreaktion (PAR) als auch die Eintopfsynthese, jeweils unter Verwendung von Polyvinylalkohol (PVA), Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyacrylsäure (PAA) mit variierenden molaren Durchschnittsgewichten. Mit beiden Synthesemethoden konnten stabile AuNP-Polymersysteme in Wasser hergestellt werden. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigte unveränderte AuNP-Kerngrößen von ~ 11–19 nm, der hydrodynamische Durchmesser der dynamischen Lichtstreuung (DLS) liegt bei 20–70 nm und die Ultraviolett-sichtbare (UV-Vis)

Spektroskopie zeigte Plasmonenmaxima bei 517–531 nm, unabhängig von Synthesemethode und Lösungsmittel. Die Stabilität von PVP- und PAA-beschichteten AuNP variiert in Abhängigkeit von Synthesestrategie, Molekulargewicht und Lösungsmittel. PVA gewährleistete dabei die höchste kolloidale Stabilität der AuNP in Wasser und Ethanol, wohingegen PEG in Ethanol eine Instabilität zeigte, was vermutlich auf die schwächer koordinierenden Ethergruppen zurückzuführen ist. Eine typische DASA-Beladung der AuNP-Polymersysteme lag, mit Ausnahme von PVA, sowohl in den PAR- als auch in den Eintopfproben im Bereich von 100–300 µg/mg. Im Gegensatz dazu zeigten die PVA Proben durchgängig eine deutlich geringere DASA-Beladung (< 100 µg/mg), in einigen Fällen sogar nahezu keine Beladung. Zudem deutet sich eine mögliche Korrelation zwischen der Höhe der DASA-Beladung der PEG-, PVP- und PAA-Konjugate und deren Tendenz zur Aggregation in Ethanol an.

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive and difficult-to-treat types of cancer. Preclinical studies with the Src (sarcoma) inhibitor dasatinib (DASA) showed promising efficacy, but these could not be confirmed in clinical trials. One possible approach to overcome this limitation is the nanomodification of DASA using gold nanoparticles (AuNPs). These are characterized by their versatile physicochemical properties, biocompatibility, and stability, and offer potential for targeted drug delivery.

The first part of this study examined the role of Src kinases, particularly LYN and BLK, in PDAC patients. It was found that LYN acts as a marker for sensitivity to DASA, as cells with high LYN expression responded more strongly to the therapies. BLK, on the other hand, was overexpressed primarily in diabetic PDAC patients and was associated with reduced overall survival. In addition, polyvinyl alcohol-stabilized AuNPs (AuNP@PVA) were synthesized in water and characterized to investigate the use of AuNPs as carrier systems for DASA in cell experiments. For DASA loading, the AuNP@PVA were resuspended in ethanol after centrifugation, loaded with the drug DASA dissolved in ethanol (AuNP@PVA-DASA), and their loading amount quantified afterwards. The monodisperse AuNP@PVA-DASA obtained after loading had an average loading of 2.7 DASA molecules per AuNP@PVA, but showed no significant growth-inhibiting effect in PDAC cell lines compared to the use of DASA alone.

Since the nanofunctionalization of DASA needs to be further optimized for practical application, the second part of this work focused on the colloidal stability of the AuNP conjugates in both water and ethanol. To this end, the influence of different polymer coating methods and different polymer types was investigated. Both post-synthetic addition reaction (PAR) and one-pot synthesis were used, each employing polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone (PVP), and polyacrylic acid (PAA) with varying molar weight averages. Both synthesis methods were able to produce stable AuNP polymer systems in water. Transmission electron microscopy (TEM) showed unchanged AuNP core sizes of ~11–19 nm, the hydrodynamic diameter of dynamic light scattering (DLS) is 20–70 nm, and ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy showed plasmon maxima at 517–531 nm, regardless of synthesis method and solvent. The stability of PVP- and PAA-coated AuNPs varies depending on the synthesis strategy, molecular weight, and solvent. PVA ensured the highest colloidal stability of the AuNPs in water and ethanol, whereas PEG showed instability in ethanol, which is presumably due to the weaker coordinating ether groups. With the exception of PVA, the typical DASA loading of the AuNP polymer systems was

in the range of 100–300 µg/mg in both the PAR and single-pot samples. In contrast, the PVA samples consistently showed significantly lower DASA loading (< 100 µg/mg), in some cases close to almost no loading. In addition, there is evidence of a possible correlation between the level of DASA loading of the PEG, PVP, and PAA conjugates and their tendency to aggregate in ethanol.

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AS	Anthocleista schweinfurthii Gilg
ATP	Adenosintriphosphat
AuNB	Goldnanoblume
AuND	Goldnanoscheiben oder -dreiecke
AuNK	Goldnanoschalen oder -käfige
AuNP	Goldnanopartikel
AuNR	Nanostäbchen
AuNS	Goldnanosterne
BCR-ABL1	Bruchpunkt-Cluster-Region des Abelson-Maus-Leukämie-Virus-Onkogen-Homologs 1 (engl.: <i>Breakpoint cluster region of abelson murine leukemia-viral oncogene Homolog 1</i>)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLK	B-Lymphozyten-Kinase
Bzw	Beziehungsweise
CB-839	Telaglenastat
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor-Kinase
CML	Chronische myeloische Leukämie
CSC	Krebsstammzellen (engl.: <i>Cancer stem cells</i>)
CT	Computertomographie
DASA	Dasatinib
DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
DLS	Dynamische Lichtstreuung

DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EPHA2	Ephrinrezeptor A2
EPR	Erhöhte Permeabilität und Retention
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: <i>Fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GLS1	Enzyms Glutaminase 1
GBM	Glioblastoma multiforme
GSC	Glioblastom-Stammzellen (engl.: <i>Glioblastoma stem cells</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High-performance liquid chromatography)
HSAB	harte und weiche Säuren und Basen (engl.: <i>hard and soft acids and bases</i>)
ICP-MS	Plasma-Massenspektrometrie
IR	Infrarot
LDH	Laktatdehydrogenase
LOPR	Lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz
miRNA	MikroRNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCit	Natriumcitrat-Dihydrat
NIR	Nahinfrarot
NP	Nanopartikel

NRTK	Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen
PAA	Polyacrylsäure
PAR	Postsynthetische Additionsreaktion
PB	Photoakustische Bildgebung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas (engl.: <i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)
PDGFR β	Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktorrezeptor- β -Tyrosinkinasen (engl.: <i>Platelet-derived growth factor receptor β</i>)
PDI	Polydispersitätsindex
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLA	Polymilchsäure
PLGA	Poly(milchsäure-co-glykolsäure)
PNI	Perineurale Invasion
PTT	Photothermische Therapie
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RES	Retikuloendotheliales System
ROS	Hochreaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>Reactive oxygen species</i>)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen

SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl.: <i>Surface-enhanced Raman scattering</i>)
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
Src	Sarkom (engl.: <i>sarcoma</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGA	Thermogravimetrische Analyse
TK	Tyrosinkinasen
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
UV-Vis	Ultraviolett-sichtbar (engl.: <i>Ultraviolet-visible</i>)
VEGFR	Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Physikalische Einheiten

°C	Grad Celsius
%	Prozent
a.u.	Beliebige Einheit (engl.: <i>Arbitrary unit</i>)
cm	Zentimeter (10^{-2} m)
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
mg	Milligramm (10^{-3} g)
g	Gramm

h	Stunde ($3,6 \times 10^3$ s)
K	Kelvin
kDA	Kilodalton (10^3 Da)
kV	Kilovolt (10^3 V)
L	Liter
m	Meter
MHz	Megahertz (10^6 Hz)
min	Minute (60 s)
μ L	Mikroliter (10^{-6})
mL	Milliliter (10^{-3} L)
μ m	Mikromol (10^{-6} mol)
mmol	Millimol (10^{-3} mol)
mol	mol
nm	Nanometer (10^{-9} m)
ppm	Teile pro Million
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde

1. Einleitung

1.1. Anorganische Nanomaterialien

Nanomaterialien besitzen im Vergleich zu ihren Bulkmaterialien unterschiedliche biologische, chemische und physikalische Eigenschaften, wodurch ihr Interesse im Laufe der letzten Jahrzehnte immer weiter gestiegen ist.^[1,2] Durch ihr vielseitiges Potenzial wächst vor allem das Interesse in der Chemie, Biologie, Medizin und Physik. Ihr Anwendungsbereich ist breit gefächert und umfasst zahlreiche Gebiete, darunter die Katalyse, die Elektronikindustrie (z. B. zur Herstellung von Chipsätzen) sowie unter anderem die Medizin (z. B. für die Bildgebung oder den Medikamententransport).^[3] Der Fokus während der Herstellung konzentriert sich dabei vor allem auf die Größe, Form, und Zusammensetzung.^[4] Nanomaterialien weisen eine Größe von 1–100 nm in mindestens einer Raumdimensionen auf, wobei Nanopartikel (NP) eine zentrale Untergruppe dieser Materialien darstellen.^[5,6] Obwohl NP bereits seit der Antike verwendet wurden, ohne dass die Menschen damals ein Verständnis für ihre wissenschaftlichen Eigenschaften hatten,^[7] konnten die ersten wissenschaftlichen Erkenntnisse zu NP erst 1857 durch den englischen Chemiker und Physiker Michael Faraday gewonnen werden, der damit die Grundlagen für die wissenschaftliche Erforschung von NP legte.^[8–10] Erst 1959 als Richard Feynman den Vortrag „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ hielt, erzielte die Nanotechnologie ihre Aufmerksamkeit. Jedoch etablierte Norio Taniguchi erstmalig 1974 den Begriff „Nanotechnologie“ für Verfahren im Nanometerbereich.^[3] NP weisen aufgrund ihres im Vergleich zu Bulkmaterialien deutlich höheren Anteils an Oberflächenatomen, grundlegende Unterschiede in ihren Eigenschaften auf. Änderung in Größe und Morphologie der NP führen zu signifikanten Veränderungen ihrer chemischen, biologischen, physikalischen und optischen Charakteristika. Das im Verhältnis große Oberflächen-Volumen-Verhältnis führt dazu, dass ein erheblicher Anteil der Atome an der Partikeloberfläche lokalisiert ist, wodurch die Oberflächenenergie maßgeblich erhöht wird. Dadurch besitzen die NP mehr aktive Zentren, welche für Reaktionen relevant sind. Dadurch können NP in der Katalyse oder beim Medikamententransport genutzt werden.^[11–13]

1.2. Synthese von NP

NP lassen sich im Allgemeinen mit Hilfe des *Top-Down* oder des *Bottom-Up* Verfahrens herstellen, welche in Abbildung 1 dargestellt sind. Beim *Top-Down* Verfahren werden Bulkmaterialien durch physikalische Ansätze wie z. B. Kugelmöhlen, Lithographieverfahren,

Ultraschallbehandlung, Laserablationsabscheidung oder chemische Ansätze wie z. B. thermische Zersetzung zu nanoskalierten Teilchen zerkleinert.^[2,3,14] Der *Top-Down* Ansatz ermöglicht eine große Produktion von NP, bringt jedoch auch einige Einschränkungen mit sich, da die Synthese recht kostspielig ist und erlaubt nur eine begrenzte Kontrolle über die Partikelgröße, Morphologie und Verteilung.^[15,16]

Während des *Bottom-Up* Prozesses werden atomare und molekulare Vorläuferverbindungen (sogenannte Präkursoren) genutzt, um nanoskalige Cluster oder NP zu synthetisieren. Für die Herstellung von NP werden häufig nasschemische Methoden (z. B. Fällungsreaktionen, Sol-Gel-Verfahren, Hydrothermalsynthesen) oder lösungsmittelfreie Gasphasenverfahren (z. B. Aerosolprozesse, chemische und physikalische Gasphasenabscheidung) eingesetzt.^[14] Das *Bottom-Up* Verfahren bietet Vorteile gegenüber dem *Top-Down* Ansatz, da weniger Defekte entstehen sowie eine bessere Kontrolle über das Endprodukt und deren Homogenität erreicht wird. Für die weitere Anwendung z. B. in der Biomedizin, sind jedoch Reinigungsschritte erforderlich, um verbliebene Reaktanten zu entfernen.^[2,15,17]

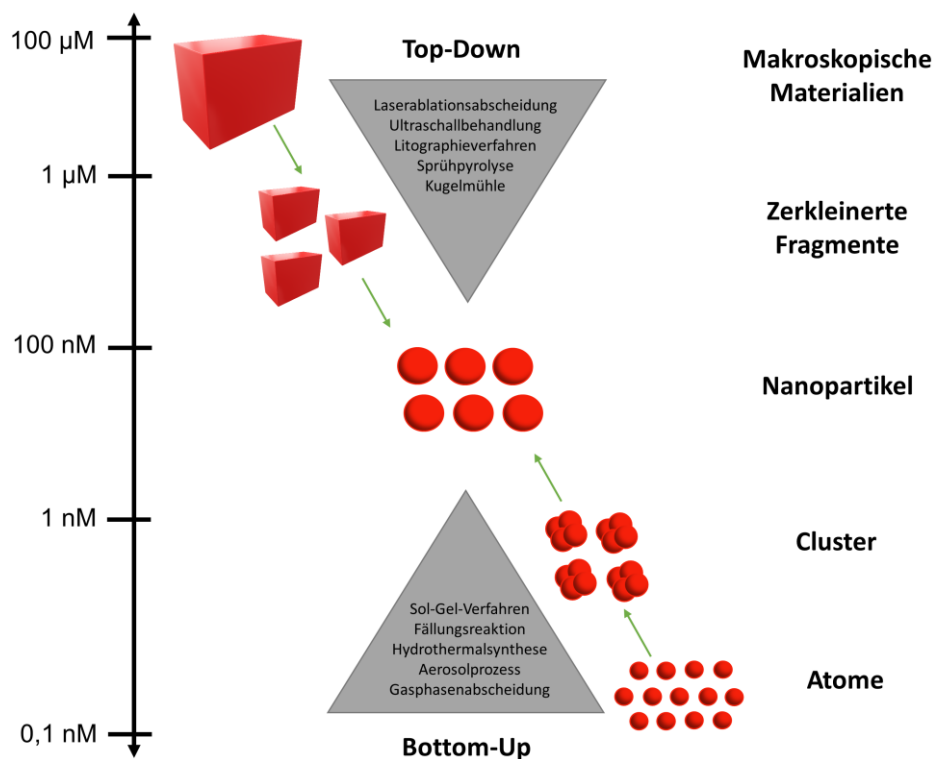


Abbildung 1: Darstellung der *Top-Down* und *Bottom-Up* Methode zur Herstellung von NP.

Die Größe, Form, Zusammensetzung und Kristallinität lassen sich durch die gezielte Wahl der Präkursoren, der Temperatur, der Reaktionszeit, des pH-Werts, des Reduktionsmittels und des

Lösungsmittels gezielt steuern. Diese Parameter müssen sorgfältig eingestellt werden, um NP mit einem definierten Durchmesser ohne Agglomerationen und einer möglichst monodispersen Größenverteilung herzustellen.^[18–21] Für die Herstellung von NP mit definierten Eigenschaften müssen insbesondere die Keimbildung und -wachstum gezielt gesteuert werden. Dieses Stadium kann mit Hilfe des Modells von LaMer und Dinegar erklärt werden. Obwohl das Modell ursprünglich zur Beschreibung des Wachstumsmechanismus von Schwefel-Hydrosolen entwickelt wurde, ist seine Anwendung auch auf NP übertragbar.^[22,23] Die Bildung kolloidaler Partikel läuft ausgehend von dem löslichen Monomer in drei Stufen ab, schematisch dargestellt in Abbildung 2. Die Kurve zeigt die Veränderung der Atomkonzentration des löslichen Monomers, die durch die Reduktion von Metallionen zu Metallatomen entsteht, in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die Sättigungskonzentration wird erreicht, wenn die Monomerkonzentration ihrer Löslichkeit entspricht. Unterhalb dieser kann es nicht zur Keimbildung kommen. Bei weiterer Monomerbildung wird die Lösung übersättigt, wobei zunächst nur instabile Keime ausgebildet werden, bis die kritische Übersättigung erreicht wird. Ab der kritischen Übersättigung bilden sich erst langsam Keime und beim Erreichen der maximalen Übersättigung beginnt die schnelle Keimbildung. Da die Monomere während des Schritts der Keimbildung verbraucht werden, sinkt die Konzentration schnell ab und die Keimbildung wird gestoppt. Nach der Keimbildung fängt der Prozess des Keimwachstums an. Dabei nehmen die Keime die noch vorhandenen Monomere auf und werden größer. Der Wachstumsprozess läuft so lange, bis die Konzentration wieder auf die Sättigungskonzentration abgesunken ist.^[24,25] Zur Herstellung von monodispersen Kolloiden ist die Trennung des Nukleations- und des Wachstumsschritts ausschlaggebend. Während des Wachstumsschritts liegt die Monomerkonzentration unterhalb der kritischen Übersättigung, sodass keine weiteren Keime gebildet werden. Dadurch wachsen ausschließlich die bereits vorhandenen NP weiter, was zu einer monodispersen Verteilung führt. Wenn die beiden Schritte nicht voneinander getrennt sind, können während des Wachstums weiterhin neue Keime entstehen. Die älteren Keime haben dann mehr Zeit zu wachsen, während die neu gebildeten Keime nicht mit dem Wachstumsprozess mithalten können und klein bleiben, sodass eine polydisperse Verteilung entsteht.^[26,27]

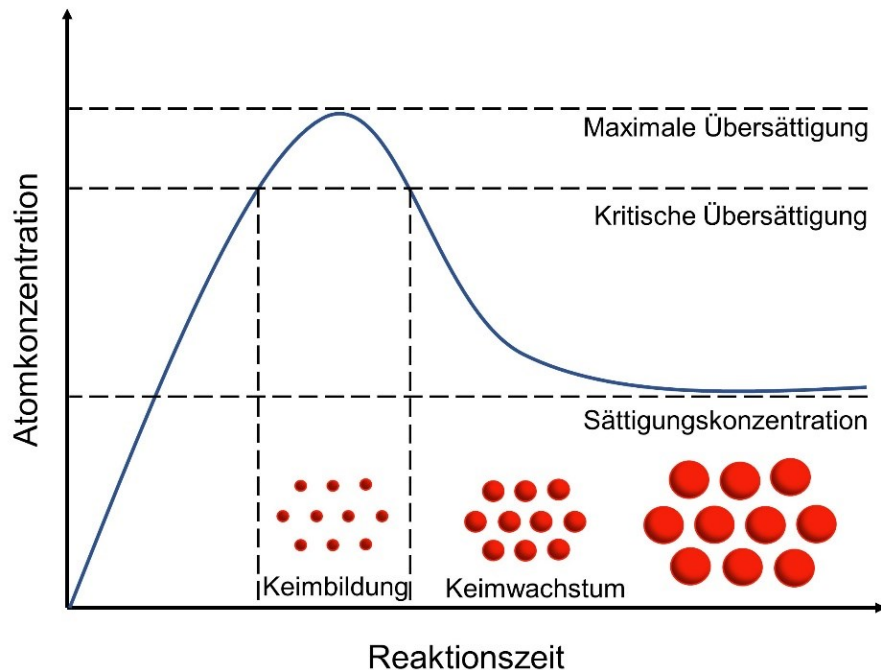


Abbildung 2: LaMer-Modell zur Beschreibung des Nanopartikelwachstums.

1.3. Stabilisierung von NP

Mit abnehmender Partikelgröße steigt der relative Anteil der Oberflächenenergie an der Gesamtenergie, wodurch der Zustand energetisch zunehmend ungünstig wird. Daher neigen die NP dazu zwangsläufig ihre Oberfläche durch Agglomeration oder Ostwald-Reifung zu verringern.^[27,28] Während bei der Agglomeration die nutzbare Oberfläche sinkt, verläuft die Ostwald-Reifung über die Auflösung kleinerer Partikel, wobei die gelösten Teilchen zu größeren Partikeln diffundieren und sich dort anlagern, wodurch diese weiterwachsen.^[29–31] In beiden Fällen wird ein energetisch günstigerer Zustand mit geringerer Gesamtoberflächenenergie erreicht. Um die Oberfläche der NP nach der Keimbildung zu stabilisieren und so insbesondere die Agglomeration zu verhindern, werden sogenannte Stabilisatoren eingesetzt. Diese können wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, die NP sterisch, elektrostatisch oder elektrosterisch (eine Kombination aus beidem) stabilisieren. Die sterische Stabilisierung kann durch die Adsorption von langkettigen organischen Verbindungen wie z. B. Polyvinylpyrrolidon (PVP), Oleylamin oder Ölsäure erfolgen. Eine elektrostatische Stabilisierung ist durch die Adsorption von Ionen wie z. B. H_3O^+ , OH^- , NO_3^- oder Citrat möglich.^[27] Bei der elektrosterischen Stabilisierung wirken die sterischen Hüllen und geladenen Gruppen gleichzeitig.^[32]

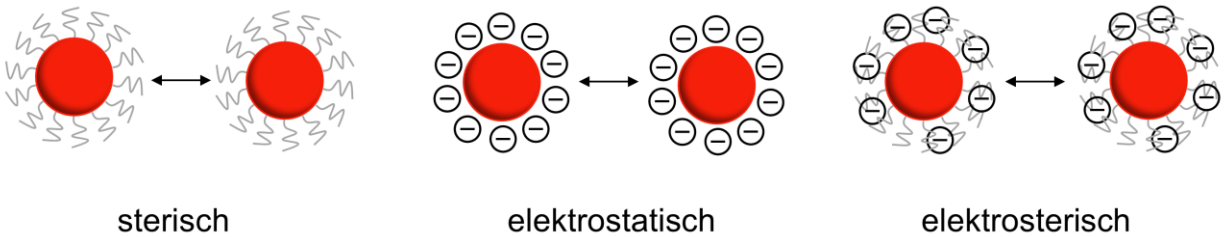


Abbildung 3: Schematische Darstellung der sterischen, elektrostatischen und elektrosterischen Stabilisierung der NP.

1.4. Goldnanopartikel (AuNP)

1.4.1. Herstellung von AuNP

Schon seit Jahrhunderten findet Gold vielfältige Anwendungen vor allem im medizinischen Bereich. In der Antike nutzten Kulturen in China, Indien und Ägypten Gold, beispielsweise in Kräutermischungen zur Gesundheitsförderung oder und im Westen zur Behandlung von Epilepsie, Lepra, Pest, Nervenleiden und oder Durchfall.^[33] Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde erstmals die bakteriostatische Wirkung von Gold untersucht. Es wurde festgestellt, dass Gold gegen *Bacillus tuberculosis* wirksam ist. Dies führte zur Entwicklung goldbasierter Tuberkulosetherapien und legte damit den Grundstein für die moderne Anwendung von Gold in der Arzneimitteltherapie.^[34] Später wurde Gold auch bei Erkrankungen wie einer Vielzahl von rheumatischen Erkrankungen wie Psoriasis-Arthritis oder rheumatoide Arthritis (entzündliche Erkrankungen der Gelenke).^[35] Der gängigste Ansatz zur Herstellung von AuNP ist die von Turkevich *et al.* im Jahr 1951 etablierte nasschemische Methode.^[36] Dabei wird Tetrachlorogoldsäure (HAuCl_4) mit Natriumcitrat als Reduktionsmittel und Stabilisator in Wasser unter Rückfluss zu Au^0 reduziert, was zur Bildung von AuNP mit einer Größe von 10 bis 20 nm führt, wie ich Abbildung 4 repräsentiert.^[36,37]

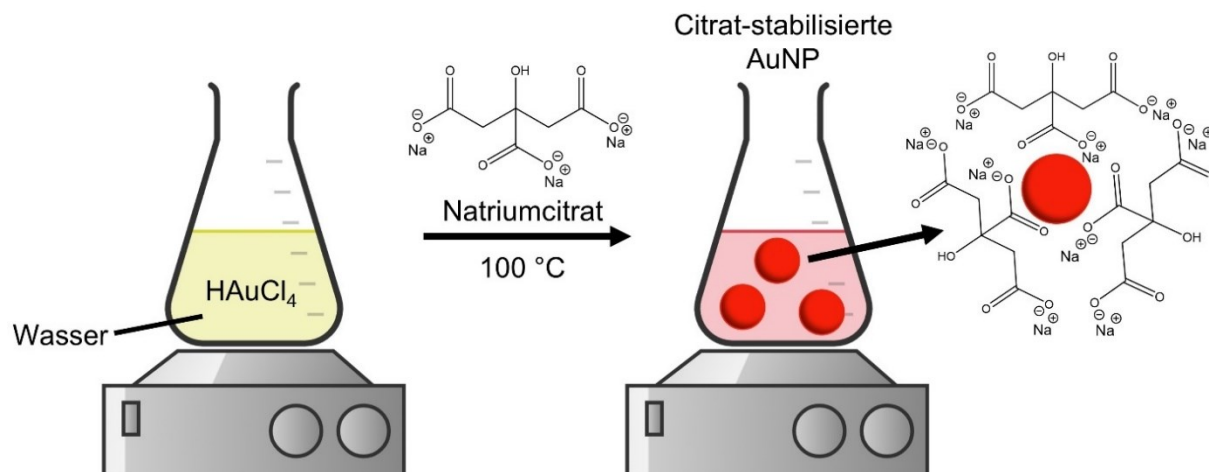


Abbildung 4: Prinzip der Turkevich *et al.* Methode zur Herstellung von AuNP.

Die Größe der AuNP kann durch Variation der Synthesebedingungen wie Temperatur, Lösungsmittel, pH-Wert sowie des Verhältnisses zwischen Goldpräkursor und Natriumcitrat, gezielt beeinflusst werden.^[13] Eine längere und intensivere Erhitzung der Goldpräkursorlösung führt in der Regel zu einem größeren durchschnittlichen Partikelradius. Darüber hinaus lassen sich Form und Größe der AuNP ebenfalls durch die Nutzung unterschiedlicher Reduktionsmittel wie z. B. Natriumborhydrid weiter variieren. Auch die Wahl der verwendeten Stabilisierungsliganden sind verantwortlich für die Erzeugung von AuNP in unterschiedlichen Formen.^[38] Es gibt weitere gängige Verfahren für die Herstellung von AuNP. Mit der 1994 veröffentlichte Brust-Schiffrin-Methode können AuNP in organischen Lösungsmitteln synthetisiert werden.^[39] Bei der Eintopfsynthese erfolgt die Reduktion und gleichzeitige Stabilisierung der AuNP durch Polymere wie Polyvinylalkohol (PVA) oder Polyethylenimin (PEI).^[40,41]

1.4.2. Morphologien von AuNP

AuNP werden am häufigsten in sphärischer Form hergestellt. Diese Partikel sind leicht synthetisierbar und besitzen eine klare, intensive lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LOPR). Die LOPR entsteht durch das Einfallen von elektromagnetischer Strahlung, wodurch die Leitungsbandelektronen zu kollektiven und kohärenten Schwingungen, sogenannten Plasmonen, angeregt werden und somit eine frequenzabhängige Lichtabsorption bzw. Elektroschwingung an der Oberfläche entsteht.^[42] Durch die Anregung der Plasmonenresonanz im sichtbaren Spektralbereich kommt es zur Farbigkeit der AuNP. Eine stabile wässrige Dispersion sphärischer AuNP, die eine Größe von etwa 15 nm besitzen, weisen ein Absorptionsmaximum bei etwa

520 nm auf, was ihr eine charakteristische rötliche Färbung verleiht. Bei einer bathochromen Verschiebung auf bis zu 580 nm, welche durch Agglomeration entstehen kann, ändert sich die Farbe der Dispersion in den violetten bzw. bläulichen Bereich.^{[43][44]} Dank ihrer LOPR-Eigenschaft können die NP in Sensorik, Bildgebung oder Phototherapien genutzt werden.^[45]

Neben den sphärischen Partikeln existieren jedoch eine Vielzahl an morphologischen Varianten, wie in Abbildung 5 zusammengefasst, die insbesondere durch anisotrope Formen bemerkenswerte Eigenschaften für die Diagnostik und Photothermaltherapie aufweisen.^[46]

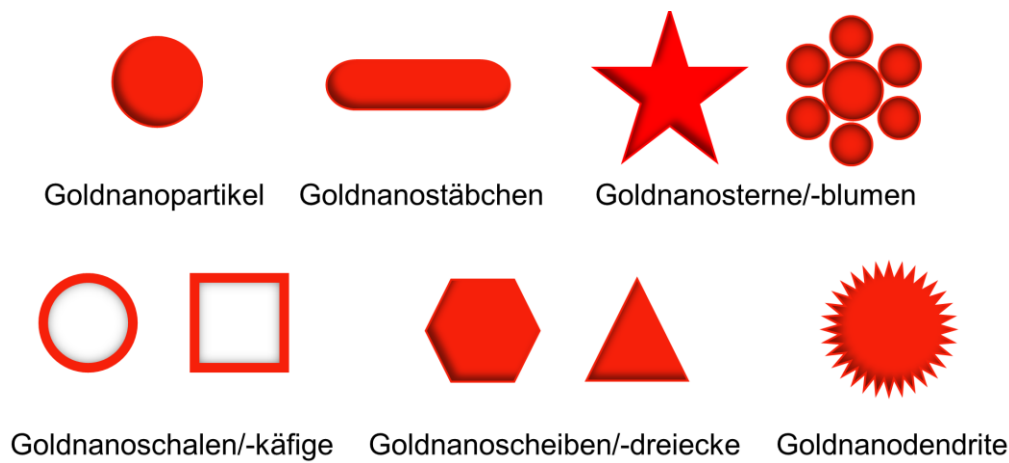


Abbildung 5: Darstellung verschiedener Morphologien von Goldnanomaterialien.

Anisotrope Goldnanomaterialien können aufgrund ihrer Form eine Plasmonenbande im Nahinfrarot-(NIR)-Bereich aufweisen, wodurch sie nahinfrarotes Licht stark absorbieren, während das umliegende Gewebe dieses Licht nur schwach absorbiert. Zusätzlich besitzen sie eine oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl.: *Surface-enhanced Raman scattering*, SERS), wodurch ein lokal verstärktes elektromagnetisches Feld entsteht und schon geringe Mengen von Molekülen nachgewiesen werden können. Die SERS kann elektromagnetisch oder chemisch auftreten. Bei der elektromagnetischen SERS regt einfallendes Licht z. B. Laserlicht, die Plasmonen, auf der Goldoberfläche an. Durch die Anregung der Oberflächenplasmonen entstehen lokal verstärkte elektromagnetische Felder, insbesondere an sogenannten Hotspots (z. B. scharfe Kanten oder Ecke wie bei Goldnanostäbchen (AuNR), Goldnanosterne (AuNS) oder Goldnanoblumen (AuNB)). Moleküle, die sich in diesen Bereichen befinden, erfahren eine starke Feldverstärkung, wodurch ihr Raman-Signal deutlich intensiver wird.^[47–49] Bei der chemischen SERS wechselwirken adsorbierende Moleküle direkt mit der Goldoberfläche, wodurch sich die Polarisierbarkeit verändert und so zusätzlich das Raman-Signal verstärkt wird. Beide Beiträge

lassen sich nicht einfach voneinander trennen.^[50,51] Im Folgenden werden gängige anisotrope AuNP näher erläutert.^[52]

AuNR weisen ein Aspektverhältnis (Länge/Breite) auf und besitzen daher zwei Plasmonenresonanzen, die transversale, ähnlich wie bei sphärischen AuNP und die longitudinale, die in den NIR-Bereich bis maximal 1300 nm verschiebbar ist.^[53]

Verzweigte Nanostrukturen wie AuNS oder AuNB besitzen scharfe Kanten, die zu einer starken LOPR führen. Dadurch sind sie beliebte Kandidaten in der Biosensorik, Bildgebung und Zellerkennung.^[46]

Goldnanoschalen oder -käfge (AuNK) sind hohle oder beschichtete Strukturen, deren Plasmonenresonanz durch den Kern und die Schalendicke bzw. Wanddicke und Hohlraumgröße steuerbar ist.^[54] Sie können Licht im NIR absorbieren, was sie für die photothermische Therapie nutzbar macht und ihr Hohlraum ermöglicht den Einsatz als Träger für Medikamente.^[55,56]

Goldnanoscheiben oder -dreiecke (AuND) liegen als flache, plättchenförmige Partikel in einer Dreiecksform vor. Sie besitzen eine stark bis in den NIR-Bereich anpassbare Plasmonenresonanz und reagieren empfindlich auf Umgebungsbedingungen, was sie für die Sensorik interessant macht.^[46]

Goldnanodendrite besitzen eine baumartige Struktur aus Stamm-, Zweig- und Blattkomponenten. Ähnlich wie AuNS und AuNB weisen sie eine starke LOPR auf und durch ihre ausgeprägten SERS- Eigenschaften werden sie in der Katalyse oder in der Biosensorik genutzt.^[57,58]

1.4.3. (Physikochemische) Eigenschaften von AuNP

AuNP besitzen eine hohe Biokompatibilität,^[59] ihre Synthese ist relativ einfach, kostengünstig^[60] und durch das Vorhandensein der LOPR ist die Charakterisierung unkompliziert.^[61] Die Form,^[62] die Größe,^[63] sowie die Funktionalität der AuNP lässt sich während der Synthese leicht steuern^[64] und die Oberfläche kann unproblematisch mit Biomolekülen wie z. B. Proteinen oder Arzneimitteln modifiziert werden.^[65]

Neben Form und Beschaffenheit spielen auch Oberflächenmodifikation und -ladung eine wesentliche Rolle bei der Einstellung der NP-Eigenschaften. Durch die Wahl der Liganden kann die Löslichkeit und Reaktivität der NP verändert werden. Beispielweise wurde gezeigt, dass kleine Mengen Alkylammonium-Tenside in Wasser dispergierte AuNP durch die Bildung einer hydrophoben Oberflächenbeschichtung in organischen Lösungsmitteln löslich machen.^[66–70]

Ebenfalls kann durch die Modifikation die Oberflächenladung positiv, negativ oder neutral sein. Positiv geladene AuNP zeigen eine stärkere Wechselwirkung mit Zellmembranen, was jedoch häufig mit einer höheren Toxizität einhergeht. Negativ oder neutral geladene AuNP weisen hingegen eine höhere Stabilität im Blut auf und neigen zu geringer und unspezifischer Bindung.^[71,72]

1.4.4. Bindungsaffinität von AuNP zu anderen Molekülen

Aufgrund ihrer chemischen Modifizierbarkeit bilden AuNP eine ideale Plattform, um eine Vielzahl von Liganden über kovalente oder nicht kovalente Wechselwirkungen an ihrer Oberfläche zu binden. Ob AuNP dabei eine starke Wechselwirkung mit bestimmten Verbindungen eingehen, lässt sich mit Hilfe des Konzeptes der „harten und weichen Säuren und Basen“ (engl.: *hard and soft acids and bases*, HSAB) erklären.^[73] Dieses besagt, dass harte Lewis-Säuren (Elektronenakzeptoren) bevorzugt mit harten Lewis-Basen (Elektronendonatoren) reagieren, während weiche Lewis-Säuren bevorzugt mit weichen Lewis-Basen interagieren. Harte Säuren und Basen zeichnen sich durch eine hohe Ladungsdichte und damit ein großes Ladungsradius-Verhältnis aus, wohingegen weiche Säuren und Basen eine geringe Ladungsdichte und somit ein kleineres Ladungsradius-Verhältnis besitzen. Demnach kann zwischen Gold und schwefelhaltigen Verbindungen eine starke kovalente Wechselwirkung entstehen, da Gold als weiche Säure eine starke Affinität zu weichen Basen wie Thiolen aufweist, wodurch diese ideal zur Oberflächenmodifikation von AuNP geeignet sind.^[60] Neben der Verwendung von Thiolen können AuNP ebenfalls durch Phosphine stabilisiert werden.^[37,74] Eine nicht kovalente Bindung basiert hingegen auf intermolekularen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen-, Van-der-Waals- oder hydrophoben Wechselwirkungen und haben den Vorteil, dass die chemische Struktur des Moleküls unverändert bleibt. Auf diese Weise können beispielsweise Medikamente an die AuNP-Oberfläche adsorbiert werden, ohne ihre biologische Wirkung zu beeinträchtigen.^[75]

1.5. Medizinische Anwendungen von AuNP

AuNP kommen aufgrund ihrer besonderen Vorteile und Eigenschaften in der Biomedizin immer häufiger zum Einsatz. Sie finden Anwendung in der thermischen Ablation, als Strahlentherapieverstärker, in der Arzneimittel- und Genverabreichung, bei der Erkennung von Krebszellen, in der Biosensorik, Diagnostik, bei Immunoassays, aufgrund ihrer antimikrobielle

Aktivität sowie in der optischen Bildgebung und vielen weiteren Bereichen.^[3,76] Durch ihr effizientes Gewebe-Penetrationsvermögen und der ausgezeichneten Nachverfolgbarkeit im Körper eignen sich AuNP als Werkzeug für die Theranostik, die eine Kombination aus molekularer Diagnostik und anschließender gezielter Therapie ermöglicht.^[77] Sie dienen als geeignete Transportvehikel, da sie problemlos mit Peptiden oder Targeting-Liganden,^[78] (Moleküle, die die AuNP gezielt zu bestimmten Zellen oder Geweben führen) modifiziert werden können.^[79,80]

1.5.1. Therapie

1.5.1.1. Bedeutung der Oberflächenmodifikation für die Nutzung von AuNP als Trägermaterialien

Für die Anwendung von AuNP als Trägermaterialien ist eine gezielte Kontrolle der Größe, Morphologie, Monodispersität und Oberflächenfunktionalisierung entscheidend. Zahlreiche Studien belegen, dass die physikochemischen Eigenschaften von AuNP ihr Verhalten, ihre Wirksamkeit sowie ihre kolloidale Stabilität und Dispergierbarkeit bei Veränderung der Umgebungsparameter entscheidend beeinflussen. Für viele biomedizinischen Anwendungen ist es erforderlich, dass die AuNP sowohl in wässrigen, in organischen Lösungsmitteln oder dem Zellkulturmedium gut dispergieren und stabil bleiben, da einige pharmazeutische Wirkstoffe nur in organischen Lösungsmitteln löslich sind oder ihre Freisetzung im Zellkulturmedium erfolgt. Dadurch kann der Wirkstoff effizient auf der AuNP-Oberfläche beladen werden, ohne dass die Partikel agglomerieren. So kann eine höhere Beladung erreicht werden, wodurch mehr Wirkstoff in die Krebszellen gelangen kann.^[81] Um die Stabilität der AuNP für die Anwendung als Transportmittel zu gewährleisten, werden häufig biokompatible Polymere wie z. B. Polyvinylalkohol (PVA), Polyethylenglykol (PEG) oder Polyvinylpyrrolidon (PVP) eingesetzt, siehe Abbildung 6.^[82]

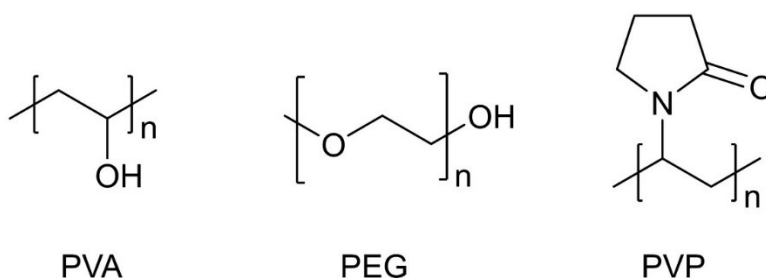


Abbildung 6: Chemische Strukturen der Polymere PVA, PEG und PVP, die zur Stabilisierung von AuNP eingesetzt werden können.

Dabei wirken die Polymere als sterische oder elektrostatische Stabilisatoren und können eine Schutzhülle um die AuNP bilden und so die Wechselwirkung zwischen den Partikeln minimieren, wie in Abbildung 7 zu sehen ist. PEG, mit einem Molekulargewicht unter 20.000 g/mol, wird dabei am häufigsten als Stabilisator für AuNP in der Nanomedizin eingesetzt, was auch PEGylierung genannt wird. Somit kann nicht nur die Agglomeration der AuNP verhindert, sondern auch ihre Biokompatibilität erhöht, die Bluthalbwertszeit^[83] (Zeit, bis die Konzentration im Blut auf 50 % gesunken ist)^[84] verlängert und das Ausscheiden durch das retikuloendotheliale System (RES) verhindert werden. Dabei wurde festgestellt, dass PEG beschichtete AuNP mit einem höheren Molekulargewicht (5000 Da) stabiler in Wasser bleiben als die mit einem niedrigen Molekulargewicht (2000 Da).^[83]

Neben der Stabilisierung ermöglicht die Polymerbeschichtung eine gezielte Kontrolle der Oberflächenchemie, was neben dem Medikamententransport auch für die Zellaufnahme eines Wirkstoffes relevant ist. Durch supramolekulare Wechselwirkungen kann der Wirkstoff in die Polymerhülle eingebettet werden, wobei seine chemische Struktur erhalten bleibt und unerwünschte Reaktionen vermieden werden.^[85]

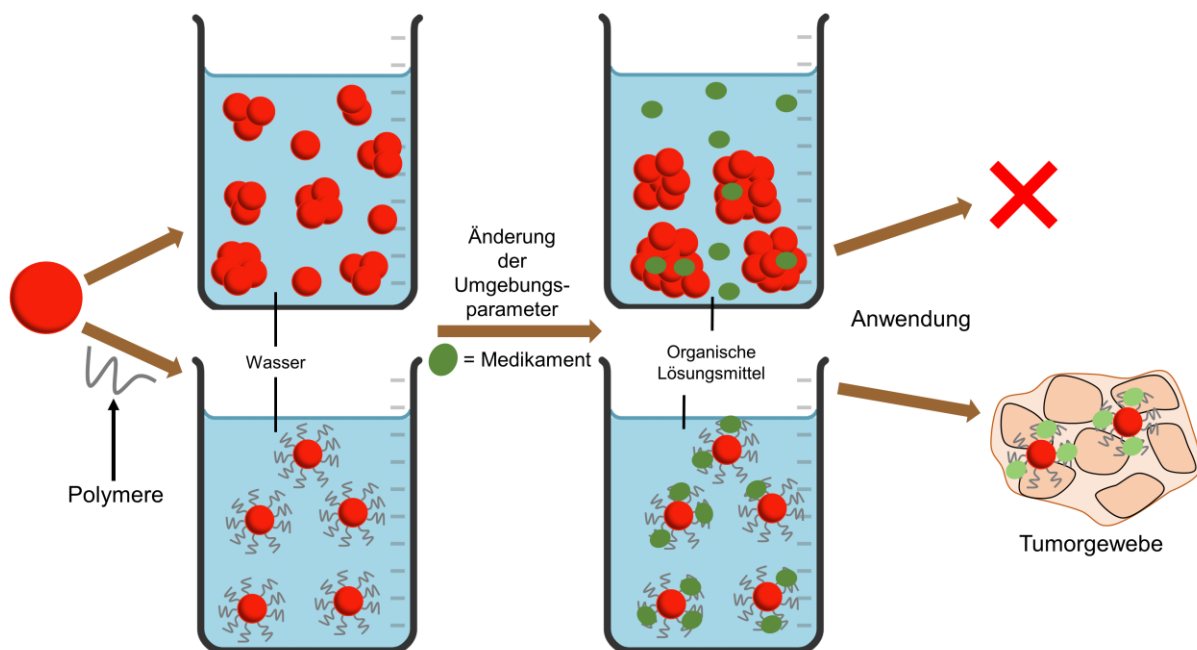


Abbildung 7. Veranschaulichung des Einflusses von Umgebungsparametern für die Stabilität der AuNP und dessen Anwendung.

1.5.1.2. Zellaufnahme der AuNP

Für eine effiziente Wirkstofffreisetzung ist es entscheidend, dass AuNP gezielt mit der Zelloberfläche interagieren und anschließend über intrazelluläre Transportmechanismen in die Zelle gelangen.^[86] Zwar ermöglicht der erhöhte Permeabilitäts- und Retentions(EPR)-Effekt eine verstärkte Anreicherung von AuNP im Tumorgewebe, das tatsächliche Eindringen in die Zellen erfolgt jedoch erst über endozytotische Wege.^[86]

Die Grundlage des EPR-Effekts liegt in der defekten Gefäßstruktur des Tumorgewebes, wie in Abbildung 8 visualisiert. Da Tumore aufgrund der unkontrollierten Zellteilung rapide heranwachsen, wird für das Wachstum eine erhöhte Nährstoffaufnahme benötigt, die rasch durch die Blutgefäße in das Tumorgewebe eindringen müssen. Um dies zu gewährleisten, weisen die Blutgefäße des Tumorgewebes eine unregelmäßige Struktur auf, wodurch größere Zwischenräume (Endothelporen) zwischen den (Endothel)Zellen entstehen. Aufgrund der vergrößerten interendothelialen Spalten in den Tumorgefäßen, die Größen von etwa 200 nm bis 1200 nm erreichen können, ist das Eindringen der AuNP in das Tumorgewebe möglich. In gesundem Gewebe hingegen, sind die Gefäßzwischenräume typischerweise kleiner als 10 nm, sodass eine Penetration der AuNP aufgrund ihrer Größe ausbleibt.^[8,87–90]

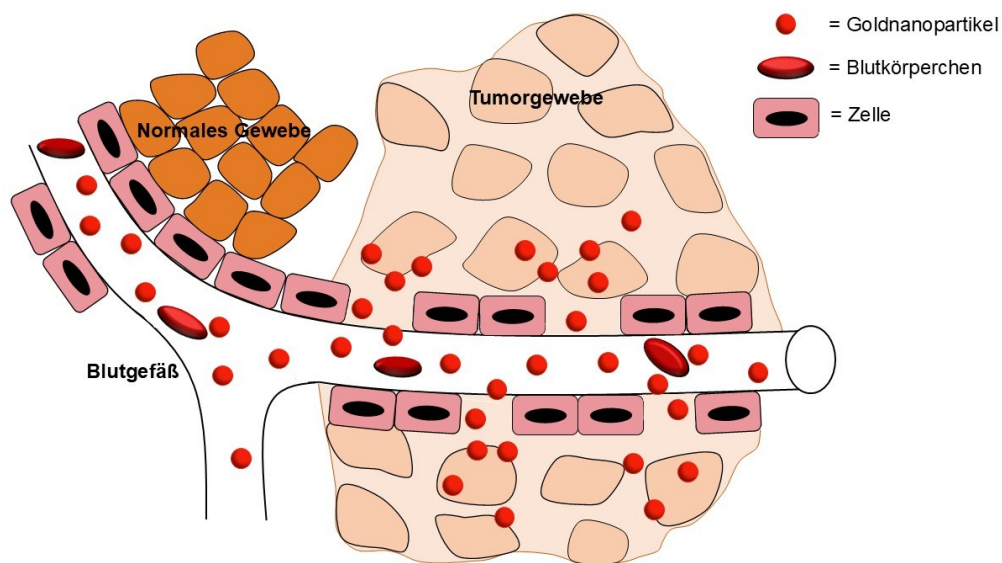


Abbildung 8: Illustration der Funktionsweise des EPR-Effekts von AuNP.

Während der EPR-Effekt eher eine passive Anreicherung von AuNP im Tumorgewebe ermöglicht, bietet das aktive Targeting eine zusätzliche Möglichkeit die Selektivität zu erhöhen. Dabei werden zielorientierte Moleküle, z. B. Liganden oder Antikörper, an die AuNP-Oberfläche gebunden,

sodass diese spezifisch an Rezeptoren von Tumorzellen binden können. Auf diese Weise ist eine ungewollte und unkontrollierte Freisetzung zytotoxischer Wirkstoffe vermindert, was insbesondere für die Anwendung in der photothermischen Therapie (PTT) (siehe Abschnitt 1.5.1.5.3) oder der gezielten Arzneimittelabgabe von Vorteil ist.^[55,91–93]

Um ihre Wirkung zu entfalten, müssen AuNP nach der Anreicherung im Tumorgewebe in die Zellen gelangen. Dabei interagieren die AuNP, die sich im extrazellulären Milieu einer Zelle befinden, mit der Plasmamembran der Zellaußenseite, woraufhin die AuNP in die Zelle internalisiert werden. Dieser Prozess wird als Endozytose bezeichnet und läuft in mehreren Stufen ab. Zuerst bildet die Zellmembran eine Invagination um die AuNP und stülpt sie so in die Plasmamembran ein. Dann schnürt sich die Membraneinstülpung ab und bildet ein membrangebundenes Vesikel, dies wird als Endosom bezeichnet. Die Endosomen bewegen sich entlang des Zytoskeletts, insbesondere der Mikrotubuli, durch die Zelle und transportieren die AuNP zu spezialisierten Vesikeln, in denen eine Sortierung nach Zielorten erfolgt. Endosomen treten in unterschiedlichen Ausprägungen auf, da sie über verschiedene endozytische Mechanismen gebildet werden, die sich in Zusammensetzung und Funktion unterscheiden und an unterschiedlichen Bereichen der Zellmembran gebildet werden. Je nach Ausprägung können die AuNP danach in verschiedene intrazelluläre Kompartimente abgegeben werden, zurück in das extrazelluläre Milieu ausgeschleust werden oder zwischen den Zellen weitergegeben werden.^[94,95]

1.5.1.3. Nanotoxizität

Durch AuNP gibt es neue Wege in der Krankheitstherapie. Der Einsatz hängt jedoch maßgeblich von ihrem Toxizitätsprofil ab. Es kann von Biokompatibilität gesprochen werden, wenn im Allgemeinen durch die Interaktion von AuNP und Wirt keine negativen Folgen wie oxidativer Stress, DNA-Schäden, Mutagenese oder Apoptose hervorgerufen werden.^[96] In vielen wissenschaftlichen Studien wurde über die Biokompatibilität von AuNP berichtet.^[43,97–101] Die Zytotoxizität und Biokompatibilität der AuNP hängen von vielen verschiedenen Parametern ab, welche in Abbildung 9 veranschaulicht sind. Dazu gehören die physikochemischen Eigenschaften der AuNP wie Größe, Form, Oberflächenladung, Agglomerationszustand, Oberflächenbeschichtung, Beschichtungsstruktur,^[102] Gewebeverteilung, Gewebeabsorption, Zelltyp,^[103] die Art der Verabreichung (oral, intraperitoneal, intravenös) Dosishöhe und Expositionsdauer.^[90]

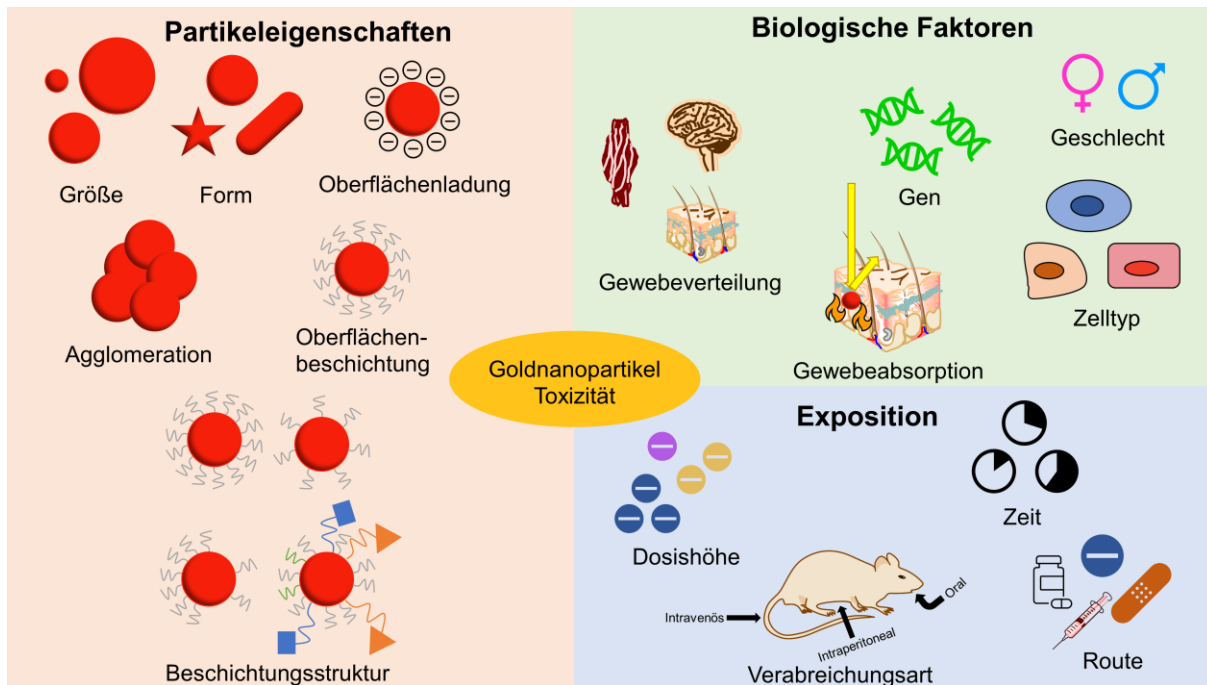


Abbildung 9: Übersicht der wichtigsten Parameter, die die Toxizität von AuNP beeinflussen.

Im Allgemeinen wird in der Literatur berichtet, dass kleine AuNP (4–5 nm) ein höheres Toxizitätspotenzial aufweisen als größere AuNP (18–20 nm).^[103] Die AuNP werden über Endozytose aufgenommen und über Exozytose ausgeschieden. Die höhere Aufnahme der kleineren AuNP tritt auf, da sie weniger Energie und Rezeptoren benötigen, um aufgenommen zu werden, was ihre Toxizität erhöhen kann. Bei größeren AuNP ist die Aufnahme begrenzt, da hier nicht genug Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sein könnten, wodurch eine Internalisierung beschränkt ist.^[104] Es wurde gezeigt, dass AuNP <10 nm sich in viele Organen wie z. B. Leber, Milz, Niere, Hoden, Lunge und im Blut anreichern^[105] und AuNP mit einer Größe von 30 nm in der Milz.^[106] Bei größeren AuNP >65 nm ist die renale Filtration gestört, wodurch sie über das retikuloendotheliale System aus dem Blut entfernt werden und dazu neigen sich in Milz oder Leber zu sammeln.^[103,105,106] 2019 untersuchten Wissenschaftlern ebenfalls die Form der AuNP und zeigten, dass AuNS die höchste Toxizität, AuNR eine signifikante Toxizität und AuNP die geringste Toxizität aufweisen.^[107] Durch die höhere Anzahl an Atomen an den Winkeln und Kanten, können stärkere Wechselwirkungen mit Biomolekülen auftreten, wodurch die Formen Stäbchen und Sterne eine höhere Toxizität aufweisen.^{[96][106]} Bei ähnlicher Größe der Goldnanomaterialien kann die Geometrie auch deren Bioverteilung, zelluläre Aufnahme, Ablagerung und die Ausscheidung (Clearance) verändern.^[108]

Um die Toxizität von AuNP zu verringern können diese mit verschiedenen Polymeren wie Polyethylenglykol (PEG), Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA), Polymilchsäure (PLA), Lipiden und weiteren Molekülen funktionalisiert werden. Durch die Oberflächenmodifikation kann eine Vorhersage getroffen werden, wie toxisch die AuNP sind, da die Zelloberflächen durch ihre Oberflächenmoleküle wie Proteine, Zucker oder Phospholipide unterschiedlich mit der AuNP-Oberfläche interagieren. Da die Oberflächenbeschaffenheit maßgeblich die Toxizität der AuNP bestimmt, zählt die gezielte Veränderung der Oberflächeneigenschaften zu den gängigsten Ansätzen, um die Toxizität der AuNP zu verringern.^[102] PEG wird mit am häufigsten als Beschichtungsmaterial eingesetzt, da es die Stabilität und Biokompatibilität der AuNP verbessert, indem es die Wechselwirkungen mit biologischen Proben reduziert und dadurch sowohl die zelluläre Aufnahme als auch die Toxizität der AuNP beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass 20 und 40 nm große AuNP@PEG eine Zellaufnahme und Transfektionseffizienz von über 45 % besaßen.^[109] Die Transfektionseffizienz gibt dabei an, wie erfolgreich genetisches Material wie DNA oder RNA in die Zellen eingebracht und dort von den Zellen exprimiert wird, also in das entsprechende Protein oder RNA umgesetzt.^[110] Gleichzeitig zeigen die AuNP eine geringere Toxizität und können als Trägersysteme für DNA oder Medikamente verwendet werden.^[103,109] Biokinetische Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass AuNP@PEG nach intravenöser Injektion eine verlängerte Zirkulation im Blut aufweisen und sich vor allem in der Leber und eine kleine Menge in der Lunge und Milz akkumulieren.^[105] Die größenabhängige Toxizität von AuNP@PEG wurde ebenfalls untersucht. 5 nm große AuNP@PEG sammelten sich am meisten im Herzen und den Nieren an, wurden aber auch im Knochenmark gefunden. In der Leber akkumulierten sich vor allem AuNP@PEG mit einer Größe von 10 nm und AuNP@PEG mit einer Größe von 30 nm befanden sich vermehrt in der Milz.^[106] Zhang *et al.* zeigten, dass AuNP@PEG mit einer Größe von ca. 5 nm die Apoptose signifikant induzieren.^[111] Die Oberflächenladung, welche durch die oben genannten Moleküle beeinflusst werden kann, stellt einen weiteren wichtigen Faktor dar, der die Toxizität von AuNP bestimmt.^[112] Goodman *et al.* zeigten, dass bei gleicher Konzentration kationische AuNP toxischer wirken, während anionische AuNP bei Erythrozyten ungiftig sind. Ungeladene AuNP verursachten in dieser Studie keinerlei Nebenwirkungen.^[113] Durch die kationische Oberflächenladung können sich Plasmaproteine an die AuNP binden und so eine Proteinkorona ausbilden, welche wiederum von Makrophagen aufgenommen werden kann. Dies führt zu einer erhöhten Zellaufnahme und kann zelluläre Schäden verursachen. Daher lösen kationische AuNP eine deutlich stärkere Immunantwort aus als anionische oder neutral geladene AuNP.^[102,114] Für die zelluläre Aufnahme tragen jedoch neben elektrostatischen Wechselwirkungen auch hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie

Ligand-Rezeptor-Interaktionen bei. Die gebildete Proteinkorona kann sowohl die Oberflächeneigenschaften der AuNP als auch die Funktion und Struktur der Proteine verändern, welche wiederum Einfluss auf die Toxizität hat.^[115] Die Agglomeration kann ebenfalls die Toxizität beeinflussen. So zeigten Yang *et al.*, dass agglomerierte AuNP toxischer als nicht agglomerierte AuNP waren. Durch die oben genannten Moleküle kann die Agglomeration verhindert werden.^[96]

Um ein Verständnis der Toxizität gegenüber lebenden Organismen zu bekommen, müssen sowohl in-vitro als auch in-vivo Studien untersucht werden. In-vitro Studien sind kostengünstiger, schneller und einfacher durchzuführen, spiegeln aber nicht die Komplexität von Mehrgewebeorganismen wie Säugetieren wider. In-vivo Studien hingegen liefern diesen umfassenden Einblick in die systemische Toxizität von AuNP, sind jedoch zeit- und kostenaufwändiger und werfen zudem ethische Fragen auf. Dennoch sind in-vitro Tests notwendig, da sie Basisdaten zu der Sicherheit der AuNPs liefern und so auf die in-vitro Daten zurückgegriffen werden kann, um mögliche Auswirkungen auf Organ- oder Organismusebene abzuleiten.^[96]

Die Toxizität kann mit Hilfe von verschiedenen in-vitro Tests untersucht werden, die sich auf unterschiedliche Messparameter wie Bestimmung der Zelllebensfähigkeit und -proliferation, Enzymaktivität, Membranintegrität, oxidativem Stress oder DNA-Schäden fokussieren.^[96] Darunter zählen Methoden wie der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-(MTT)-Test,^[116] der Laktatdehydrogenase-(LDH)-Test,^[117] der 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat-(DCFDA)-Test,^[118] der Adenosintriphosphat-(ATP)-Test^[119] oder die Durchflusszytometrie wie Annexin V und Propidiumiodid Färbung.^[120]

Für den Einsatz von AuNP in den menschlichen Körper sind in-vivo Tests an Tiermodellen unabdingbar. Es muss untersucht werden, ob die AuNP in die Zellen oder Gewebe eindringen, wie sie sich im Organismus verteilen sowie in welchem Maße sie biologisch abgebaut und eliminiert werden. Um die Bioverteilung in Gewebe und Organen sowie die Pharmakokinetik, Clearance und Organwirkungen der AuNP zu untersuchen, werden meistens Ratten oder Mäuse als Tiermodelle eingesetzt. Dabei werden Parameter wie Blutparameter, Entzündungs- und Immunreaktionen sowie Veränderungen der Fortpflanzungsorgane berücksichtigt.^[96] Diese Parameter oder Veränderungen können mithilfe von Elektronen- oder Fluoreszenzmikroskopie,^[121] induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS),^[122] Blutanalysen,^[123] Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT),^[124] dynamischer Positronen-Emissions-Tomographie (PET)^[125] oder SERS bestimmt werden.^[126,127]

1.5.1.4. AuNP als Medikamententransporter

Für die Tumorbehandlungen eröffnet der in Abschnitt 1.5.1.2. beschriebene Mechanismus die Möglichkeit, mit Wirkstoffen beladene und mit Targeting-Liganden wie z. B. Aptamere, Antikörper, Peptide oder siRNA funktionalisierte AuNP gezielt in Krebszellen einzuschleusen, siehe Abbildung 10.^[128,129] Diese binden spezifisch an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und ermöglichen dadurch eine selektive Aufnahme der AuNP in bestimmte Gewebe. Dies ermöglicht eine ortsspezifische Abgabe von Therapeutika, wodurch Wirksamkeit und Bioverfügbarkeit erhöht und gleichzeitig Nebenwirkungen reduziert werden können.^[130–132] Darüber hinaus ist eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung über einen definierten Zeitraum mit klar festgelegter Dosierung möglich, unter dem Einsatz aufwendiger, stimuliresponsiver Systeme. Ein weiterer Vorteil von AuNP liegt in ihrer Fähigkeit, als Trägersysteme für Kombinationstherapien zu dienen, indem sie mehrere Wirkstoffe oder diagnostische Substanzen wie z. B. Kontrastmittel gleichzeitig beladen und transportieren können.^[133] Zusätzlich bieten AuNP den eingebetteten Arzneimitteln Schutz, indem sie diese vor starken Umgebungsbedingungen wie z. B. pH-Schwankungen bewahren und die renale Clearance verringern.^[134,135]

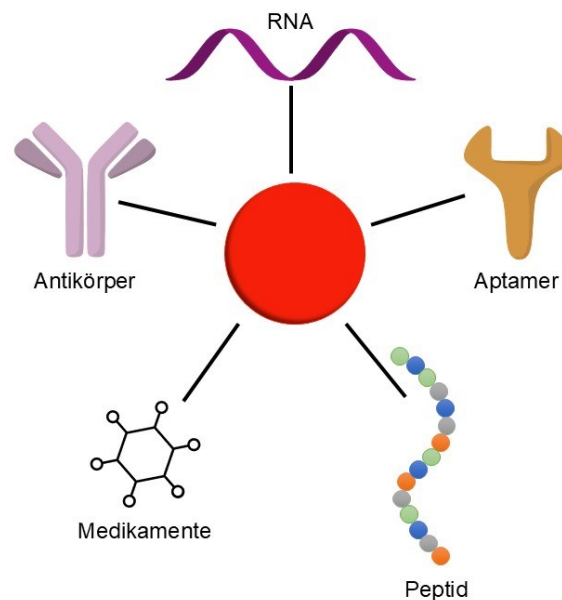


Abbildung 10: Beispiele für Wirkstoffe und Liganden, mit denen die AuNP für die Krebstherapie beladen werden können.

1.5.1.5. AuNP in licht- und wärmebasierter Krebstherapie

Darüber hinaus können AuNP als photothermisches Therapeutikum genutzt werden, um Tumorzellen selektiv thermisch zu zerstören. Hierfür werden die AuNP so angepasst, dass ihre Plasmonen im nahen Infrarotbereich liegt, wodurch sie dieses Licht absorbieren können. Nach der Injektion in das Tumorgewebe und anschließender Bestrahlung werden die AuNP optisch angeregt und erhitzen sich, wodurch das umliegende Tumorgewebe abgetötet wird. Infrarotlicht kann dabei tief in das Gewebe eindringen, ohne das gesunde Gewebe zu schädigen.^[42] Die Standardtherapien zur Krebsbehandlung basieren auf einer Kombination aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie, wodurch Krebszellen abgetötet werden sollen. Der große Nachteil der Standardbehandlungen ist, dass die Verfahren nicht nur die Krebszellen vernichten, sondern auch gesunde Zellen, wodurch die Therapie eine hohe Toxizität mit sich bringt. Wünschenswert wäre es Therapeutika zu entwickeln, welche gezielt die Krebszellen ansteuern und diese systematisch mit einer optimalen Dosis bekämpfen, während gesunde Zellen unberührt und somit verschont bleiben. Auf Basis dieser Erkenntnis werden lokale Krebsbehandlungen eingesetzt, bei denen AuNP als Therapeutika dienen, um Schäden am gesunden Gewebe zu reduzieren. Hierfür kommen photodynamische Therapien (PDT), Hyperthermie oder PTT zum Einsatz.^[136]

1.5.1.5.1. Photodynamische Therapie (PDT)

Die PDT ist eine nicht-invasive Behandlungsmethode für Krebs und andere Erkrankungen, die sich durch ein übermäßiges Wachstum abnormaler Zellen, wie z. B. Krebszellen, auszeichnen. In der PDT werden sogenannte Photosensibilisatoren (lichtempfindliche Substanzen) eingesetzt, welche sich in Tumorgeweben anreichern. Wenn diese Substanzen im Tumorgewebe mit einer geeigneten Wellenlänge, meistens im NIR-Bereich, bestrahlt und dadurch angeregt werden, findet eine Energieübertragung auf Sauerstoffatome des ungebundenen Gewebes statt und es kommt zur Bildung von Peroxylradikalen und hochreaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *Reactive oxygen species*, ROS) wie Singulett-Sauerstoff. Die hergestellten ROS können mit benachbarten Biomolekülen wie ungesättigten Lipiden, Aminosäureresten in Proteinen sowie Basen der DNA eine Reaktion eingehen und dadurch Zellschäden verursachen die Nekrose oder Apoptose hervorrufen können.^[137] Die gängigsten und wirksamsten Photosensibilisatoren sind meist hydrophob wie z. B. Zink(II)-Phthalocyanin^[138] oder Siliciumphthalocyanin 4.^[139] Diese Photosensibilatoren lagern sich dadurch bevorzugt in den hydrophoben Bereichen der Zellen an wie z. B. an Lysosomen, dem Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum oder an den

Membranen der Mitochondrien. Um die hydrophoben Eigenschaften der Photosensibilatoren zu überwinden und ihre gezielte Anlagerung an Tumorgewebe nach intravenöser Verabreichung zu ermöglichen, können AuNP als Träger dienen.^[139]

1.5.1.5.2. Hyperthermie

Bei der Hyperthermie werden Krebszellen durch selektive Temperaturerhöhung von knapp über 40 °C, des Gewebes getötet.^[140] Durch die Temperaturerhöhung kommt es zu Veränderungen der DNA, zu Zellschäden oder zur Proteindenaturierung, die zu Nekrose führen kann.^[141,142] Die Hyperthermie kann alleine oder in Kombination mit Strahlentherapie und Chemotherapie verwendet werden.^[143] Während der Strahlentherapie werden die Krebszellen mit ionisierender Strahlung wie Röntgenstrahlung oder Teilchenstrahlung ausgesetzt. Dadurch wird die Erbsubstanz der Zellen beschädigt und die Zellteilung gestoppt. Da eine unkontrollierte Aufheizung nicht nur kanzeröse Zellen, sondern auch gesunde Zellen schädigen kann, ist eine kontrollierte Wärmeabgabe entscheidend.^[144] Für die gesteuerte Verabreichung fungieren AuNP aufgrund ihrer LOPR als geeignete Sonden in der Hyperthermie. Die LOPR der AuNP ermöglicht es ihnen absorbiertes Licht in Pikosekunden in Wärme umzuwandeln. Studien haben gezeigt, dass nach dem Injizieren von AuNP mit dem anschließenden Behandeln mittels Hyperthermie die Krebszellteilung von Mäusen verhindert werden konnte.^[138,145]

1.5.1.5.3. Photothermale Therapie (PTT)

Wie auch in der PDT wird in der PTT Lichtenergie, für die Zerstörung von Krebszellen, verwendet, wie in Abbildung 11 gezeigt. Es ist ein nicht-invasiver Ansatz und erfordert zwei Voraussetzungen: 1) eine NIR-Lichtquelle und 2) ein optisches Absorptionsmittel (photothermischer Wirkstoff). Dafür wird das Tumorgewebe mit einem NIR-Laser bestrahlt und die optischen Absorptionsmittel absorbieren das Licht im NIR-Bereich. Diese Energie wird dann in Wärme umgewandelt und eine lokale Hyperthermie findet statt. In der PTT können AuNP genutzt werden, da diese stark Licht absorbieren und eine hervorragende photothermische Umwandlungseffizienz haben.^[146,147] Dabei kann die Temperatur, anders als bei der Hyperthermie, 50 °C überschreiten, wodurch Tumorzellen oder umliegendes Gewebe selektiv zerstört werden.^[148] Die AuNP werden in den Tumor injiziert oder sammeln sich aufgrund des EPR-Effekts dort passiv an, woraufhin sie mit NIR bestrahlt werden.

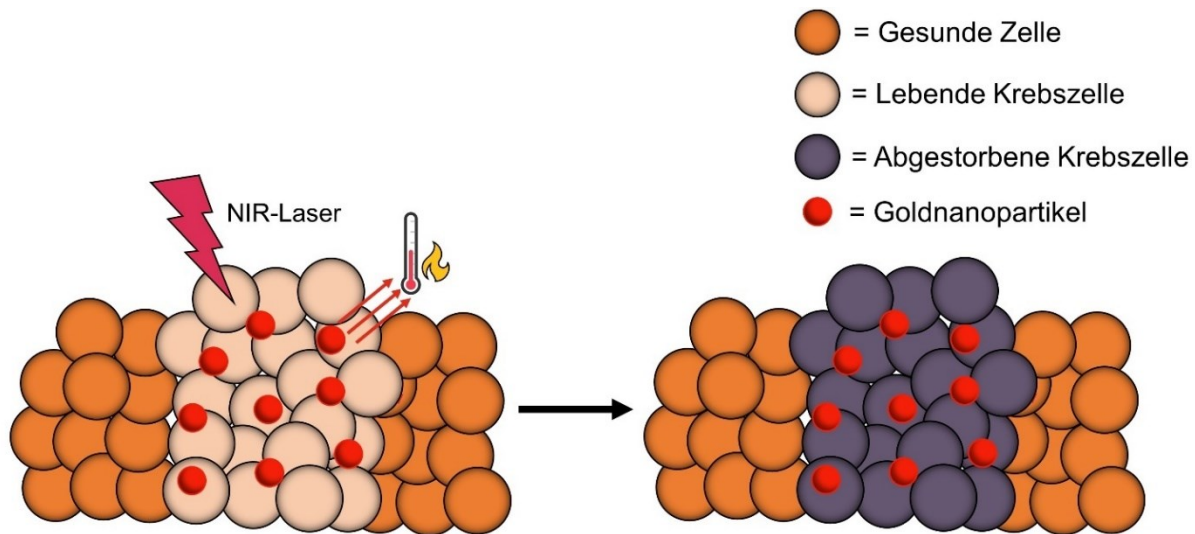


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Wirkprinzips der PTT unter Verwendung von AuNP.

Der Vorteil von NIR ist, dass es eine höhere Gewebedurchlässigkeit und Penetrationstiefe besitzt und somit sowohl Blut als auch Weichteile erreichbar sind, ohne umliegendes Gewebe zu beschädigen. Die AuNP können in ihrer Struktur so angepasst werden, dass sie NIR-Licht ($\lambda \approx 650\text{--}1350\text{ nm}$) maximal absorbieren, wodurch das Laserlicht tief genug in das Gewebe eindringen kann.^[149–153] Die meisten PTT-Wirkstoffe werden in zwei Teile unterteilt, die Rand- und die Kernschicht. Die Kernschicht wird für die photothermische Umwandlung genutzt, wobei auch einige Medikamente beladen werden können. Die Randschicht dagegen schützt die NP während der Therapie, dient als Medikamententräger und kann die Zellaufnahme von PTT-Wirkstoffen verbessern. Für die Optimierung solcher PTT-Mitteln müssen zwei zentrale Aspekte beachtet werden, welche die Möglichkeit zur Zellaufnahme und die photothermische Umwandlungskapazität umfassen.^[154]

1.5.2. Diagnostik

1.5.2.1. AuNP als Biosensoren

AuNP spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung hochempfindlicher Biosensoren und Nachweisverfahren in der Diagnostik. Ihre herausragenden optischen Eigenschaften, insbesondere die starke LOPR und die hohen Extinktionskoeffizienten, machen sie zu idealen Kandidaten für optische und elektrochemische Sensoren, darunter auch SERS-basierte Systeme.^[155] Durch die gezielte Oberflächenfunktionalisierung mit spezifischen Biomolekülen lassen sich Metallionen,^[156] Proteine, Viren, Bakterien oder Nukleinsäuren nachweisen, was für

die Diagnose von Infektionskrankheiten, Tumormarkern oder Antibiotikaresistenzen von besonderer Bedeutung ist.^[82] Die Nachweismethoden können dabei kolorimetrisch, enzymatisch, elektrochemisch (amperometrisch), als Bio-Barcode oder durch die Veränderung der LOPR stattfinden.^[82]

Das Grundprinzip vieler optischer Sensoren beruht auf Veränderungen der LOPR, die durch Aggregation oder Interaktion mit Zielmolekülen induziert werden. Dabei führen Änderungen des lokalen Brechungsindex oder der Partikelabstände zu charakteristischen Rotverschiebungen, die spektrophotometrisch oder sogar visuell erfasst werden können.^[45,82,157] Als kolorimetrische Sensoren können AuNP zur Differenzierung verschiedener Zielmoleküle eingesetzt werden.^[157] Ein Beispiel ist der Nachweis der Proteinaseaktivität in verschiedenen Proben. Dabei dienen Gelatine-beschichtete AuNP als Substrat, das bei Proteolyse zerlegt wird. Dies führt zur Aggregation der AuNP, wodurch sich die LOPR verschiebt und eine Farbänderung auftritt, die spektrophotometrisch erfasst werden kann.^[82]

Ein weiteres Detektionsverfahren nutzt DNA-funktionalisierte AuNP, die durch Fluoreszenzlöschung (Quenching) an Detektionssequenzen gebundenen Fluorophore die Hybridisierung mit Ziel-DNA anzeigen. Diese Methode ermöglicht Echtzeit-Monitoring von zellulären Ereignissen bei gleichzeitig reduziertem Risiko von Kontaminationen.^[158]

Die amperometrische Methode erlaubt die hochsensitive Quantifizierung kleiner Moleküle. So lässt sich Harnsäure im Blutserum oder Urin mit einer Nachweisgrenze von 50 nmol/L bestimmen. Für die Quantifizierung solcher geringen Mengen werden Bio-Barcodes eingesetzt. Die AuNP werden mit DNA funktionalisiert, die spezifische DNA-Zielsequenzen erkennen und daran binden. Durch diesen Bindungsprozess wird zusätzliche DNA vervielfältigt, also der Bio-Barcode der als Verstärkungssignal dient. Anstatt nur die geringen Mengen der ursprünglichen Ziel-DNA zu messen, wird der vermehrte Bio-Barcode analysiert, wodurch der Nachweis genauer wird.^[159]

Darüber hinaus können AuNP-basierte Biosensoren sowohl elektrochemische als auch SERS-Signale erzeugen, und so Nachweisempfindlichkeiten bis in den femtomolaren Bereich erreichen.^[160–162] Insbesondere SERS eröffnet die Möglichkeit, intrazelluläre Prozesse wie die Wechselwirkung von Antitumormedikamenten mit DNA zu untersuchen und erlauben daher Möglichkeiten für die Anwendung in der Krebserkennung.^[158,163]

1.5.2.2. Bildgebungsverfahren

In biomedizinischen Bildgebungsverfahren können AuNP aufgrund ihrer hohen Elektronendichte, ihrer ausgeprägten optischen Eigenschaften, insbesondere der LOPR, sowie der Möglichkeit zur gezielten Oberflächenfunktionalisierung als Kontrastmittel oder Signalverstärker eingesetzt werden. In optischen Verfahren wie der SERS, der Dunkelfeld- und Zweiphotonenmikroskopie wird die Fähigkeit der AuNP genutzt, Licht im NIR-Bereich (600–1000 nm) zu absorbieren bzw. zu streuen.^[15] Dieser Bereich wird als „phototherapeutisches Fenster“ bezeichnet und weist die maximale Durchdringungstiefe in biologischem Gewebe auf, da hier die Absorption durch gesunde Zellen minimal ist. Dadurch ist eine tiefere Bildgebung von Krebszellen möglich.^[33] Die Dunkelfeldmikroskopie erlaubt es zudem, AuNP in lebenden Zellen zu verfolgen.^[15] Auch in der Computertomographie (CT) finden AuNP eine breite Anwendung. Dieses zerstörungsfreie medizinische Bildgebungsverfahren profitiert von der hohen Ordnungszahl und Elektronendichte von Gold, wodurch AuNP als effiziente Röntgenabsorber dienen. Ihre hohen Röntgenabsorptionskoeffizienten verstärken den Kontrast zwischen unterschiedlichen Geweben und ermöglichen somit eine präzisere Differenzierung von Zelltypen. In der Magnetresonanztomographie (MRT), einem nicht-invasiven Bildgebungsverfahren, erzeugen AuNP zwar selbst kein intrinsisches MRT-Signal, können jedoch durch die Modifikation mit klassischen MRT-Kontrastmitteln wie Gadoliniumkomplexen eine Signalverstärkung ermöglichen und so für eine gezielte molekulare Bildgebung eingesetzt werden.^[33] Bei der photoakustischen Bildgebung (PB) werden nichtionisierte Laserpulse in biologisches Gewebe eingebracht. Ein Teil der absorbierten Energie wird in Wärme umgewandelt, was eine vorübergehende thermoelastische Ausdehnung und die Emission breitbandiger Ultraschallwellen (z. B. im MHz-Bereich) hervorruft. Diese Signale werden von Ultraschallwandlern detektiert und zu Bildern verarbeitet. AuNP können hier durch ihre plasmonischen Effekte die Umwandlung von Licht in Wärme verstärken, was zu intensiveren Ultraschallemissionen und damit zu einer verbesserten Bildauflösung führt, wie in Abbildung 12 visualisiert.^[89]

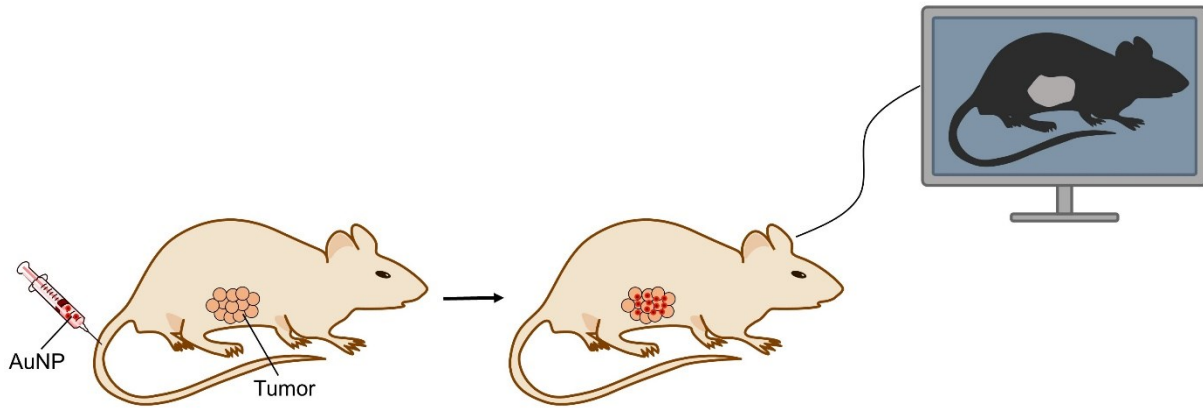


Abbildung 12: Darstellung eines AuNP-basierten Bildgebungsverfahrens. Einer Maus werden AuNP injiziert, wodurch Tumore lokalisiert werden können.

1.6. Ausgewählte aggressive Tumore und therapeutische Ansätze

1.6.1. Hochrisiko-Tumore: Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) und Glioblastom (GBM)

PDAC und GBM gehören zu den bösartigsten und am schwierigsten zu behandelnden Krebsarten. Für PDAC stehen bislang nur begrenzt klinisch wirksame Behandlungen zur Verfügung, weshalb die Überlebensrate innerhalb von unter 5 Jahren bei lediglich 10 % liegt.^[164] Diese Krebsart zeichnet sich durch seine ausgeprägte Heterogenität aus, gekennzeichnet durch seine verschiedenen neoplastischen Zellpopulationen, den histologischen Phänotyp, die genomischen Veränderung wie auch seine Ausbreitungsfähigkeit.^[165] Hinzu kommt, dass die komplexe Tumormikroumgebung eine Kombination aus desmoplastischem Stroma^[166] (das faserreiche Bindegewebe um einen Tumor, welches eine physikalische Barriere bildet und so die Wirkstoffaufnahme beeinträchtigt)^[167,168] und immunologischen Mechanismen^[166] (Prozesse, durch die das Immunsystem Fremdstoffe erkennt und den Körper dadurch schützt)^[169] aufweist. Diese Faktoren erschweren sowohl die Therapieentwicklung, die für die Mehrheit der Patienten wirksam sind, als auch das Verständnis des klinischen Verlaufs von PDAC. Eine Patientenstratifizierung unter Berücksichtigung der tumorbiologischen Heterogenität könnte einen personalisierten Therapieansatz ermöglichen und damit die Behandlung jedes einzelnen Patienten unterstützen. 80 % der diagnostizierten Patienten zeigen bereits fortgeschrittene, nicht resezierbare Tumore, die üblicherweise mit einer systemischen Chemotherapie aus einer Kombination von Gemcitabin-Fluoropyrimidin/mFOLFIRINOX (5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan, Oxaliplatin) oder Gemcitabin/Nab-Paclitaxel behandelt werden. Die Tumore der restlichen 20 % können operativ reseziert werden, erhalten jedoch ebenfalls eine adjuvante

Chemotherapie. In den meisten Fällen entwickeln die Patienten nach der Resektion jedoch erneut ein lokales oder mesastatisches Tumorrezidiv.^[164,166] Obwohl personalisierte Therapieansätze bei anderen Tumoren nachweislich zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs führen, bleibt die Etablierung individualisierter Behandlungsstrategien beim PDAC aufgrund des bislang begrenzten Patientennutzens weiterhin eine große Herausforderung. Aus diesem Grund ist eine Weiterentwicklung der personalisierten molekularen Stratifizierung beim PDAC dringend notwendig, um die Behandlungsstrategien und Patientenprognosen zu verbessern.^[165]

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist das häufigste und aggressivste Gliom des Zentralnervensystems (ZNS) und die primäre Hirntumorerkrankung. Das GBM ist durch Heterogenität, erhöhte Mikrovaskularität, atypische Kerne, vaskuläre Proliferation und Nekrose gekennzeichnet und fördert Hyperzellularität, mitotische Aktivität und Infiltration in das normale, also benachbarte Hirngewebe.^[170] Die Standardbehandlung beginnt mit der vollständigen chirurgischen Entfernung des Tumors, gefolgt von Bestrahlung und Chemotherapie. Trotz aggressiver, multimodaler Behandlungen beträgt die Überlebensrate nur 13–15 Monate. Aufgrund der hohen mikroskopischen Invasion des GBM kommt es zu einer hohen Rezidivrate, die letztendlich zum Tod führt, weshalb dringend neue Methoden etabliert werden müssen.^[171] Die medikamentöse Behandlung stellt eine große Hürde dar, da die Blut-Hirn-Schranke (BHS) das Gehirn, genauer gesagt das Hirnparenchym, vom peripheren systemischen Kreislauf trennt und so das Gehirn vor schädlichen Substanzen schützt. Auch verabreichte GBM-Medikamente können nicht in das Gehirn eindringen, weshalb dringend Träger benötigt werden, um die BHS für die therapeutische Behandlung von GBM zu überwinden.^[172,173]

Als weiterer Therapieansatz in der Onkologie kann die zielgerichtete Therapie eingesetzt werden. Dabei werden Medikamente verwendet, die spezifische Signalwege in Tumorzellen blockieren und so deren Wachstum hemmen.^[174–176] Dabei können AuNP als Trägerplattform genutzt werden, um die Selektivität und Wirksamkeit der Wirkstoffe zu erhöhen.^[177,178]

1.6.2. Tyrosinkinase

Eine Überaktivierung von Tyrosinkinasen (TKI) tritt bei mehreren Tumorarten auf, insbesondere beim PDAC^[179–181] und GBM.^[171,182–184] TK wie z. B. LYN sind Enzyme, die eine zentrale Rolle bei der Phosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen spielen.^[185] Unter Verwendung von ATP übertragen sie Phosphatgruppen auf die Aminosäure Tyrosin.^[186] Dieser Prozess ist entscheidend für die Aktivierung und Deaktivierung von Proteinen, die verschiedene zelluläre

Funktionen steuern wie z. B. die Migration, Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und den Zellmetabolismus.^[187]

Die TK lassen sich in zwei Haupttypen unterteilen: die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (NRTK). Zu den RTK gehören der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) und der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*, VEGFR), welche sich in den Zellmembranen befinden und als Empfänger für äußere Signale wie z. B. Wachstumsfaktoren dienen. Bei der Aktivierung dieser Rezeptoren werden die TK-Domänen im Inneren der Zelle stimuliert, woraufhin eine Signalübertragung stattfindet. Zu den NRTK zählt z. B. das ABL-Protein, welches in seiner mutierten Form als BCR-ABL1 (Bruchpunkt-Cluster-Region des Abelson-Maus-Leukämie-Virus-Onkogen-Homologs 1, baut Cluster von Phosphoratomen in bestimmten Proteinen ein, engl.: *Breakpoint cluster region of abelson murine leukemia-viral oncogene Homolog 1*) bezeichnet wird und sich im Zellinneren befindet und dort Signale durch Interaktion mit anderen zellulären Proteinen überträgt. NRTK agieren frei im Zytoplasma oder Zellkern, ohne an Membranrezeptoren gebunden zu sein.^[188,189]

Die Kernaufgabe der TK besteht darin, Signale von der Außenseite der Zelle in das Zellinnere weiterzuleiten. Dieser Prozess beginnt mit der Bindung von Wachstumsfaktoren oder Hormone an den extrazellulären Teil der RTK, wodurch ein Signal empfangen wird. Daraufhin dimerisieren zwei Rezeptoren zu einem Dimer, was die Aktivierung der TK-Domäne im Inneren der Zelle zur Folge hat und somit sich selbst und andere Proteine phosphoryliert werden. Dadurch findet eine Signalvermittlung statt, sodass nachfolgende Moleküle und Enzyme in der Zelle aktiviert werden, die spezifische Signalwege auslösen, wodurch die Zellteilung, Wachstum oder Differenzierung initiiert werden.^[184,190,191]

1.6.3. Tyrosinkinase-inhibitor (Dasatinib)

Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) haben das Potenzial, die Tumorphiliferation und -entwicklung zu beeinflussen. Da Krebs einer der am weitesten verbreiteten Todesursachen weltweit ist, gewinnen die TKI zunehmend an Bedeutung.^[192] Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Tyrosinkinase LYN, die in mehreren Krebsarten wie z. B. myeloische und chronischer Leukämie, Prostata-, Gehirn-, Brust- und Dickdarmkrebs eine entscheidende Rolle spielt. Diese Krebsarten zeigen eine abnormale Regulation von LYN. Zudem steuern LYN die intrazelluläre

Signalweitergabe, die je nach Zelltyp entweder die Weiterleitung von Informationen fördern oder hemmen kann.^[185]

Das Medikament Dasatinib (DASA), ein Aminopyrimidinderivat und Mitglied der Kinasehemmer, welches schematisch in Abbildung 13 (rechts oben) dargestellt ist, wurde in der vorliegenden Thesis aufgrund seiner vielversprechenden Eigenschaften in der Krebstherapie eingesetzt. Es handelt sich um ein Zytostatikum, dass die Src- (Sarkom, engl.: *sarcoma*, Vorstufe eines krebserregenden Genprodukts), BCR-ABL1-, Stammzellfaktor-Rezeptor-Kinase (c-Kit), Ephrinrezeptor A2 (EPHA2) und das von Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktorrezeptor- β -Tyrosinkinase (PDGFR β) hemmt.^[193] Durch die Blockierung der Tyrosinkinaseaktivität und die damit verbundene Verhinderung der Signalübertragung wird die Zelladhäsion, Invasion und Migration von Tumorzellen unterdrückt, wodurch das unkontrollierte Zellwachstum und die Zellproliferation, wie in Abbildung 13 dargestellt, gestoppt werden.

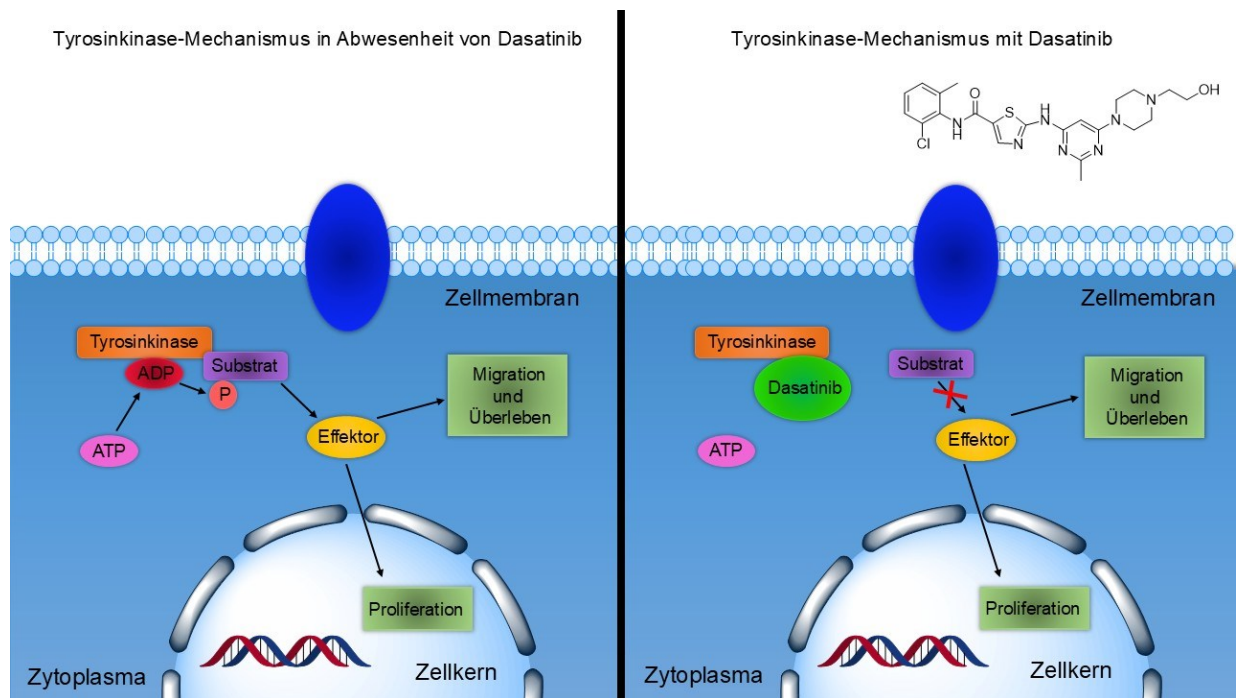


Abbildung 13: Tyrosinkinase-Mechanismus in Abwesenheit von DASA (links) und in Anwesenheit von DASA (rechts).

DASA wird bei der Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzt, darunter Glioblastom,^[194] Brustkrebs,^[195] Lungenkrebs,^[196] chronischer myeloischer Leukämie (CML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL).^[197] In der Standardtherapie von Leukämie kommt häufig das Medikament Imatinib zum Einsatz, doch bei Patienten, die eine Resistenz oder Intoleranz gegenüber Imatinib entwickeln, wird DASA als Alternative eingesetzt. Im Gegensatz zu Imatinib,

das nur in seiner aktiven Form an die BCR-ABL1-Kinasedomäne binden kann, bindet DASA sowohl in der aktiven als auch in der inaktiven Form an diese Domäne und weist eine breitere Wirksamkeit auf.^[198]

1.6.4. Behandlung von PDAC und GBM mit AuNP

Aufgrund der besonderen Eigenschaften und Vielfalt von AuNP können sie unter anderem in der Therapie für PDAC und GBM genutzt werden. Arib *et al.* zeigte die hervorragende Zellaufnahme der AuNP in PDAC und GBM-Zellen sowie deren hohe Stabilität und dessen theranostisches Potenzial für die Diagnose und Therapie. Besonders eignen sie sich für die gezielte Wirkstofffreisetzung und phototherapeutische Anwendung.^[199] Für die Wirkstofffreisetzung wurden auch AuNP mit Peptiden, welche an Plectin-1-gerichtet sind, synthetisiert. Diese wirkten antiproliferativ, zeigten eine Antitumorwirkung, ohne das gesunde Gewebe zu schädigen und transportierten selektiv das Zytostatikum Gemcitabin.^[200] Ebenfalls erhöhten AuNP die Radiosensitivität während der Strahlentherapie bei PDAC-Zellen.^[201] In der Krebsdiagnose konnten AuNP die Sensitivität und Spezifität von herkömmlichen Markern wie z. B. CA19-9 verbessern.^[202]

In GBM-Zellen konnte die RNA-Interferenz-basierte Therapie durch den Einsatz von AuNP verbessert werden. Die unzureichende Stabilität und Wirkstofffreisetzung der RNA konnte durch die AuNP überwunden werden. Die AuNP wurden von GBM-Zellen effektiv aufgenommen, wodurch eine häufig vorkommende miRNA (MikroRNA, die biologische Prozesse wie Zellteilung, Proliferation und Apoptose reguliert)^[203] gezielt angesteuert werden konnte. Darüber hinaus konnten die AuNP die BHS überwinden und Tumorgewebe in einem Mausmodell erreichen.^[204,205] Zudem konnten AuNP mit einem DNA-Aptamer namens U2 beladen werden. Dieses System konnte den EGFR-Signalweg blockieren und die DNA-Reparatur in GBM sowohl in-vitro als auch in-vivo hemmen.^[206]

2. Zielstellung

AuNP gewinnen in der Nanomedizin zunehmend an Bedeutung und finden dort eine Vielzahl an Anwendungen. Dank ihrer einzigartigen und gut kontrollierbaren Eigenschaften wie Größe, Form, Monodispersität und Oberflächenfunktionalisierung, werden sie insbesondere in der Tumorthherapie zunehmend eingesetzt. Die Standardtherapie beruht auf einer Kombination aus chirurgischer Entfernung, Strahlen- und Chemotherapie und hat den großen Nachteil, dass sie neben den Krebszellen auch gesunde Zellen angreifen. Die einfache Modifizierbarkeit der AuNP macht sie zu vielversprechenden Trägersystemen für therapeutische oder diagnostische Wirkstoffe. So können Krebszellen gezielt adressiert und mit einer optimalen Medikamentendosierung effektiv bekämpft werden, während das gesunde Gewebe unbeschädigt bleibt.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Modifikation von AuNP mit geeigneten Polymeren, die eine Bindung des Medikaments DASA an der AuNP-Oberfläche und somit dessen Freisetzung in Krebszellen ermöglichen. Zudem soll die Stabilität der hergestellten AuNP@Polymer-Konjugate sowohl in Wasser als auch in Ethanol untersucht werden, da dieser Lösungsmittelwechsel für die Beladung von DASA relevant ist. DASA ist ausschließlich in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol löslich, in Wasser jedoch unlöslich. AuNP sollen eingesetzt werden, weil sie sich durch ihre leichte Synthese, gute Biokompatibilität sowie eine hohe Luft- und Wasserstabilität auszeichnen. Darüber hinaus können sie sowohl mit Targeting-Liganden modifiziert, als auch mit Medikamenten beladen werden.

Zuerst sollen PVA beschichtete AuNP (AuNP@PVA) in Wasser hergestellt und diese mit spektroskopischen und mikroskopischen Methoden analysiert werden, um ihre Größe, Form, Dispersität und Oberflächenfunktionalisierung zu untersuchen. Für die Anwendung als Medikamententransporter für wasserunlösliche Medikamente sollen die AuNP@PVA-Konjugate ebenfalls in Ethanol analysiert werden. Für die anschließende Beladung mit einem Krebswirkstoff soll das Medikament DASA eingesetzt werden, welches ein TKI ist und in der Krebstherapie eingesetzt wird.

DASA soll dabei durch supramolekulare Wechselwirkungen mit dem Polymer in die Polymerhülle der AuNP@PVA eingebettet werden, die chemische Struktur des Medikaments bleibt hierbei unverändert, weshalb unerwünschte Reaktionen vermieden werden. Die Beladungseffizienz des DASAs soll durch quantitative und qualitative Analysen überprüft werden. Zusätzlich sollten

Toxizitätsstudien durchgeführt und die therapeutische Wirkung auf PDAC-Zellen untersucht werden, um ihr Anwendungspotenzial in der PDAC-Krebszellentherapie zu beurteilen.

Um das Anwendungspotenzial der AuNP zu maximieren, soll im Weiteren die Stabilität der AuNP sowohl in Wasser als auch in Ethanol verbessert werden, da eine hohe Stabilität eine zentrale Voraussetzung für den Erhalt ihrer gewünschten Eigenschaften und den erfolgreichen Einsatz mit alternativen Wirkstoffen ist. Hierfür sollen die AuNP mittels verschiedener Synthesemethoden sowie unter Verwendung der vier unterschiedlichen Polymere Polyvinylalkohol (PVA), Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyacrylsäure (PAA) in unterschiedlichen molaren Gewichtsmittelwerten hergestellt werden. Die Charakterisierung soll wie zuvor mithilfe spektroskopischer und mikroskopischer Methoden erfolgen, um Form, Größe, Dispersität und Oberflächenfunktionalisierung zu bestimmen.

3.Kumulativer Teil

In den Kapiteln 3.1 und 3.2 werden die Ergebnisse vorgestellt, die während der Promotion verfasst und in wissenschaftlichen Journalen als Erstautorin veröffentlicht wurden. Die Veröffentlichungen wurden in chronologischer Reihenfolge dargestellt und zu jeder Veröffentlichung wurde eine kurze Zusammenfassung, als auch die Beiträge der Autoren aufgeführt. Das Literaturverzeichnis, die Seitenzahl, die Abkürzungen, sowie die Nummerierungen von Figuren, Tabellen und Gleichungen wurden unverändert übernommen.

3.1. Nanoformulation of dasatinib cannot overcome therapy resistance of pancreatic cancer cells with low LYN kinase expression

Marilyn Kaul, Ahmed Y. Sanin, Wenjie Shi, Christoph Janiak, Ulf D. Kahlert

Pharmacol. Rep. **2024**, 76, 793-806. DOI: 10.1007/s43440-024-00600-w.

Kurzfassung:

Hintergrund

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist einer der am schwierigsten zu behandelnden Tumoren. Der Src (Sarkom)-Inhibitor Dasatinib (DASA) hat in präklinischen Studien zu PDAC vielversprechende Wirksamkeit gezeigt. Eine klinische Bestätigung konnte jedoch nicht erreicht werden. Insgesamt war es unser Ziel, Argumente für die mögliche Wiederaufnahme klinischer Tests dieses Wirkstoffs in einer Biomarker-stratifizierenden Therapie-Studie für PDAC-Patienten zu liefern. Wir haben untersucht, ob die Nanofunktionalisierung von DASA die Wirksamkeit des Wirkstoffs erhöhen kann und ob bestimmte Src-Mitglieder als klinische prädiktive Biomarker fungieren können.

Methoden

Die Methoden umfassen die Herstellung von mit Poly(vinylalkohol) stabilisierten Goldnanopartikeln und deren Beladung mit Wirkstoffen, dynamische Lichtstreuung, Transmissionselektronenmikroskopie, thermogravimetrische Analyse, Zeta-Potenzial-Messung, sterile menschliche Zellkulturen, Quantifizierung des Zellwachstums, Zugriff auf und Auswertung von Transkriptom- und klinischen Daten aus dem molekularen Tumordatensatz TCGA sowie verschiedene statistische Analysen.

Ergebnisse

Wir haben homodisperses nanofunktionalisiertes DASA als AuNP@PVA-DASA-Konjugat hergestellt. Der Verbundstoff verstärkte die wachstumshemmende Wirkung von DASA auf PDAC-Zelllinien nicht. Das Zellmodell mit hoher LYN-Expression zeigte die stärkste Reaktion auf die Therapie. Wir bestätigen die deregulierte Src-Kinetomaktivität als vorherrschendes Merkmal von PDAC, indem wir mRNA-Spiegel aufzeigen, die mit einem höheren Malignitätsgrad von Tumoren assoziiert sind. Die BLK-Expression (B-Lymphozyten-Kinase) sagt eine kürzere Gesamtüberlebenszeit von PDAC-Patienten mit Diabetes voraus.

Schlussfolgerungen

Die Nanofunktionalisierung von DASA muss weiter verbessert werden, um die Therapieresistenz von PDAC zu überwinden. LYN-mRNA ist in Tumoren mit höherer Malignität erhöht und kann als prädiktiver Biomarker für die Therapieresistenz von PDAC-Zellen gegenüber DASA dienen. Die Untersuchung der biologischen Rolle von BLK könnte dazu beitragen, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen im Zusammenhang mit PDAC bei Patienten mit Diabetes zu identifizieren.

Anteil an der Publikation:

- Ideen, Recherche und Herstellung von AuNP mittels PVA mit anschließender Charakterisierung.
- Beladung der AuNP@PVA mit DASA, sowie dessen Charakterisierung.
- Optimierung und Berechnung der Beladung von DASA auf der AuNP@PVA Oberfläche.
- Stabilitätstests der AuNP@PVA-DASA im Zellmedium DMEM wurden für vier Tage bei 37 °C durchgeführt und die Beladung und die Stabilität der AuNP mit Hilfe von HPLC, DLS und TEM analysiert.
- Durchführung von Genexpressionsanalyse der Src-Familie nach klinischen Subtypen von Bauchspeicheldrüsenkrebs und deren Patienten durch Wenjie Shi.
- In-vitro Versuche und Mikroskopieaufnahmen der AuNP@PVA-DASA Probe in drei verschiedenen PDAC-Zelllinien (PANC1, AcPC1 und COLO357) durch Ahmed Sanin.
- Auswertung der Daten, Erstellung von Tabellen, Graphen und Figuren und Zusammenstellung einer wissenschaftlichen Publikation.
- Überarbeitung der Publikation mit den Co-Autoren, sowie Herrn Prof. Dr. Christoph Janiak und Herrn Prof. Dr. Ulf Kahlert.

- Einreichung der Publikation im Verlag Springer Nature im Journal „*Pharmacological Reports*“ durch Herrn Prof. Dr. Ulf Kahlert.



Nanoformulation of dasatinib cannot overcome therapy resistance of pancreatic cancer cells with low LYN kinase expression

Marilyn Kaul¹ · Ahmed Y. Sanin² · Wenjie Shi² · Christoph Janiak¹ · Ulf D. Kahlert^{2,3} 

Received: 2 November 2023 / Revised: 26 April 2024 / Accepted: 28 April 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

Background Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most difficult to treat tumors. The Src (sarcoma) inhibitor dasatinib (DASA) has shown promising efficacy in preclinical studies of PDAC. However, clinical confirmation could not be achieved. Overall, our aim was to deliver arguments for the possible reinitiating clinical testing of this compound in a biomarker-stratifying therapy trial for PDAC patients. We tested if the nanofunctionalization of DASA can increase the drug efficacy and whether certain Src members can function as clinical predictive biomarkers.

Methods Methods include manufacturing of poly(vinyl alcohol) stabilized gold nanoparticles and their drug loading, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, thermogravimetric analysis, Zeta potential measurement, sterile human cell culture, cell growth quantification, accessing and evaluating transcriptome and clinical data from molecular tumor dataset TCGA, as well as various statistical analyses.

Results We generated homo-dispersed nanofunctionalized DASA as an AuNP@PVA-DASA conjugate. The composite did not enhance the anti-growth effect of DASA on PDAC cell lines. The cell model with high LYN expression showed the strongest response to the therapy. We confirm deregulated Src kinetome activity as a prevalent feature of PDAC by revealing mRNA levels associated with higher malignancy grade of tumors. BLK (B lymphocyte kinase) expression predicts shorter overall survival of diabetic PDAC patients.

Conclusions Nanofunctionalization of DASA needs further improvement to overcome the therapy resistance of PDAC. LYN mRNA is augmented in tumors with higher malignancy and can serve as a predictive biomarker for the therapy resistance of PDAC cells against DASA. Studying the biological roles of BLK might help to identify underlying molecular mechanisms associated with PDAC in diabetic patients.

Keywords Pancreatic cancer · Dasatinib · Nanomedicine · LYN · Gold nanoparticles

✉ Christoph Janiak
janiak@uni-duesseldorf.de

✉ Ulf D. Kahlert
ulf.kahlert@med.ovgu.de

Marilyn Kaul
marilyn.kaul@uni-duesseldorf.de

Ahmed Y. Sanin
ahmed.sanin@med.ovgu.de

¹ Institute for Inorganic and Structural Chemistry, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40204 Düsseldorf, Germany

² Molecular and Experimental Surgery, University Clinic for General-, Visceral-, Vascular- and Transplant Surgery, Faculty of Medicine, Otto-Von-Guericke-University Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany

³ Institute for Quality Assurance in Operative Medicine, Otto-Von-Guericke University at Magdeburg, Magdeburg, Germany

Abbreviations

ATP	Adenosine triphosphate
AuNPs	Gold nanoparticles
AuNP@PVA	Poly(vinyl alcohol) coated gold nanoparticles
AuNP@PVA-DASA	Poly(vinyl alcohol) coated gold nanoparticles loaded with DASA
BLK	B lymphocyte kinase
DASA	Dasatinib
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EPR	Enhanced permeability and retention
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate

HPLC	High-performance liquid chromatography
IR	Infrared
NaCit	Sodium citrate dihydrate
PBS	Phosphate-buffered saline
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor- β and - α
Pen/strep	Penicillin–streptomycin
PNI	Perineural invading
PVA	Poly(vinyl alcohol)
SFKs	Src family kinases
Src	Sarcoma
TEM	Transmission electron microscopy
TGA	Thermogravimetric analysis
UV–VIS	Ultraviolet–visible

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most malignant and difficult-to-treat types of cancer, with insufficient clinically beneficial treatment options available leading to a low 5-year patient survival rate of just 10% [1–3]. Various preclinical studies revealed the oncogenic roles of the Src (sarcoma) kinome, a family of proteins that take on key roles in intracellular signal transductions in a plethora of cellular processes [4] during pancreatic malformation of tumor progression [5–7]. Dasatinib (DASA) is a pharmacological pan-Src inhibitor approved for standard clinical use in treating patients with blood cancers [8, 9]. Chemically, DASA is defined as *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-((6-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-yl)amino)thiazole-5-carboxamide (Supplementary Fig. S1A).

Nanocarrier systems, particularly gold nanoparticles (AuNPs) have many advantages for biomedical applications based on their attractive biological and chemical properties, especially in imaging, diagnostic, and therapeutic cancer treatments. They are biocompatible, inert, have low toxicity, and useful optical properties. AuNPs are readily fabricated and structure, size, shape, and surface properties can be varied and controlled based on the synthesis conditions. The surface of AuNPs can be modified with different ligands or polymers so that the solubility and stability can be increased and their interaction with the biological environment can be regulated. A large molar amount of drug molecules can be loaded onto the AuNPs because of their high surface-to-volume ratio. Due to their unique properties, these systems are particularly suitable for drug delivery [10–14]. As a drug delivery system, they can improve the bioavailability of the drug, its solubility and stability, elongate the circulation time and effect, induce controlled drug release, and increase specificity by penetrating the cells to

facilitate cellular internalization and permeation into connective tissue. The latter facilitates the selective delivery of drugs to the target tissue. AuNPs also have an enhanced permeability and retention (EPR) effect. The EPR effect allows AuNPs to accumulate in tumors due to the leaky blood vessels of tumor tissue, enabling targeted delivery without targeted ligands. Tumors require a large amount of nutrients due to their rapid cell division, which creates larger pores between the endothelial cells and increases the permeability of the tissue. Due to the large cell openings, which can be up to 600–800 nm in size, the AuNPs which have a smaller size than the cell opening, accumulate in the tumor tissue, while the healthy tissue is spared [15, 16]. Internal stimuli such as pH or external stimuli such as heat or light can then induce and enhance the drug release [17]. When drugs are administered without nanoscale systems, the drug diffuses throughout the body, which can also affect healthy tissue. Without targeted administration in the form of AuNPs, only a small amount of the drug reaches the tumor tissue [18].

The loading of AuNPs with drugs is possible via two different approaches: non-covalent and covalent interactions. The advantage of the non-covalent interaction is that the structure of the approved drug remains unchanged. AuNP-drug conjugates can be used to study cancer therapeutics [12].

Clinical trials have investigated the therapeutic potential of DASA for the treatment of PDAC in various settings. However, a significant clinical benefit associated with this treatment was not detected. In a monocenter, phase II trial, DASA monotherapy for treating chemotherapy naïve patients suffering from metastatic PDAC was not able to improve the clinical course of patients [19]. The addition of DASA to clinical standard of care chemotherapy of locally advanced PDAC could not improve the patient's clinical course (NCT01395017 as assessed via www.clinicaltrials.gov in December 2023). Other trials that include DASA as part of a poly chemo-combination treatment for preventing the emergence of therapy resistance in PDAC did not show significant improvements for the patient's course [20] or are still ongoing with no results posted (i.e. NCT04164069, NCT01660971 as assessed via www.clinicaltrials.gov in December 2023). The disappointing outcomes of the human studies urgently call for developing next-generation DASA-based drugs. To do so, we designed a facile strategy to synthesize AuNPs stabilized with the biocompatible polymer poly(vinyl alcohol) (PVA) and with DASA embedded into the polymer shell surrounding the AuNP (Supplementary Fig. S1B). We have deposited the drug non-covalently onto the AuNP@PVA particle. This has the advantage of not altering the chemical structure of the drug, thus keeping the approved drug unchanged. We tested the augmented anti-cancer potential of the DASA nanodrug relative to naïve DASA by comparative quantification of diminishing

cell proliferation of PDAC cell lines. Moreover, we used large-scale molecular data from clinical sample datasets to benchmark previously described Src kinome dysregulation on the transcriptome level. We identified a predictive mRNA marker for tumor malignancy and for DASA treatment resistance. For a possible better future understanding of the disease, we also provide indicative mRNA data for the possible involvement of Src kinases in PDAC patients with risk factor manifestation, including diabetes mellitus.

Materials and methods

Details about used materials

Potassium tetrachloridoaurate(III) (KAuCl_4 ; Cat. 334545), poly(vinyl alcohol) (PVA; Cat. 81381) $M_w \sim 31,000$ g/mol and fluorescein isothiocyanate (FITC; Cat. 46950) were purchased from Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany. Sodium citrate dihydrate (NaCit; Cat. 364905) was obtained from J.T. Baker Chemicals, Schwerte, Germany, and dasatinib (DASA; Sprycel; Cat. BD35158) from BLD Pharmatech GmbH, Kaiserslautern, Germany. Ethanol (Cat. 32221) and methanol (Cat. 32213) with p.a. purity were received from Merck, Darmstadt, Germany. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Cat. 11965092) with high D-glucose (4.5 g/L), fetal bovine serum (FBS, Ref. 10270-106), penicillin–streptomycin (Pen/Strep, Cat. 15140122), 0.05% trypsin (Cat. 25300054) and sodium pyruvate (100 mM, Cat. 11360070) were purchased from Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany. The CellTiter-Glo 2.0 (Cat. G9242) cell viability glo kit was obtained from Promega. Hoechst 33342 (Cat Nr. 62249) was purchased from Thermo Scientific and the Dako fluorescence mounting medium (Cat Nr. S302380-2) was from Agilent Technologies. T75 cell culture flasks (Ref. 83.3911.002) were from SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany, and BRAND 96 flat white (Ref. 781970) well plates from BRAND GmbH + KO KG, Wertheim, Germany. All purchased materials were used without further purification. For the AuNPs synthesis, ultrapure water was used.

Methods for nanoparticle characterization

Dynamic light scattering (DLS): Hydrodynamic diameters were measured with a Malvern Nano S Zetasizer with a HeNe laser at a wavelength of 633 nm. Ultraviolet–visible (UV–VIS): Spectra were recorded on a P9 double-beam spectrophotometer from VWR. Infrared (IR): Spectra were measured with a Bruker TENSOR 37 spectrometer between 550 and 4000 cm^{-1} with ATR technique (diamond crystal). Transmission electron microscopy (TEM): Images were recorded with a JEOL JEM-2100Plus electron microscope

at an accelerating voltage of 200 kV with a Matataki Flash camera. The size of the AuNPs was measured with a Gatan-Digital Micrograph software and over 200 particles were counted for the size distribution. Each AuNP suspension was diluted in the same solvent in which the particles were already dispersed and 10 μL of this diluted dispersion was dropped onto a 200 μm carbon-coated copper grid from Electron Microscopy Sciences (Munich, Germany). The grid with the dispersion was dried in air under ambient conditions. Thermogravimetric analysis (TGA): The mass loss versus temperature was investigated on a Netzsch TG209 F3 Tarsus, Netzsch, Selb, Germany under a nitrogen atmosphere up to 1000 $^{\circ}\text{C}$ at a heating rate of 5 K min^{-1} . Zeta potential: The surface charge of the AuNPs was determined with the Zetasizer Nano ZS from Malvern Panalytical. High-performance liquid chromatography (HPLC): The Shimadzu LC 20AT instrument with an SPD-M20A UV–Vis detector and a Luna C18(2) (250 $\times$ 4.60 mm, 5 microns) column from Phenomenex® were used for the quantification of the DASA concentration in the solutions. All solutions were degassed with ultrasonication (Bandelin Sonorex, Berlin, Germany) before use and the samples were filtered through a 0.2 μm Millex filter (Millipore). The mobile phase was methanol–water (82:18, v/v) and had a flow-rate of 1 mL min^{-1} at ambient temperature. The injection volume was 20 μL and the detection wavelength was 322 nm.

Synthesis of poly(vinyl alcohol) stabilized gold nanoparticles (AuNP@PVA)

The amount of 20 mg (52.9 μmol) of KAuCl_4 and 133 mg (4.3 μmol) of PVA were dissolved in 200 mL of ultrapure water and the solution was heated to 90 $^{\circ}\text{C}$ under stirring. At 90 $^{\circ}\text{C}$, 29 mg (98.6 μmol) of sodium citrate dihydrate (NaCit) was added and the solution was continued to stir for 30 min. The color changed from light yellow to dark red. From the dispersion, 5 mL were centrifuged, the supernatant was separated by decantation and discarded and the AuNP@PVA precipitate was resuspended in 5 mL of ethanol. The estimated number of functionalized gold nanoparticles AuNP@PVA per 5 mL batch is $3.5 \cdot 10^{16}$, alternatively $7 \cdot 10^{15}/\text{mL}$.

Loading of DASA on gold nanoparticles (AuNP@PVA-DASA)

DASA was dissolved in ethanol to get a stock solution concentration of 1 g/L. The volume of 0.8 mL of this solution ($8 \cdot 10^{-4}$ g, $1.64 \cdot 10^{-3}$ mmol) was added to 5 mL of the ethanolic AuNP@PVA dispersion during stirring. The combined mixture was heated to 40 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min and stirred for another 72 h at ambient temperature. The chemical structure of DASA and a pictorial presentation of the schematic

synthetic route to the AuNP@PVA-DASA conjugate can be found in Supplementary Fig. S1.

Synthesis of fluorescent-labelled AuNP@PVA (AuNP@PVA-FITC)

A FITC stock solution with a concentration of $c = 1$ g/L was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). The volume of 8 mL ($8 \cdot 10^{-3}$ g, 21 μmol) from this stock solution was added to 50 mL of the previously prepared aqueous AuNP@PVA dispersion (giving an estimated number of functionalized gold nanoparticles AuNP@PVA of $35 \cdot 10^{16}/58$ mL). The mixture was stirred for 8 h at room temperature and then dialyzed with a 3.5 kDa Spectra/Por® membrane against phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h. AuNP@PVA-FITC was centrifuged and redispersed in 58 mL of Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (with $6 \cdot 10^{15}$ AuNP@PVA nanoparticles per mL).

Cell culture

PANC-1, AsPC1, and COLO357 were provided by Mr. Uwe Knippschild, General and Visceral Surgery, University Hospital Ulm. The cells were cultured into DMEM with 10% FCS, 1% Pen/Strep, and 1% sodium pyruvate. In a T75 cell culture flask, the cells were cultured adherently to 80% confluency while changing the media every 3 days. As they were 80% confluent, 0.05% trypsin was used to dissociate the cells and pass them.

For a further quality control factor, STR profiling was performed and cross-checked to ensure the authenticity of the cell lines (Supplementary Table S1). After the third passage following thawing from cryovials, the cells were ready for the experiment. The cells were weekly tested for the absence of mycoplasma in the culture using DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) from Thermo Scientific, primers (GPO-3_REV 5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3', MGSO_FOR 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3') purchased from Microsynth, derived from a conserved region in the 16S rRNA gene of mollicutes (mycoplasma) and mycoplasma DNA as positive control.

Growth inhibition and cell viability assay

The cells were counted using a trypan blue exclusion assay. After that, the cells were plated on the 96 well plate at 2000 cells in each well with 100 μL of cell culture media. After 24 h of initial settlement time, the normal culture media was replaced with media containing the different treatment types. The ATP consumption at defined time points was quantified by the commercial reporter kit CellTiter-Glo 2.0 according to the instructions of the manufacturer. The measurements

were done on a SPARK 20 M microplate reader (Tecan, Austria).

Fluorescent microscopy

The fluorescent-labeled gold nanoparticles AuNP@PVA-FITC were resuspended with 58 mL of culture media. The number of 50,000 cells was seeded at a 24 well plate with coverslips inside and AuNP@PVA-FITC was added to the wells after 48 h, till the cells settled completely. A volume of 50 μL of the AuNP@PVA-FITC solution was resuspended to 500 μL of the culture medium, providing $3 \cdot 10^{14}$ AuNPs per well plate. After 36 h of incubation, the culture medium with AuNP@PVA-FITC was aspirated and washed with PBS twice, followed by 15 min of fixation with ice-cold 70% methanol. After washing out methanol twice with PBS, a Hoechst 33342 solution was used to counterstain at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, suspended to PBS. After 10 min of incubation, residues were eliminated by rinsing the cells twice. The coverslips were mounted on a slide using a Dako fluorescence mounting medium. Zeiss Axio Observer 7 inverted microscope was used to analyze the slides with the software Zen Blue. Further image processing was performed using Fiji [21].

Bioinformatics

RNA sequencing data and clinical data were downloaded from the TCGA database (<https://portal.gdc.cancer.gov/>, July 2023). For analyzing the perineural invasion (PNI) relevance we downloaded the data from GSE102238 featuring $n = 28$ PDAC samples with PNI and $n = 22$ PDAC samples without PNI. We evaluated Src related genes expression in dependency of different clinical pathological conditions. These include T staging (indicating tumor size and discriminating neoplasms that expand to extrapancreatic lesions) [22], perineural invasion (PNI) status [23], AJCC staging [24] and the histo-morphological-based definition of tumor grade [25] and in the context of microenvironmental factors such as patients' risk behavior including alcohol use or smoking or in connection of underlying disease condition of diabetes. We downloaded RNAseq data from the GEO database with the number code GSE160434 and selected three cell lines (PANC1, ASPC1, and COLO357) and the related Src genes expression matrix. We used the R-package-ggplot to show the Src-related genes expression in different cell lines.

Statistics

The two-way ANOVA for repeated measurement was performed to analyze the data for the in vitro drug sensitivity assay with treatment time and treatment condition as independent variables and consecutive days as repeated

measures. Furthermore, post hoc comparisons for statistically significant datasets were conducted and all calculations were conducted in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., version 10). We used the Kruskal–Wallis H test for all Src kinase family members (SRC, LYN, FYN, LCK, HCK, FGR, BLK) in the clinic factor group and then the Wilcoxon test was performed to analyze the difference between each gene. The log-rank test was used for survival analysis between two groups. A p-value of less than 0.05 was defined as statistically significant.

Results

Transcriptional activity of Src kinase family members in clinical samples identifies clinical prognostic values.

We performed a comprehensive analysis of Src family members' gene expression analysis according to clinical subtypes of pancreatic cancer and its patients. By using consensus clinical differentiation of PDAC malignancy, we identified significant augmentation of transcriptional activity of selected Src members in tumors with higher malignancy grades, based on three different classification regimes (Fig. 1A–C and Supplementary Table S2). Interestingly, a risk behavior of the patient, such as alcohol abuse or smoking, did not induce Src family mRNA activation, indicating a minor role of those microenvironmental stimuli in the context of Src (Fig. 1D–F and Supplementary Table S2). To follow this interesting observation, we split PDAC patient samples into two groups according to the presence of diabetic comorbidity in a follow-up test and evaluated the clinical course of patients with high and low expression of BLK (B lymphocyte kinase). For the PDAC patients with no diabetes history, no statistical significance between high and low expression was observed (Fig. 2A). However, for the PDAC patients with a diabetes history, elevated expression of BLK results in a remarkably poorer clinical outcome when compared with patients whose tumors had low expression of BLK, although the statistical results showed no significance (Fig. 2B).

Recently, the discovery of direct interaction of tumor cells with nerve cells via synaptic structures or micro/nano tunnel systems evolved into a new direction of cancer research termed 'cancer neuroscience' [26] including in pancreatic oncology [27]. Our analysis did not indicate that PDAC cells' Src kinase network is involved in these processes, as we could not identify differences in gene expression levels according to the neural invasion status of the tumors (Supplementary Fig. S2).

Nanofunctionalization of DASA

For the immobilization of DASA, gold nanoparticles were prepared with poly(vinyl alcohol) (PVA) in a *one-pot* synthesis. PVA serves as a stabilizer to prevent the agglomeration of nanoparticles. PVA is biocompatible and the synthesis is very promising to generate stable AuNPs for in vitro experiments. The drug deposition onto the AuNP@PVA composite relies on supramolecular, non-covalent O–H...O, N–H...O, and even O–H...Cl hydrogen-bonding interactions between the amide, amine, hydroxyl and chloro groups in DASA (cf. Supplementary Fig. S1) and the many alcohol hydroxyl groups in PVA [28]. The drug could be readily dissolved in ethanol at a concentration of 1 g/L. The PVA-coated gold nanoparticles (AuNP@PVA) were suspended in ethanol before DASA addition. To ensure that the solvent ethanol and the drug DASA did not affect the stability of the AuNPs, TEM images were taken to investigate the stability. The size and morphology of the AuNPs were determined to be unchanged when dispersing them in ethanol instead of water. The TEM images in Fig. 3 also show the distribution of the AuNPs before and after loading with DASA. A spherical shape without agglomeration can be observed in all three images (A–C) and the average size of the AuNPs is 9 ± 2 nm. From the contrast and the decomposition of organic matter in the energy of the 200 kV electron beam, the TEM images and histograms depict only the AuNPs and not the PVA shell.

Dynamic light scattering (DLS) was measured to determine the hydrodynamic diameter, the width of the particle distribution, and the polydispersity index (PDI) of AuNP@PVA. The size distribution from DLS is shown in Fig. 4I. The medium hydrodynamic diameter of the AuNP@PVA sample in water was 15 nm and the PDI was 0.23 (Fig. 4Ia). By changing the solvent from water to ethanol, the medium hydrodynamic diameter of AuNP@PVA in ethanol increased to 19 nm with a PDI of 0.25 (Fig. 4Ib). After loading with the drug, AuNP@PVA-DASA in ethanol had a hydrodynamic diameter of 19 nm and the PDI was 0.36 (Fig. 4Ic).

Ultraviolet–visible spectroscopy (UV–VIS) analysis in Fig. 4II displays the characteristic absorption maximum of DASA, AuNP@PVA in water, ethanol, and of AuNP@PVA-DASA in ethanol. The samples AuNP@PVA in water and ethanol have an absorbance maximum of 527 nm due to the surface plasmon resonance of AuNPs. Compared to the AuNP@PVA samples, AuNP@PVA-DASA shows in addition to the absorption band of AuNPs at 527 nm, the absorption maximum of DASA at 322 nm [29] which confirms the loading of AuNP@PVA with DASA.

IR spectra were measured with the dry samples to further verify the DASA loading through its characteristic bands in the sample AuNP@PVA-DASA in ethanol. The spectrum of AuNP@PVA-DASA in ethanol displays the signals for

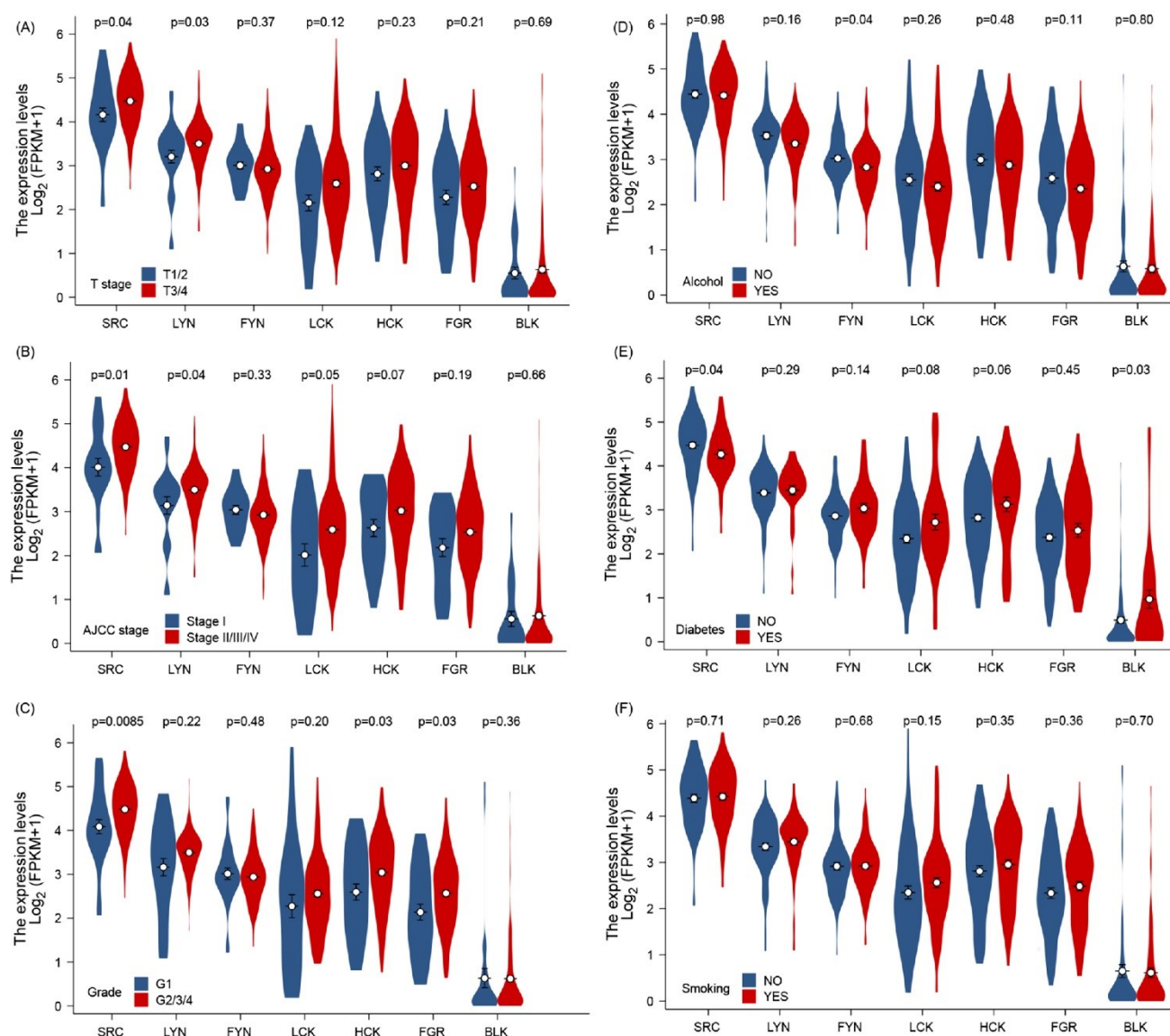


Fig. 1 The expression of Src kinase family members (SRC, LYN, FYN, LCK, HCK, FGR, BLK) genes in the clinical factor (T stage, AJCC stage, grade, alcohol, diabetes, and smoking). The Kruskal–Wallis H test was applied to all members of the Src kinase family within each clinic factor, followed by the Wilcoxon test to evaluate differences between individual genes and $p < 0.05$ was defined as statistically significant. **A** tumor (T) staging according to the tumor,

node and metastasis (TNM) system with T1/2 stages in blue, and T3/4 stages in red. **B** American Joint Committee of Cancer Staging (AJCC) system with low stage I in blue, and high stages II–IV in red. **C** Histopathological-based grading of tumor with grade 1 in blue and high grades 2–4 in red or in dependency of manifestation of risk factors (**D**: alcohol abuse, **E**: diabetes disease status, **F**: smoking)

the OH group (3467 cm^{-1}) and the NH group (3193 cm^{-1}), C=O (1618 cm^{-1}) from the amide bond, C=N (1575 cm^{-1}) and C=C (1508 cm^{-1}) also seen in the spectrum in DASA (Fig. 4III).

To determine the surface charge of the particles, the zeta potential was determined. The composite AuNP@PVA in water had a zeta potential of -20 mV and in ethanol, the zeta potential was -12 mV . After addition of the drug, the AuNP@PVA-DASA sample in ethanol assumed a zeta potential of -14 mV , which is close to the zeta potential of

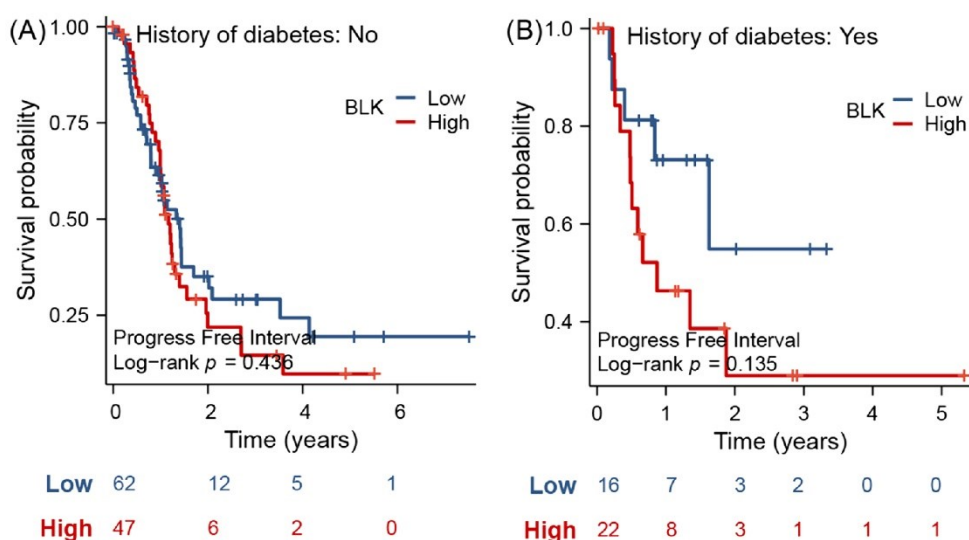
AuNP@PVA in ethanol, as would be expected for the addition of neutral DASA molecules into the PVA shell [30, 31].

From thermogravimetric analysis (TGA), the stability of the AuNP@PVA-DASA in ethanol sample up to 210°C could be determined (Supplementary Fig. S3).

Quantification of drug loading

After stirring AuNP@PVA for 72 h in the DASA solution ($V = 5.8\text{ mL}$) with a concentration of 0.1379 g/L , the

Fig. 2 Expression level of BLK in tumor samples of PDAC patient without history of diabetes cannot predict differences in mean overall survival of the patient (A), whereas a remarkable trend towards shorted overall survival time was noticed in diabetic PDAC patients with high BLK expression (B). The log rank test was used for survival analysis between high and low expression BLK groups, and $p < 0.05$ was defined as statistically significant



samples were centrifuged, hence the AuNP@PVA-DASA particles separated from the supernatant DASA solution, and the DASA concentration in the supernatant was quantified to 0.1246 g/L using a standard calibration curve of the HPLC (Supplementary Figs. S4 and S5).

From the molar amount of DASA before and after the loading of the AuNP@PVA composite, the molar amount of DASA on the nanoparticles can be calculated ($M_{DASA} = 488$ g/L) (Eq. 1). The molar difference was $1.57 \cdot 10^{-7}$ mol.

$$n_{DASA} = \frac{c_{DASAbefore-after} \cdot V}{M_{DASA}} = 1.57 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \quad (1)$$

With the following Eqs. (2)–(6) the average amount of DASA on a single AuNP@PVA particle is calculated.

At first, the average volume of a single AuNP, V_{AuNP} can be calculated with Eq. (2). The radius was determined by TEM ($r = 4.5$ nm).

$$V_{AuNP} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_{AuNP}^3 = 382 \text{ nm}^3 \quad (2)$$

The average mass of a single AuNP, m_{AuNP} is calculated by Eq. (3) with the specific density of Au ($\rho_{Au} = 19.32$ g/cm³).

$$m_{AuNP} = \rho_{Au} \cdot V_{AuNP} = 7.38 \cdot 10^{-18} \text{ g} \quad (3)$$

Assuming a 100% conversion of KAuCl_4 (20 mg, containing $m = 10.53$ mg Au) to AuNPs in 200 mL of water, from which 5 mL batches were taken for the DASA loading, the number of AuNPs, N_{AuNP} in the 5 mL dispersion can be determined (Eq. 4). The 5 mL dispersion contains $m_{Au} = 0.26$ mg.

$$N_{AuNP} = \frac{m_{Au}}{m_{AuNP}} = 3.5 \cdot 10^{16} \quad (4)$$

From the molar uptake amount of DASA of $n_{DASA} = 1.57 \cdot 10^{-7}$ mol and the Avogadro constant ($N_A = 6.022 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹) the number of DASA molecules, N_{DASA} taken up by the AuNP@PVA composite can be calculated using Eq. (5).

$$N_{DASA} = n_{DASA} \cdot N_A = 9.46 \cdot 10^{16} \quad (5)$$

Dividing the number of loaded DASA molecules, N_{DASA} by the number of AuNPs, N_{AuNP} then yields the average number of DASA molecules per AuNP@PVA particle, $N_{Au-DASA}$ (Eq. 6).

$$N_{Au-DASA} = \frac{N_{DASA}}{N_{AuNP}} = 2.7 \quad (6)$$

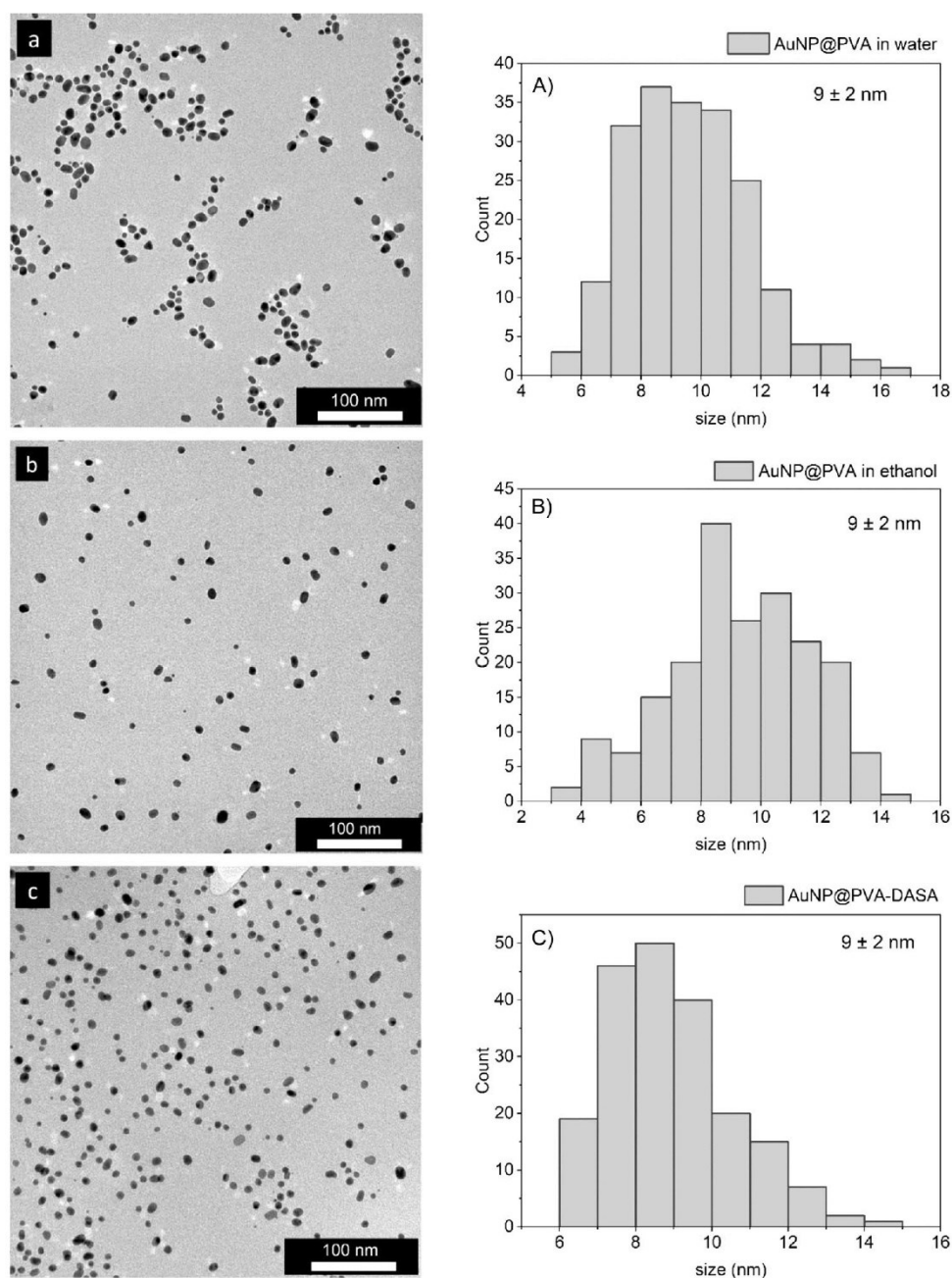
Thus, on average 2.7 DASA molecules are loaded on a single AuNP@PVA particle.

Stability tests

For the cell experiments, the cells were incubated with the AuNP@PVA-DASA conjugate for 4 days. To determine the stability of the AuNP@PVA-DASA conjugate during the cell experiments, the DASA-loaded gold-PVA nanoparticles were dispersed in the cell medium DMEM for 4 days at 37 °C and analyzed by HPLC, TEM, and DLS.

For comparison, the stability of AuNP@PVA-DASA was also analyzed in ethanol over 4 days at 37 °C, the solvent in which the AuNP@PVA-DASA conjugate was initially

Fig. 3 TEM images and histograms of **a** AuNP@PVA in water, **b** AuNP@PVA in ethanol and **c** AuNP@PVA-DASA in ethanol with an average size of the AuNPs of 9 nm with a rounded standard deviation of ± 2 nm. The rounded variance (V) and percentage variation coefficient (%CV) were also calculated: **a** V=4, %CV=21%; **b** V=5, %CV=25%; **c** V=3, %CV=18%. 200 particles were analyzed for each histogram



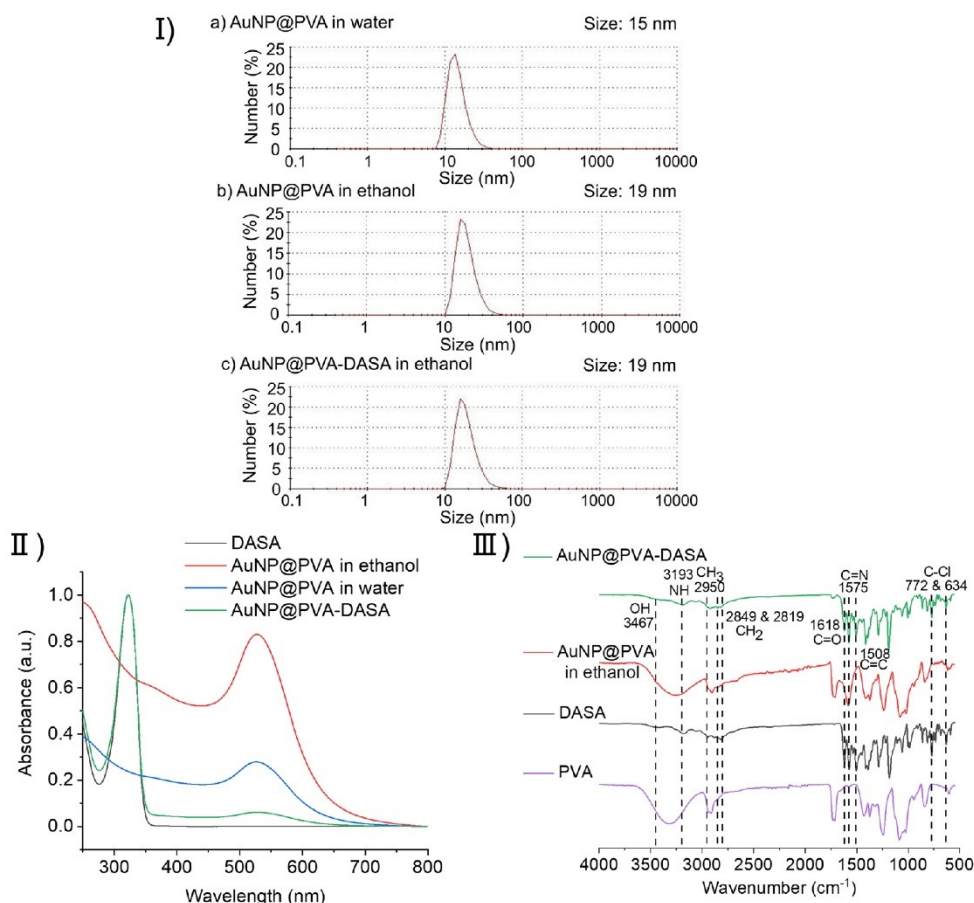
synthesized, to see if the change of solvent had an effect on the stability of the AuNP@PVA-DASA.

The TEM images and the distribution of AuNPs are shown in Supplementary Fig. S6. All images show unchanged spherical AuNPs without agglomeration over the time of 4 days, both in ethanol and in the cell-culture medium DMEM. Thus, AuNPs remained stable over 4 days in both solvent media with an average size of 9 ± 2 nm.

The development of the size distribution from dynamic light scattering of the AuNP@PVA and AuNP@PVA-DASA samples over time is shown in Supplementary Fig. S7. After DASA loading, the AuNP@PVA-DASA

conjugate showed a size of 19 nm in ethanol (cf. Fig. 4 above). The average hydrodynamic diameter of AuNP@PVA in DMEM is 26 nm with a PDI of 0.28. Changing the solvent from ethanol to DMEM increases the hydrodynamic diameter to 68 nm with a PDI of 0.87. After 1 day the AuNP@PVA-DASA conjugate had a hydrodynamic diameter of 197 nm with a PDI of 1, after 2 days a diameter of 256 nm with a PDI of 0.73, after 3 days a diameter of 794 nm with a PDI of 0.43 and after 4 days a diameter of 790 nm with a PDI of 0.52. The increase in the hydrodynamic diameter can be attributed to the swelling of the polymer under physiological conditions.

Fig. 4 **I** Dynamic light scattering measurements with hydrodynamic diameter of **a** AuNP@PVA in water (15 nm; PDI=0.23), **b** AuNP@PVA in ethanol (19 nm; PDI=0.25) and **c** AuNP@PVA-DASA in ethanol (19 nm; PDI=0.36). **II** Ultraviolet–visible spectra of DASA, AuNP@PVA in ethanol, AuNP@PVA in water and AuNP@PVA-DASA in ethanol with an absorbance maximum of AuNP@PVA at 527 nm and of DASA at 322 nm. **III** Infrared spectra of AuNP@PVA-DASA, AuNP@PVA in ethanol, DASA and PVA with the characteristic absorption bands of AuNP@PVA-DASA



The development of the hydrodynamic diameter over time of AuNP@PVA-DASA in ethanol is shown in Supplementary Fig. S8. Here the hydrodynamic diameter increases after 1 day from 19 nm (cf. Fig. 4) to 89 nm with a PDI of 0.25. After 2 days the AuNP@PVA-DASA conjugate has a hydrodynamic diameter of 248 nm with a PDI of 1, after 3 days a diameter of 286 nm with a PDI of 1 and after 4 days a diameter of 410 nm with a PDI of 0.58. Thus, by changing the solvent from ethanol to DMEM a higher hydrodynamic diameter can be observed.

In addition to the morphological stability, the DASA loading on the AuNPs in DMEM at 37 °C was also investigated over 4 days. For this purpose, the AuNP@PVA-DASA conjugate was resuspended in DMEM and the supernatant was measured daily by HPLC. The amount of DASA in the supernatant was used to determine the remaining DASA loading on the AuNPs. It was shown that 50% of the loaded DASA quantity was still adsorbed on the AuNPs after 1 day. After 2 days there was still about 20% of the initial DASA on the AuNP@PVA composite and after three days there was still about 1%. After four days, no DASA could be detected anymore in the supernatant, as the residual amount of AuNP@PVA which could be brought into solution was below the detection limit of 0.6×10^{-5} AU.

In vitro drug sensitivity test results

Following the characterization of the gold nanoparticle samples, the study proceeded to conduct in vitro experiments using AuNP@PVA-DASA in ethanol on three different PDAC cell lines. Notably, this study marks the first report of using AuNP conjugates with DASA for medical purposes specifically targeting PDAC. In Supplementary Fig. S9, exemplary microscopy images of the PANC1, AsPC1, and COLO357 cell lines are visualized. As indicated in the legend, cells were subjected to various treatments including AuNP@PVA in ethanol, AuNP@PVA-DASA in ethanol, naïve DASA, and control groups for a duration of 96 h. F, df, and exact *p* values for each in vitro drug sensitivity assay are documented in Supplementary Table S3. Figure 5 presents the quantitative data regarding the impact of the different treatment conditions on cellular growth revealing more therapy sensitivity in COLO357 as compared to other disease models. Overall, our nanomedicine approach was not able to increase the anti-growth effect of DASA, however, various follow-up studies are needed to verify if this is due to the inability to augment the bioavailability of the drug in the target cells.

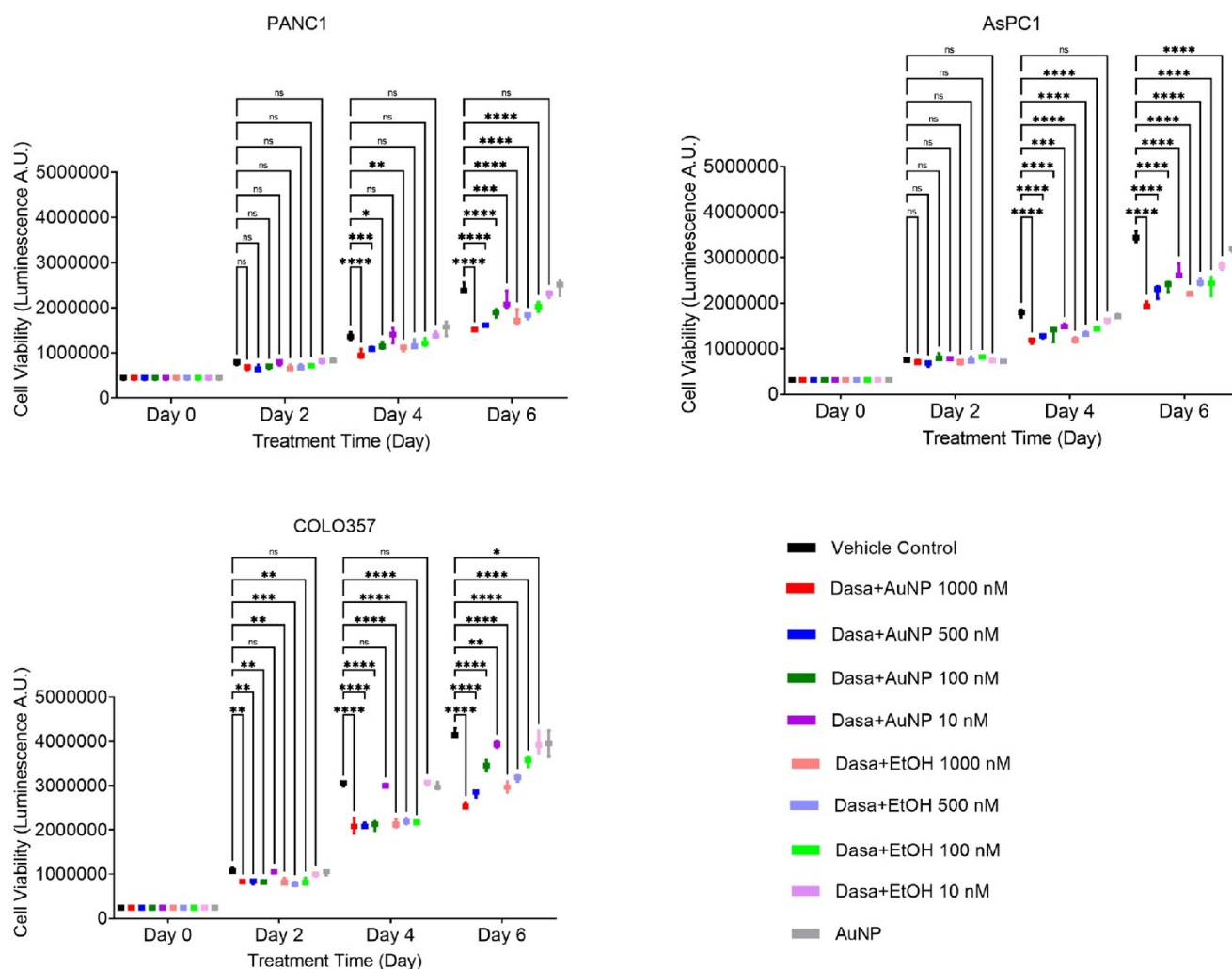


Fig. 5 Assessment of biological effects of nanoformulated DASA as compared to comparator treatments by quantifying cell growth of PDAC cell lines under exposure to different concentrations for up to 6 days. Cell growth-drug response plots of three PDAC cell models-PANC1, AsPC1 and COLO357. Selected dasatinib doses

were 1000 nM, 500 nM, 100 nM and 10 nM. ns signifying $p > 0.05$, * for ≤ 0.05 , ** for ≤ 0.01 , *** for ≤ 0.001 and **** for ≤ 0.0001 . Two-way ANOVA test for repeated measurement was performed with Dunnett's post hoc test for statistically significant datasets

Transcriptional activation of Src kinase family members in therapy-resistant vs therapy sensitive cell models

We tested the gene expression levels of Src family members on the used cell models using publicly available RNAseq data. Strikingly, the sensitive cell model COLO357 has significant upregulation of LYN, which was the only significant upregulated Src family member as compared to all resistant cell models (Fig. 6).

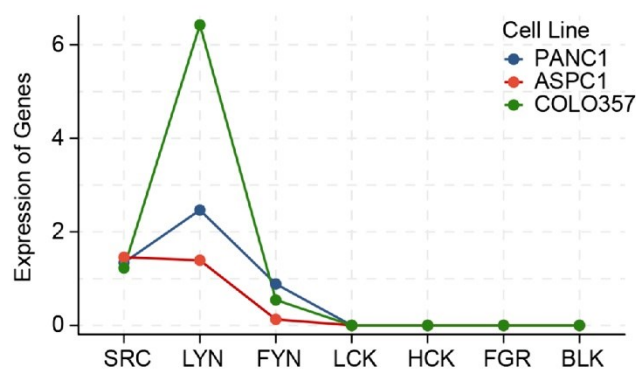


Fig. 6 Transcriptional activation of Src family gene members in the PDAC cell models reveals high LYN mRNA associated with increased sensitivity to DASA

Discussion

By using a variety of computational assessments on large-scale genome datasets, our work supports the clinical relevance of Src kinase pathways networks for the diagnosis of pancreatic cancer progression. Our analysis of survival data enforces the activation of the Src kinome as a promising therapeutic target and indicates that the family member BLK might be involved in the development of PDAC in diabetic patients. To overcome the high levels of therapy resistance of pancreatic cancer to the DASA, a clinical Src inhibitor, a development of nanoparticle-based delivery platform was developed. Functional validation of our nanodrug in cancer cell lines suggests that the Src member LYN plays a pivotal role in mediating the resistance to DASA no matter in naïve or in nanoparticle system.

The dysregulation of the Src kinases network is a main driver of tumorigenesis and the development of signaling inhibiting strategies is the center of a variety of drug development projects [6]. Src signaling is thought to support the notoriously high therapy resistance properties of PDAC and experimental work not only shows that inhibiting Src in PDAC is feasible [32], but also potentiates the effect of standard of care chemotherapy [33]. To date DASA is the only clinically approved Src kinase inhibitor used for the treatment of patients with blood cancers [8, 9]. Clinical trials investigating the potential of DASA to treat PDAC, however, have not resulted in promising outcomes (i.e. [19], NCT01395017, NCT04164069, NCT01660971 as assessed via www.clinicaltrials.gov in December 2023). Nanoparticle-based delivery of drugs is emerging as a technologically and clinically feasible strategy to overcome drug resistance barriers in cancer [34, 35], including for PDAC [36]. In a continuation of our previous work on increasing effectivity of an anti-cancer compound to treat highly chemotherapy resistant cancer stem cells [37, 38], we deployed our in-house developed gold nanoparticle platform for the purpose to augment the DASA PDAC cell killing effect. As a summary of our results, we conclude that the applied nano-medicine strategy did not deliver major advantages to the drug performance as compared to the naïve drug. Compared to our previous studies in glioblastoma, in this project we relied on classical monolayer cell models as test matrix for the nanoparticle system, as compared to 3D models. It is well known that 3D models are pathophysiological more suitable in vitro cancer models, usually featuring higher therapy resistance levels as their isogenic 2D counterparts [39, 40]. In contrast to our studies on glioblastoma, the cellular uptake of the current version of DASA gold nanoparticles is low with only moderate intracellular signal of the fluorescence dye labeled particles detectable after prolonged exposure time (up to

24 h, Supplementary Fig. S10). To narrow down the influence of the chemical modification applied in this project on the overall uptake properties of the particles, it would be interesting to compare the cellular uptake of our particles between the two diseases as well as between the two culture conditions of same cell line. Moreover, for follow-up projects, some relevant chemical aspects on the drug modification shall be considered that may improve the DASA uptake in PDAC cells: The cell uptake of AuNPs depends on their size. Most AuNPs cannot reach the tumor tissue due to their size, as they are either too small or too large. A nanoparticle size between 10 and 100 nm should be achieved in order to be able to penetrate the leaky tumor tissue. The size of the present AuNPs could be too small for the desired effect of strong penetration, as a result of which too low a concentration of the drug used reaches the tumor cells [41]. To do so, the AuNP size can be varied by changing the ratio of the gold precursor and the reducing agent NaCit or by exchanging the reducing agent NaCit with NaBH₄ [42]. In addition, stability tests were used to show that the AuNP remain stable under the conditions of the cell tests and that the DASA loading decreases during the 4 days.

Although our data is due to its correlative nature at most indicative rather than mechanistically explained, our analysis further supports the previously described important roles of Src kinase members as cancer biomarkers. LYN, as an important member of the SCR family, plays an important role in the disease progression of pancreatic cancer. As the results analyzed by our bioinformatics, this gene was significantly associated with the pancreatic cancer size, AJCC stage. In addition, we also found that the sensitive cell model COLO357 has significant upregulation of LYN. This conclusion is also supported by previous findings. By using enzymatic activity profiling, Creeden et al. recently identified LYN kinase over activation in PDAC cell lines and patient tissue samples [7]. Moreover, LYN kinase emerges as tumor micro environmental-derived regulator of cancer progression [43]. Stroma-derived LYN even enhances cancer cell survival [44], shedding new light on its role as resistance mediator for tumor cells under therapy stress. Of note, PDAC is a tumor type with the highest fraction of stroma, with reports stating that desmoplastic stroma cells feature up to 90% of the PDAC parenchyma [45]. Our cell line data further highlighted the relevance of LYN in PDAC. The results indicate that high mRNA expression of LYN might result in increased sensitivity towards DASA. COLO357, the cell model with the highest LYN activity, is known to represent a tumor with high Src dependency [46]. Our results are in line with previous reports on other diseases proposing a high LYN mRNA activation level as a vital indicator for drug sensitivity to DASA, such as in lung

cancer [47] and leukemia [48, 49]. Based on the above conclusions, we hypothesized that if the efficiency of drug delivery is increased in PDAC patients with high expression of LYN, the clinical benefit rate of patients can be significantly enhanced.

In addition, we also found a very significant upregulation of the Src kinases member BLK in PDAC patients with diabetes as compared to tumors developed by non-diabetic patients. Although due to the fact that a low sample size was analyzed and the result is not statistically significant, a high BLK expression in PDAC patients with diabetic history is associated with strongly reduced median overall survival time of the patients. The manifestation of diabetes is a mayor risk factor for pancreatic cancer development [50]. Identification of underlying molecular mediators of this risk factor for PDAC development will be of tremendous impact for the community. We hypothesize that BLK with AuNP@PVA-DASA conjugates is an interesting candidate for PDAC patients with diabetes.

PDAC cases exhibiting neural invasion or inclusion are a historically well-defined morphological subtype of the disease with particular bad clinical prognosis associated for the patient [23, 51]. We also investigated whether there are risk factors among Src family members that promote the development of PNI in tumors to provide a basis for the development of the AuNP@PVA-DASA system targeting this protein. To the best of our knowledge, we performed the first analysis to probe for differences in Src activation in perineural invading (PNI) PDAC vs PDCA that do not involve neural components as defined by pathology diagnostics (non-PNI PDAC). Unfortunately, the results show that Src signalling seems not to be involved in PNI-driven biology of PDAC. However, our analysis uses sequencing data retrieved from bulk samples ignoring intra-tumoral heterogeneity. It would be interesting to test Src activity in PDAC cells juxtaposing the nerves and compare to the signals found in the tumor parenchyma.

In line with results from peptide-based kinome array profiling that showed increased protein tyrosine kinase activity in PDAC and suggested LYN and BLK amongst most promising candidates [7], our work further supports the importance of LYN and BLK in pancreatic oncology. Follow-up studies with functional models with genetically inhibited LYN/BLK, ideally featuring stroma microenvironment as a culture component, are required to verify our indicative hypothesis. Moreover, one might transform PDAC in a druggable type of disease by optimizing DASA delivery into hard to treat PDAC cells, i.e. via equipping our particle platform with a targeting moiety to enforce tumor cell surface binding [52], construction of multidrug nanomedicines [53], developing smart sequential combination treatments or employing synthetic and/or self-assembling carriers such as dendrimers [54].

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s43440-024-00600-w>.

Acknowledgements UDK thanks P-H Nguyen, University of Cologne, Cologne, Germany for the stimulating discussion about LYN. The authors thank Birgit Tommes for the IR measurements and Till Strothmann for carrying out the TGA measurements. We also thank the Core Facility for Electron Microscopy of the Institute of Medical Faculty of the Heinrich Heine University Düsseldorf for access to the JEOL JEM-2100Plus electron microscope instrument.

Author contributions MK, AYS, WS conducted experiments and prepared figures. MK and UDK wrote manuscript draft, UDK, AYS and CJ performed manuscript editing. UDK and CJ provided resources to conduct this study and developed the project idea.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. No external funding was received for this study.

Data availability All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

Declarations

Conflict of interest All authors declare no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Masso-Valles D, Jauset T, Serrano E, Sodir NM, Pedersen K, Affara NI, et al. Ibrutinib exerts potent antifibrotic and antitumor activities in mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2015;75:1675–81. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2852>.
2. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2016;388:73–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00141-0).
3. Stock K, Borriek R, Mikesch JH, Hansmeier A, Rehkämper J, Trautmann M, et al. Overexpression and Tyr421-phosphorylation of cortactin is induced by three-dimensional spheroid culturing and contributes to migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. *Cancer Cell Int.* 2019;19:1–15.
4. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:513–609. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.513>.
5. Martellucci S, Clementi L, Sabetta S, Mattei V, Botta L, Angelucci A. Src family kinases as therapeutic targets in advanced solid tumors: what we have learned so far. *Cancers.* 2020;12:1448. <https://doi.org/10.3390/cancers12061448>.

6. Poh AR, Ernst M. Functional roles of SRC signaling in pancreatic cancer: recent insights provide novel therapeutic opportunities. *Oncogene*. 2023;42:1786–801. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02701-x>.
7. Creeden JF, Alganem K, Imami AS, Brunicardi FC, Liu S-H, Shukla R, et al. Kinome array profiling of patient-derived pancreatic ductal adenocarcinoma identifies differentially active protein tyrosine kinases. *Int J Mol Sci*. 2020;21:8679. <https://doi.org/10.3390/ijms21228679>.
8. Bartscht T, Rosien B, Rades D, Kaufmann R, Biersack H, Lehnert H, et al. Inhibition of TGF- β signaling in tumor cells by small molecule Src family kinase inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(10):1351–6.
9. Demetri GD, Russo PL, MacPherson IRJ, Wang D, Morgan JA, Brunton VG, et al. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6232–40. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0224>.
10. Rossari F, Minutolo F, Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2018;11:84. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0624-2>.
11. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomed*. 2007;2:681–93. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.5.681>.
12. Duncan B, Kim C, Rotello VM. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *J Control Release*. 2010;148:122–7. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.004>.
13. Grace AN, Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2007;297:63–70. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.024>.
14. Pal K, Al-Suraih F, Gonzalez-Rodriguez R, Dutta SK, Wang E, Kwak HS, et al. Multifaceted peptide assisted one-pot synthesis of gold nanoparticles for plectin-1 targeted gemcitabine delivery in pancreatic cancer. *Nanoscale*. 2017;9:15622–34. <https://doi.org/10.1039/c7nr03172f>.
15. Dong C, Li B, Li Z, Shetty S, Fu J. Dasatinib-loaded albumin nanoparticles possess diminished endothelial cell barrier disruption and retain potent antileukemia cell activity. *Oncotarget*. 2016;7:49699–709. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10435>.
16. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 2004;303:1818–22. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>.
17. Fratoddi I, Venditti I, Cametti C, Russo MV. Gold nanoparticles and gold nanoparticle-conjugates for delivery of therapeutic molecules. Progress and challenges. *J Mater Chem B*. 2014;2:4204–20. <https://doi.org/10.1039/C4TB00383G>.
18. Singh A, Trivedi P, Jain NK. Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46:274–83. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1307210>.
19. Chee CE, Krishnamurthi S, Nock CJ, Meropol NJ, Gibbons J, Fu P, et al. Phase II study of dasatinib (BMS-354825) in patients with metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncologist*. 2013;18:1091–2. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0255>.
20. George TJ, Starr JS, Parekh HD, Ivey AM, McGorray SP, Wang Y, et al. Final results from a phase II study of 5-fluorouracil, oxaliplatin, and dasatinib (FOLFOX-D) in previously untreated metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2018;36:4124–4124. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.4124.
21. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
22. Roalsø M, Aunan JR, Sørceide K. Refined TNM-staging for pancreatic adenocarcinoma—real progress or much ado about nothing? *Eur J Surg Oncol*. 2020;46:1554–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.02.014>.
23. Selvaggi F, Melchiorre E, Casari I, Cinalli S, Cinalli M, Aceto GM, et al. Perineural invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma: from molecules towards drugs of clinical relevance. *Cancers*. 2022;14:5793. <https://doi.org/10.3390/cancers14235793>.
24. Chun YS, Pawlik TM, Vauthey J-N. 8th edition of the AJCC cancer staging manual: pancreas and hepatobiliary cancers. *Ann Surg Oncol*. 2018;25:845–7. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-6025-x>.
25. Haeblerle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019;4:50. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.06.02>.
26. Winkler F, Venkatesh HS, Amit M, Batchelor T, Demir IE, Dencen B, et al. Cancer neuroscience: State of the field, emerging directions. *Cell*. 2023;186:1689–707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.002>.
27. Wakiya T, Ishido K, Yoshizawa T, Kanda T, Hakamada K. Roles of the nervous system in pancreatic cancer. *Ann Gastroenterol Surg*. 2021;5:623–33. <https://doi.org/10.1002/ags3.12459>.
28. Zhang H, Ren P, Yang F, Chen J, Wang C, Zhou Y, et al. Biomimetic epidermal sensors assembled from polydopamine-modified reduced graphene oxide/polyvinyl alcohol hydrogels for the real-time monitoring of human motions. *J Mater Chem B*. 2020;8:10549–58. <https://doi.org/10.1039/d0tb02100h>.
29. Korashy HM, Rahman AFMM, Kassem MG. Chapter Four - Dasatinib. In: Brittain HG, editor. *Profiles Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, vol. 39, Academic Press; 2014, pp. 205–37. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00004-0>.
30. Li Q, Yang X, Zhang P, Mo F, Si P, Kang X, et al. Dasatinib loaded nanostructured lipid carriers for effective treatment of corneal neovascularization. *Biomater Sci*. 2021;9:2571–83. <https://doi.org/10.1039/D0BM01599G>.
31. Sun J, Liu Y, Chen Y, Zhao W, Zhai Q, Rathod S, et al. Doxorubicin delivered by a redox-responsive dasatinib-containing polymeric prodrug carrier for combination therapy. *J Control Release*. 2017;258:43–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.006>.
32. Zeng S, Pöttler M, Lan B, Grützmann R, Pilarsky C, Yang H. Chemoresistance in pancreatic cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4504. <https://doi.org/10.3390/ijms20184504>.
33. Su L, Chen Y, Huang C, Wu S, Wang X, Zhao X, et al. Targeting Src reactivates pyroptosis to reverse chemoresistance in lung and pancreatic cancer models. *Sci Transl Med*. 2023;15:7895. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl7895>.
34. Yao Y, Zhou Y, Liu L, Xu Y, Chen Q, Wang Y, et al. Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance. *Front Mol Biosci*. 2020;7:193.
35. Wang W-D, Guo Y-Y, Yang Z-L, Su G-L, Sun Z-J. Sniping cancer stem cells with nanomaterials. *ACS Nano*. 2023;17:23262–98. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c07828>.
36. Tarannum M, Vivero-Escoto JL. Nanoparticle-based therapeutic strategies targeting major clinical challenges in pancreatic cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;187: 114357. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114357>.
37. Poonaki E, Nickel A-C, Shafiee Ardestani M, Rademacher L, Kaul M, Apartsin E, et al. CD133-functionalized gold nanoparticles as a carrier platform for telaglenastat (CB-839) against tumor stem cells. *Int J Mol Sci*. 2022;23:5479. <https://doi.org/10.3390/ijms23105479>.
38. Giesen B, Nickel AC, Barthel J, Kahlert UD, Janiak C. Augmented therapeutic potential of glutaminase inhibitor cb839 in

- glioblastoma stem cells using gold nanoparticle delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13:1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020295>.
39. Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*. 2016;7:45745–56. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9935>.
 40. Świerczewska M, Sterzyńska K, Ruciński M, Andrzejewska M, Nowicki M, Januchowski R. The response and resistance to drugs in ovarian cancer cell lines in 2D monolayers and 3D spheroids. *Biomed Pharmacother*. 2023;165: 115152. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115152>.
 41. Qiu W, Chen R, Chen X, Zhang H, Song L, Cui W, et al. Oridonin-loaded and GPC1-targeted gold nanoparticles for multimodal imaging and therapy in pancreatic cancer. *Int J Nanomed*. 2018;13:6809–27. <https://doi.org/10.2147/IJN.S177993>.
 42. Liu Y, Male KB, Bouvrette P, Luong JHT. Control of the Size and Distribution of Gold Nanoparticles by Unmodified Cyclodextrins. *Chem Mater*. 2003;15:4172–80. <https://doi.org/10.1021/cm0342041>.
 43. Nguyen P-H, Fedorchenko O, Rosen N, Koch M, Barthel R, Winarski T, et al. LYN kinase in the tumor microenvironment is essential for the progression of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2016;30:610–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.007>.
 44. vom Stein AF, Rebollido-Rios R, Lukas A, Koch M, von Lom A, Reinartz S, et al. LYN kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS1. *Nat Commun*. 2023;14:1330. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36824-2>.
 45. Orth M, Metzger P, Gerum S, Mayerle J, Schneider G, Belka C, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat Oncol*. 2019;14:141. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1345-6>.
 46. Kotha A, Sekharam M, Cilenti L, Siddiquee K, Khaled A, Zervos AS, et al. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:621–9. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0268>.
 47. Kim YJ, Hong S, Sung M, Park MJ, Jung K, Noh K-W, et al. LYN expression predicts the response to dasatinib in a subpopulation of lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget*. 2016;7:82876–88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12657>.
 48. Tomii T, Imamura T, Tanaka K, Kato I, Mayumi A, Soma E, et al. Leukemic cells expressing NCOR1-LYN are sensitive to dasatinib in vivo in a patient-derived xenograft mouse model. *Leukemia*. 2021;35:2092–6. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01091-3>.
 49. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Ohyashiki K. Dasatinib preferentially induces apoptosis by inhibiting Lyn kinase in nilotinib-resistant chronic myeloid leukemia cell line. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2011;4:32. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-32>.
 50. Sharma A, Kandlakunta H, Nagpal SJS, Feng Z, Hoos W, Petersen GM, et al. Model to determine risk of pancreatic cancer in patients with new-onset diabetes. *Gastroenterology*. 2018;155:730–739.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.05.023>.
 51. Felsenstein M, Lindhammer F, Feist M, Hillebrandt KH, Timmermann L, Benzing C, et al. Perineural invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a saboteur of curative intended therapies? *J Clin Med*. 2022;11:2367. <https://doi.org/10.3390/jcm11092367>.
 52. Bazak R, Hourri M, Achy SE, Kamel S, Refaat T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141:769–84. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1767-3>.
 53. Detappe A, Nguyen HV-T, Jiang Y, Agius MP, Wang W, Mathieu C, et al. Molecular bottlebrush prodrugs as mono- and triplex combination therapies for multiple myeloma. *Nat Nanotechnol*. 2023;18:184–92. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01310-1>.
 54. Chehelgerdi M, Chehelgerdi M, Allela OQB, Pecho RDC, Jayasankar N, Rao DP, et al. Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation. *Mol Cancer*. 2023;22:169. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01865-0>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Files legends:

Figure S1: Chemical structure of dasatinib and schematic synthetic route to gold nanoparticle polyvinyl ethanol (AuNP@PVA) with subsequent deposition of the drug dasatinib.

Figure S2: mRNA levels of Src kinase family members (SRC, LYN, FYN, LCK, HCK, FGR) in PDAC cases with perineal invasion (PNI) in red as compared to PDAC tumor without PNI manifestation in blue

Figure S3: Thermogravimetric analysis, TGA curve with the decomposition temperatures for DASA (290 °C, 393 °C), AuNP@PVA-DASA (210 °C, 565 °C) and PVA (280 °C, 434 °C).

Figure S4: HPLC chromatogram of DASA in methanol-water on a Luna C18(2) column.

Figure S5: Calibration curve for the HPLC quantification of DASA.

Figure S6: TEM images and histograms of a) AuNP@PVA in DMEM, b) AuNP@PVA-DASA in DMEM immediately after the synthesis ("0 day") at room temperature, c) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 1 day at 37 °C, d) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 2 days at 37 °C, e) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 3 days at 37 °C, f) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 4 days at 37 °C, g) AuNP@PVA-DASA in ethanol after 1 day at 37 °C, h) AuNP@PVA-DASA in ethanol after 2 days at 37 °C, i) AuNP@PVA-DASA in ethanol after 3 days at 37 °C and j) AuNP@PVA-DASA in ethanol after 4 days at 37 °C with an average size of the AuNPs of 9 nm with a rounded standard deviation of ± 2 nm. The rounded variance (V) and percentage variation coefficient (%CV) were also calculated: a) V = 2, %CV = 16 %; b) V = 2, %CV = 15 %; c) V = 2, %CV = 16 %; d) V = 1, %CV = 13 %; e) V = 2, %CV = 16 %; f) V = 3, %CV = 18 %; g) V = 6, %CV = 26 %; h) V = 2, %CV = 16 %; i) V = 2, %CV = 16 % and j) V = 2, %CV = 16 %. For the histograms 200 particles were analyzed for AuNP@PVA in DMEM and AuNP@PVA-DASA in ethanol and 100 particles were analyzed for AuNP@PVA-DASA in DMEM using larger areas of the TEM images.

Figure S7: Dynamic light scattering measurements with hydrodynamic diameter of a) AuNP@PVA in DMEM (26 nm; PDI = 0.28), b) AuNP@PVA-DASA in DMEM immediately after the synthesis ("0 day") at room temperature (68 nm; PDI = 0.87) and c) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 1 day at 37 °C (197 nm; PDI = 1.0), d) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 2 days at 37 °C (256 nm; PDI = 0.73), e)

AuNP@PVA-DASA in DMEM after 3 day at 37 °C (794 nm; PDI = 0.43) and f) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 4 days at 37 °C (790 nm; PDI = 0.52).

Figure S8: Dynamic light scattering measurements with hydrodynamic diameter of a) AuNP@PVA-DASA in ethanol after 1 day at 37 °C (89 nm; PDI = 0.25) and b) AuNP@PVA-DASA in ethanol after 2 days at 37 °C (248 nm; PDI = 1.0), c) AuNP@PVA-DASA in ethanol after 3 days at 37 °C (286 nm; PDI = 1.0) and d) AuNP@PVA-DASA in DMEM after 4 days at 37 °C (410 nm; PDI = 0.58).

Figure S9: Microscopy images of PDAC cell lines PANC1, AsPC1 and COLO357, treated with AuNP@PVA-DASA for 96 h and incubated in normal culture media for further 96 h.

Figure S10: Live cell fluorescence imaging of the three cell lines used in this study after incubation with FITC-loaded AuNP (for details on used concentration please refer to method section in main manuscript), counterstain of DNA with Hoechst dye.

Table S1: STR profiles of cell lines used in this study.

Table S2: Levene's test of groups.

Table S3: Statistical values (main effects, interactions and post hoc comparison) for each datasets of Figure 5.

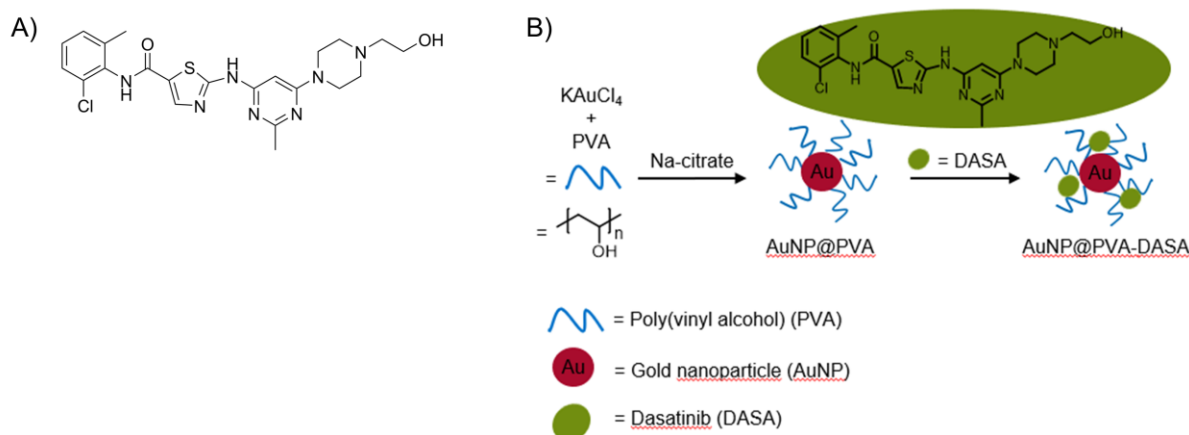


Figure 1

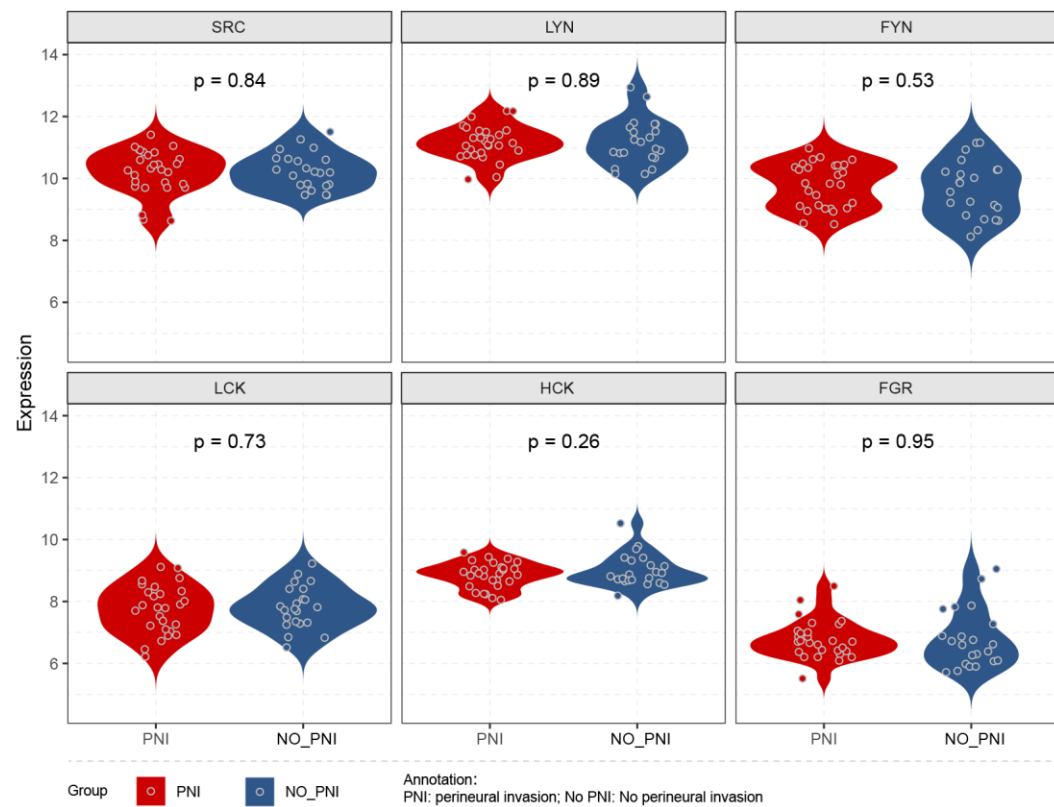


Figure 2

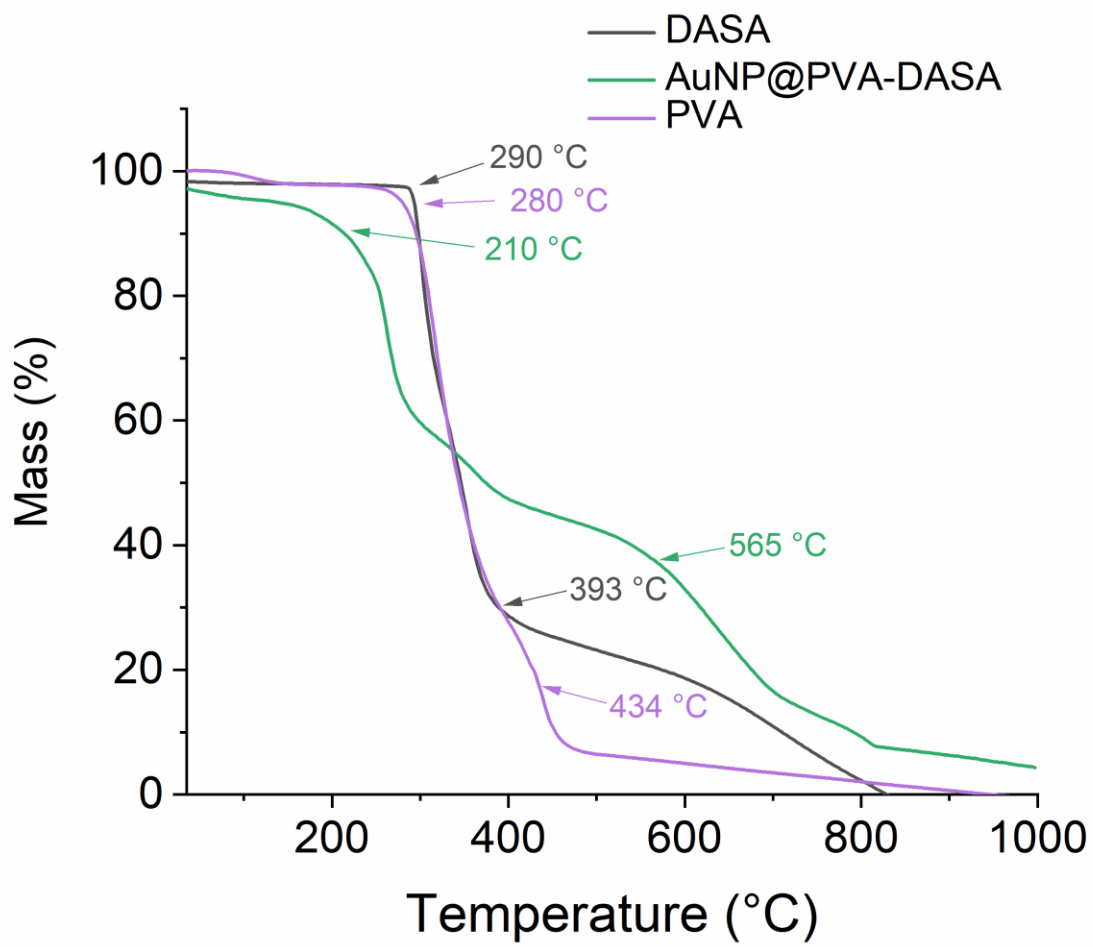


Figure 3

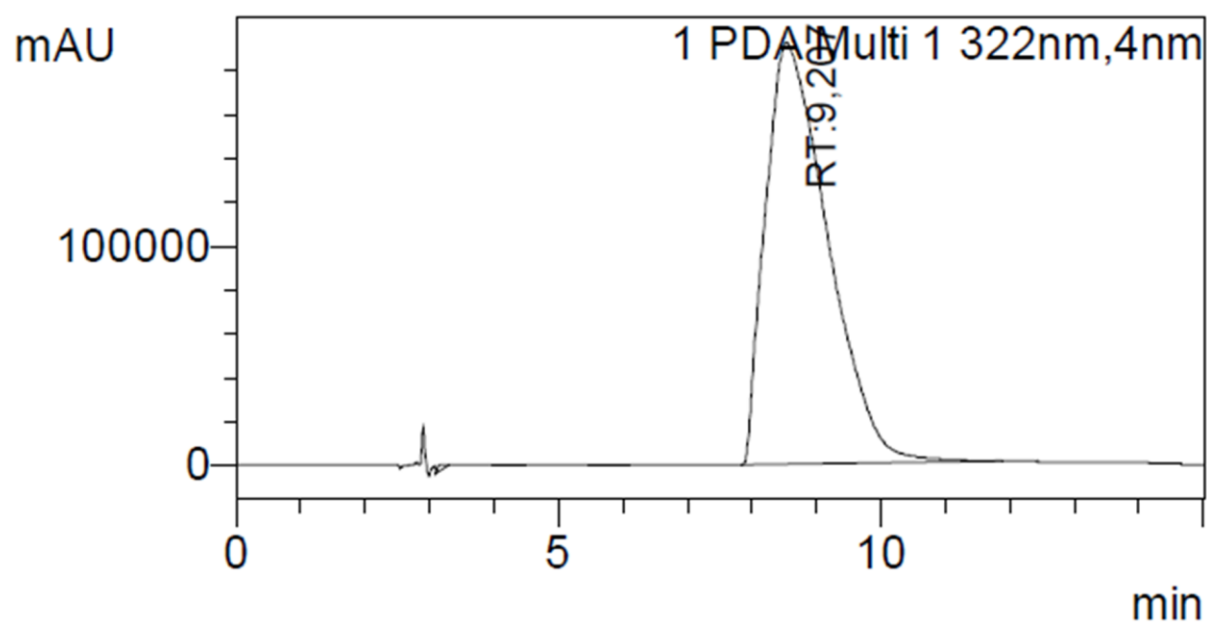


Figure 4

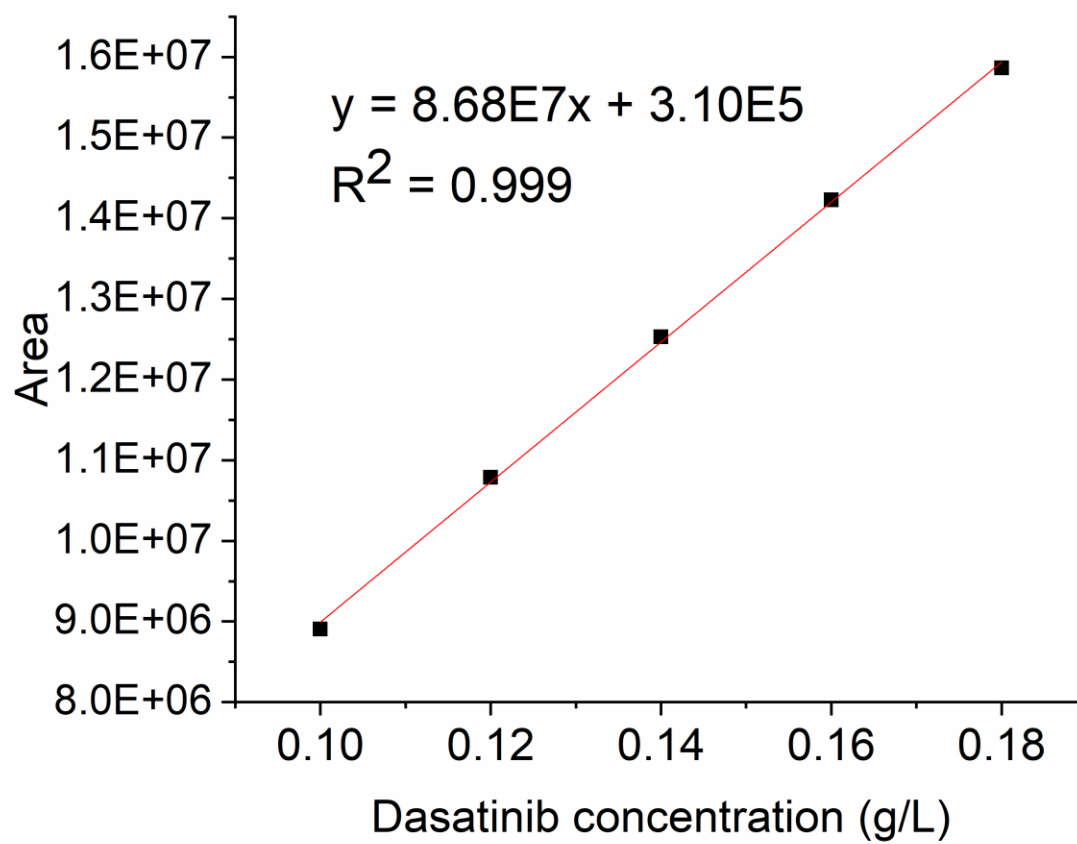


Figure 5

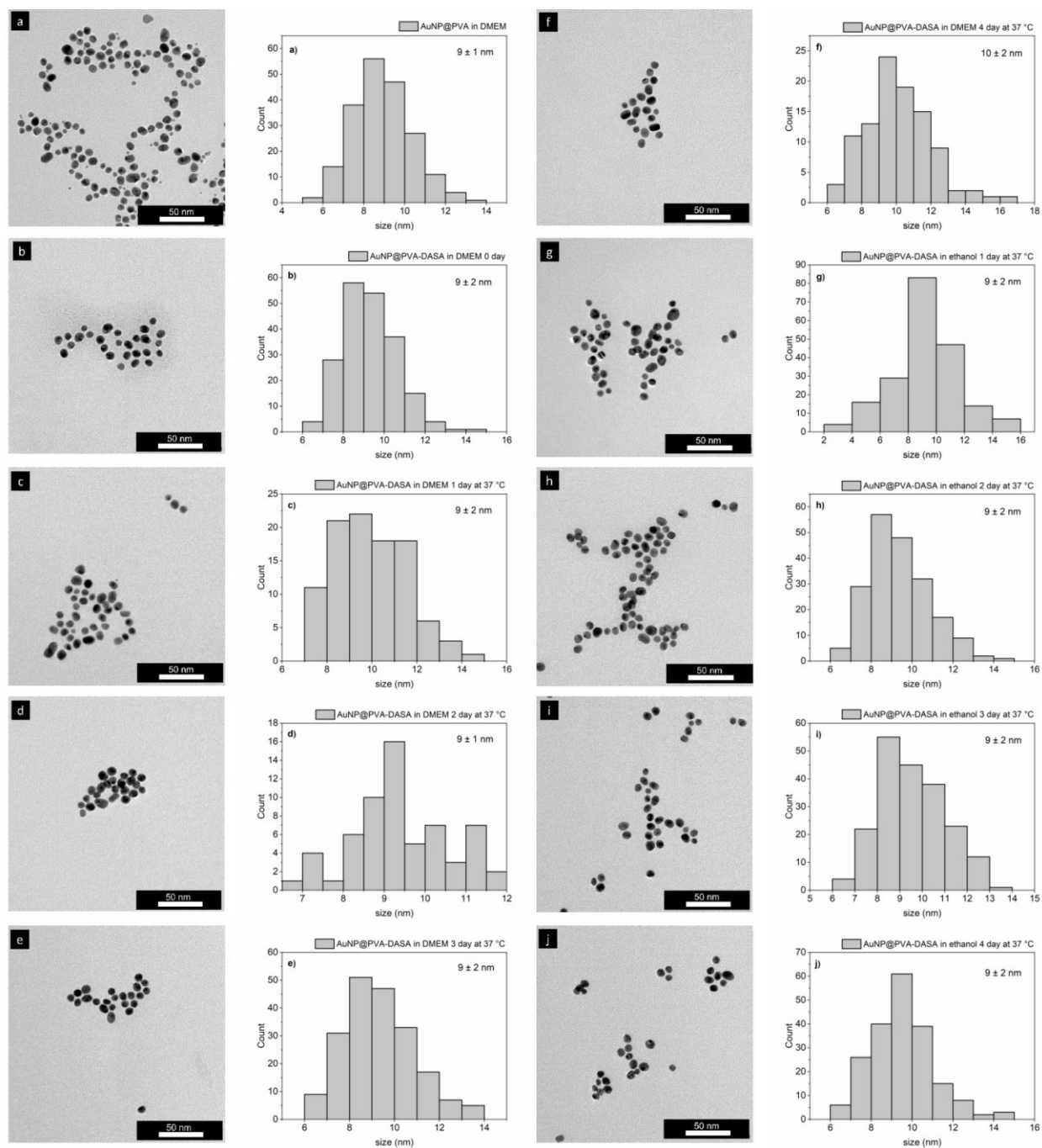


Figure 6

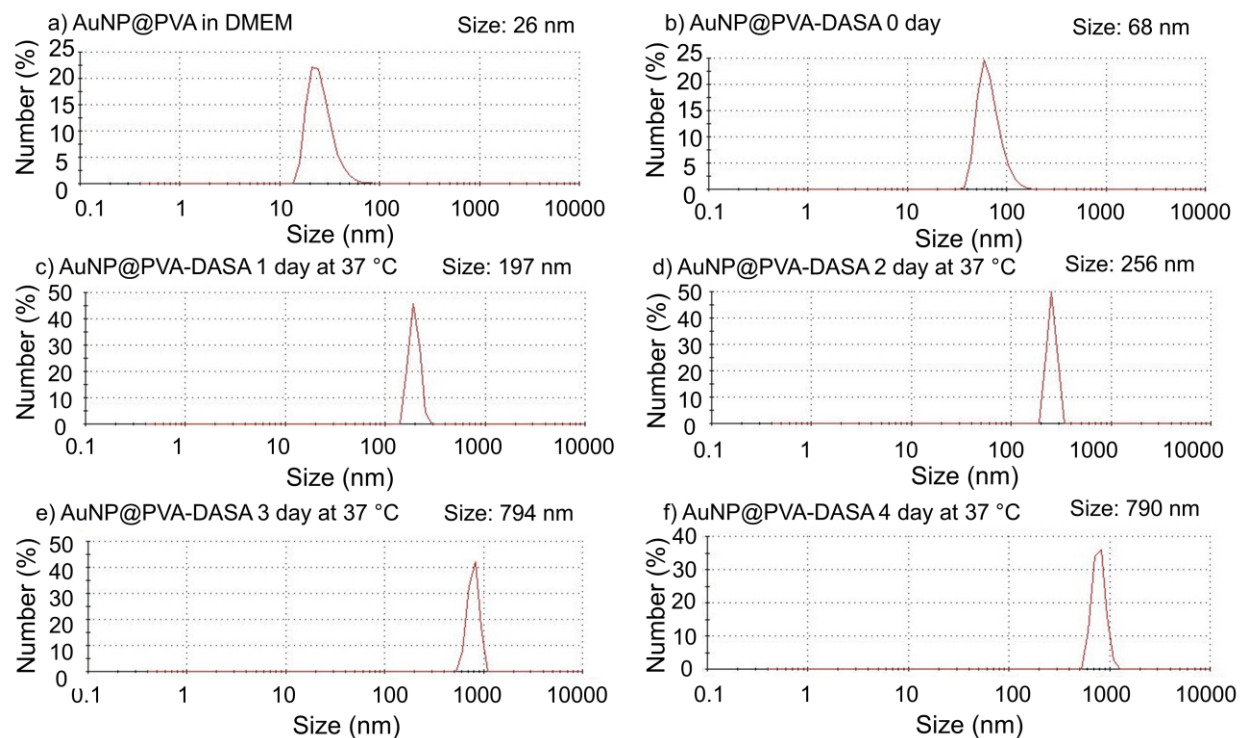


Figure 7

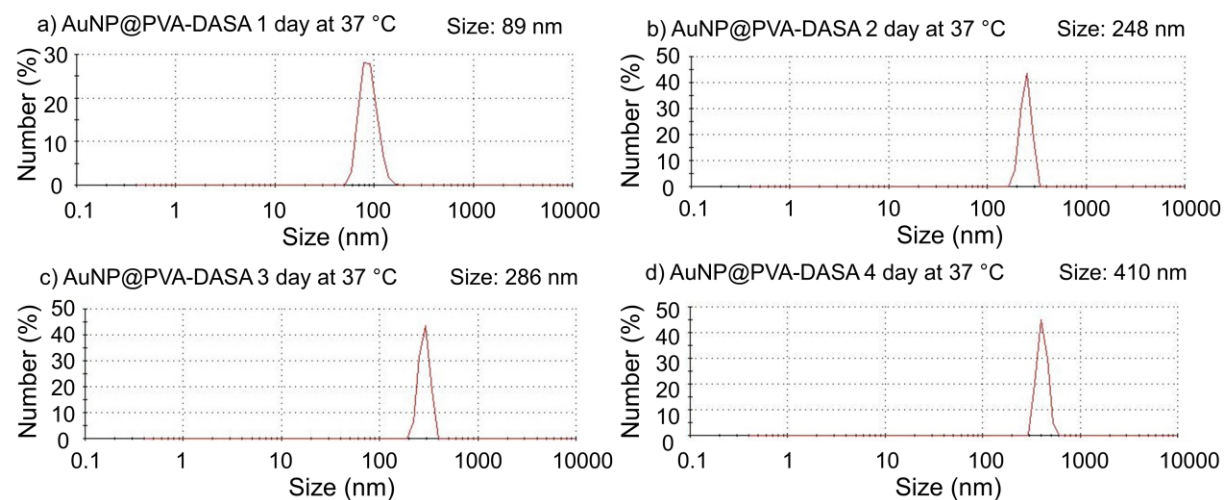


Figure 8

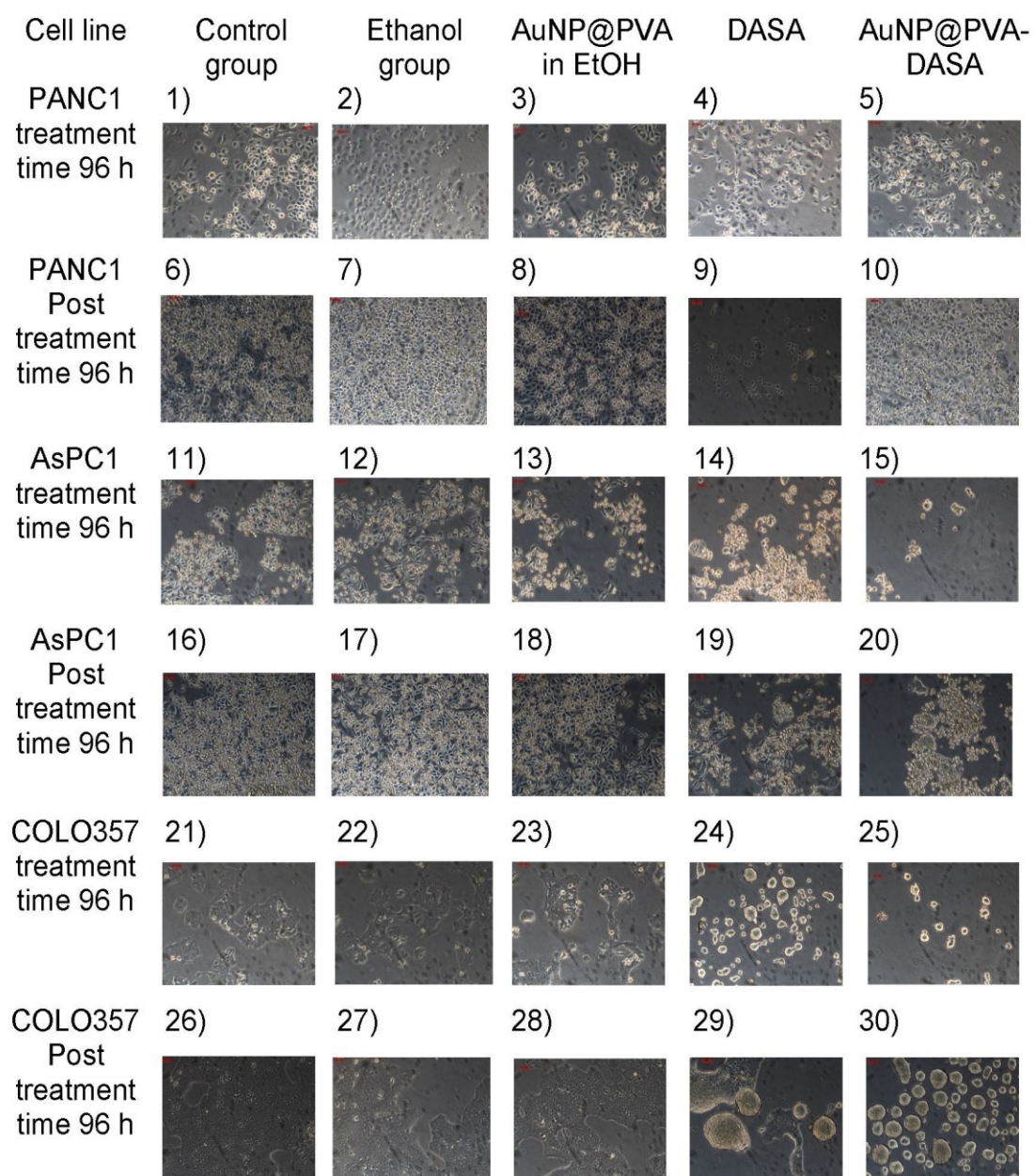


Figure 9

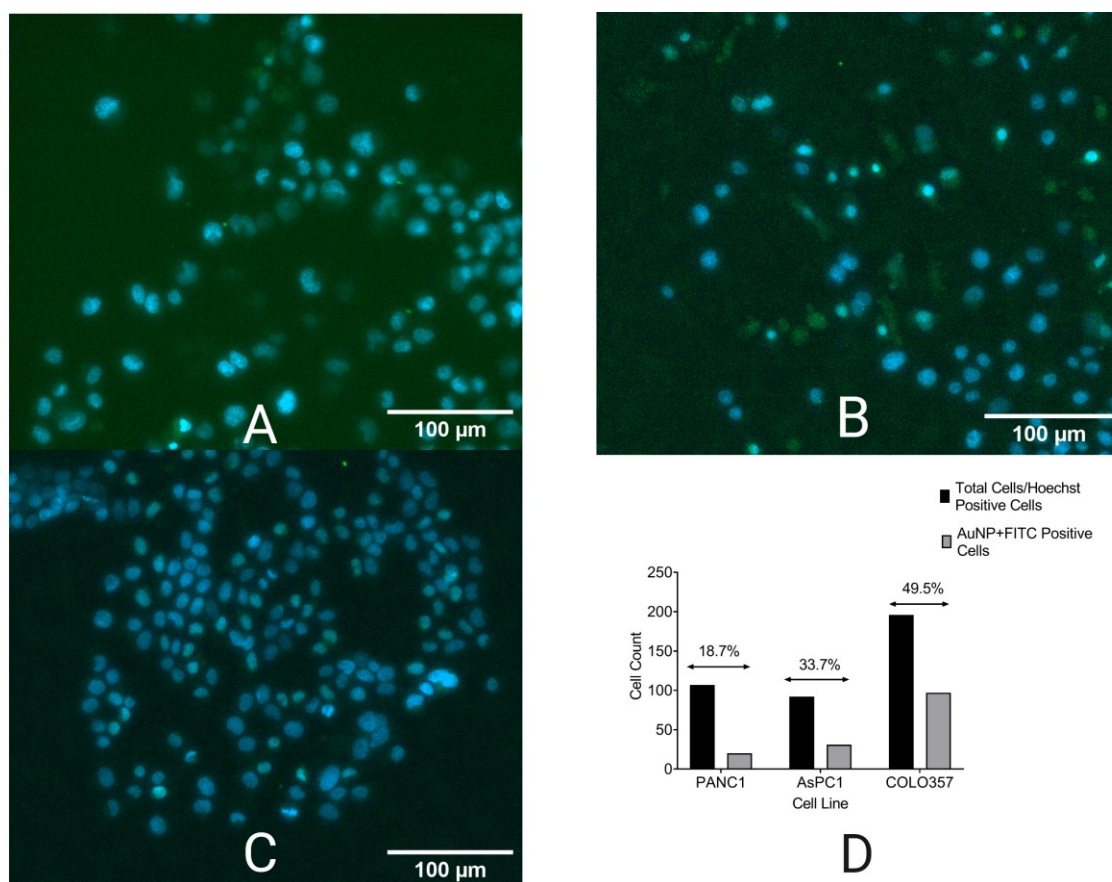


Figure 10

Table S1: STR profiles of cell lines used in this study.

T stage

Genes	df1	df2	F	p value
SRC	1	175	2.8115	0.0954
LYN	1	175	3.1744	0.0765
FYN	1	175	1.9732	0.1619
LCK	1	175	0.41299	0.5213
HCK	1	175	0.034463	0.8529
FGR	1	175	0.15956	0.6900
BLK	1	175	0.26836	0.6051

AJCC stage

Genes	df1	df2	F	p value
SRC	1	174	3.5818	0.0601
LYN	1	174	6.2926	0.0130
FYN	1	174	0.72021	0.3972
LCK	1	174	2.8345	0.0941
HCK	1	174	0.044419	0.8333

FGR	1	174	0.22419	0.6365
BLK	1	174	0.015706	0.9004
Grade				
Genes	df1	df2	F	p value
SRC	1	175	5.0169	0.0264
LYN	1	175	44.373	3.39e-10
FYN	1	175	0.74672	0.3887
LCK	1	175	15.686	0.0001
HCK	1	175	2.2423	0.1361
FGR	1	175	2.7506	0.0990
BLK	1	175	0.51037	0.4759
Alcohol				
Genes	df1	df2	F	p value
SRC	1	165	0.18266	0.6697
LYN	1	165	0.31051	0.5781
FYN	1	165	0.21091	0.6467
LCK	1	165	0.1005	0.7516
HCK	1	165	0.58545	0.4453
FGR	1	165	0.65942	0.4179
BLK	1	165	1.2025	0.2744
Diabetes				
Genes	df1	df2	F	p value
SRC	1	143	0.044959	0.8324
LYN	1	143	0.042976	0.8361
FYN	1	143	0.43907	0.5086
LCK	1	143	2.2733	0.1338
HCK	1	143	0.36117	0.5488
FGR	1	143	0.010412	0.9189
BLK	1	143	0.5062	0.4779

Table 2

	PANC1	AsPC1	COLO357
D3S1358	17	16	15
D13S317	11	9, 12	11
D16S539	11	11	9, 12
D18S51	12	18	13

D2S1338	23, 24	22, 23	21, 24
CSF1PO	10, 12	10, 13	11
TH01	7, 8	9.3	7
VWA	15	17	18
D21S11	28	28, 30	29, 32.2
D7S820	8, 10	12, 13	8, 10
D5S818	11, 13	12	11
TPOX	8, 11	8, 10	8
D8S1179	14, 15	13, 15	14
D19S433	11, 16	14	11, 13
FGA	21	24	25
AMEL	X	X	X

Table S3

PANC1

Within each row, compare columns (simple effects within rows)

Number of families 4

Number of comparisons per family 9

Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary Adjusted P Value
-------------------------------------	------------	--------------------	------------------	--------------------------

Day 0

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999

Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. AuNP	0	-181151 to 181151	No	ns	>0.9999

Day 2

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	112024	-69127 to 293175	No	ns	0.4337
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	110341	-70810 to 291492	No	ns	0.4508
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	89427	-91724 to 270578	No	ns	0.6816
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	3125	-178026 to 184276	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	104331	-76820 to 285482	No	ns	0.5145
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM		83658	-97493 to 264809	No	ns 0.7451
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM		55772	-125379 to 236923	No	ns 0.9614
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM		-25963	-207114 to 155188	No	ns 0.9998
Vehicle Control vs. AuNP		-62504	-243655 to 118647	No	ns 0.9281

Day 4

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	401245	220094 to 582396	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	272629	91478 to 453780	Yes	***	0.0007
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	208679	27528 to 389830	Yes	*	0.0161
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	-21638	-202789 to 159513	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	264936	83785 to 446087	Yes	**	0.0011
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	180551	-599.8 to 361702	No	ns	0.0511

Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	135354	-45797 to 316505	No	ns	0.2355
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	-35822	-216973 to 145329	No	ns	0.998
Vehicle Control vs. AuNP	-176229	-357380 to 4922	No	ns	0.0603

Day 6

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	925211	744060 to 1106362	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	836013	654862 to 1017164	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	561681	380530 to 742832	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	292627	111476 to 473778	Yes	***	0.0002
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	669154	488003 to 850305	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	633571	452420 to 814722	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	424391	243240 to 605542	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	142829	-38322 to 323980	No	ns	0.1885
Vehicle Control vs. AuNP	-14669	-195820 to 166482	No	ns	>0.9999

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
Day 0								
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80

Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	436068	436068	0	65920	3	3	0	80
Vehicle Control vs. AuNP	436068	436068	0	65920	3	3	0	80

Day 2

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	777966	665942	112024	65920	3	3	1.699	80	
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	777966	667625	110341	65920	3	3	1.674	80	
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	777966	688539	89427	65920	3	3	1.357	80	
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	777966	774841	3125	65920	3	3	0.04741	80	
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	777966	673635	104331	65920	3	3	1.583	80	
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	777966	694308	83658	65920	3	3	1.269	80	
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	777966	722194	55772	65920	3	3	0.846	80	
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	777966		803929	-25963	65920	3	3	0.3938	80
Vehicle Control vs. AuNP	777966		840470	-62504	65920	3	3	0.9482	80

Day 4

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	1365906	964660	401245	65920	3	3	6.087	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	1365906	1093277	272629	65920	3	3	4.136	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	1365906	1157226	208679	65920	3	3	3.166	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	1365906	1387544	-21638	65920	3	3	0.3282	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	1365906	1100970	264936	65920	3	3	4.019	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	1365906	1185354	180551	65920	3	3	2.739	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	1365906	1230551	135354	65920	3	3	2.053	80

Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	1365906	1401728	-35822	65920	3	3	0.5434	80
Vehicle Control vs. AuNP	1365906	1542135	-176229	65920	3	3	2.673	80

Day 6

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	2443201	1517991	925211	65920	3	3	14.04	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	2443201	1607188	836013	65920	3	3	12.68	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	2443201	1881520	561681	65920	3	3	8.521	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	2443201	2150575	292627	65920	3	3	4.439	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	2443201	1774047	669154	65920	3	3	10.15	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	2443201	1809630	633571	65920	3	3	9.611	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	2443201	2018811	424391	65920	3	3	6.438	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	2443201	2300372	142829	65920	3	3	2.167	80
Vehicle Control vs. AuNP	2443201	2457870	-14669	65920	3	3	0.2225	80

AsPC1

Within each row, compare columns
(simple effects within rows)

Number of families	4
Number of comparisons per family	9
Alpha	0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
-------------------------------------	------------	--------------------	------------------	---------	------------------

Day 0

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. AuNP	0	-159736 to 159736	No	ns	>0.9999

Day 2

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	29809	-129927 to 189545	No	ns	0.9987
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	79090	-80646 to 238826	No	ns	0.6786
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	-72360	-232096 to 87376	No	ns	0.762
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	-32934	-192670 to 126802	No	ns	0.9972
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	43992	-115744 to 203728	No	ns	0.9802
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	-9135	-168871 to 150601	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	-67792	-227528 to 91944	No	ns	0.8145
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	961.7	-158774 to 160698	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. AuNP	13702	-146034 to 173438	No	ns	>0.9999

Day 4

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	612594	452858 to 772330	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	509217	349481 to 668953	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	440697	280961 to 600433	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	272405	112669 to 432141	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	586870	427134 to 746606	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	440939	281203 to 600675	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	338040	178304 to 497776	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	159405	-330.9 to 319141	No	ns	0.0507
Vehicle Control vs. AuNP	61070	-98666 to 220806	No	ns	0.8815

Day 6

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	1501224	1341488 to 1660960	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	1195619	1035883 to 1355355	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	1076115	916379 to 1235851	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	759670	599934 to 919406	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	12393	1079645 to	Yes	****	<0.00
81	1399117				01
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	992917	833181 to 1152653	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	1065533	905797 to 1225269	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	642804	483068 to 802540	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. AuNP	274156	114420 to 433892	Yes	****	<0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
--------------	--------	--------	------------	-------------	----	----	---	----

Day 0

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	308665	308665	0	58128	3	3	0	80
Vehicle Control vs. AuNP	308665	308665	0	58128	3	3	0	80

Day 2

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	742628	712819	29809	58128	3	3	0.5128	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	742628	663538	79090	58128	3	3	1.361	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	742628	814987	-72360	58128	3	3	1.245	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	742628	775562	-32934	58128	3	3	0.5666	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	742628	698636	43992	58128	3	3	0.7568	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	742628	751763	-9135	58128	3	3	0.1572	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	74262	810420	-67792	58128	3	3	1.166	80
		8						

Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	742628	741666	961.7	58128	3 3	0.01654	80
Vehicle Control vs. AuNP	742628	728925	13702	58128	3 3	0.2357	80

Day 4

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	1779436	1166842	612594	58128	3 3	10.54	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	1779436	1270220	509217	58128	3 3	8.76	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	1779436	1338739	440697	58128	3 3	7.582	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	1779436	1507032	272405	58128	3 3	4.686	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	1779436	1192566	586870	58128	3 3	10.1	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	1779436	1338498	440939	58128	3 3	7.586	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	1779436	1441397	338040	58128	3 3	5.815	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	1779436	1620031	159405	58128	3 3	2.742	80
Vehicle Control vs. AuNP	1779436	1718367	61070	58128	3 3	1.051	80

Day 6

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	3456798	1955574	1501224	58128	3 3	25.83	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	3456798	2261179	1195619	58128	3 3	20.57	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	3456798	2380684	1076115	58128	3 3	18.51	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	3456798	2697128	759670	58128	3 3	13.07	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	3456798	2217417	1239381	58128	3 3	21.32	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	3456798	2463881	992917	58128	3 3	17.08	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	3456798	2391265	1065533	58128	3 3	18.33	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	3456798	2813994	642804	58128	3 3	11.06	80
Vehicle Control vs. AuNP	3456798	3182643	274156	58128	3 3	4.716	80

COLO357

Within each row, compare columns (simple effects within rows)

Number of families 4
Number of comparisons per family 9
Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
-------------------------------------	------------	--------------------	------------------	---------	------------------

Day 0

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. AuNP	0	-198318 to 198318	No	ns	>0.9999

Day 2

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	256030	57711 to 454348	Yes	**	0.0051
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	261318	63000 to 459637	Yes	**	0.004
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	262520	64202 to 460838	Yes	**	0.0038
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	29810	-168508 to 228129	No	ns	0.9998
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	248817	50499 to 447136	Yes	**	0.007
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	301464	103146 to 499783	Yes	***	0.0006
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM		250019	51701 to 448337	Yes	** 0.0066
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM		90152	-108166 to 288471	No	ns 0.759
Vehicle Control vs. AuNP		51447	-146871 to 249765	No	ns 0.9865

Day 4

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	949576	751257 to 1147894	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	944768	746449 to 1143086	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	938757	740438 to 1137075	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	30594	-167724 to 228912	No	ns	0.9997
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	900766	702448 to 1099085	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	842338	644020 to 1040657	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	875280	676961 to 1073598	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	-25010	-223328 to 173309	No	ns	>0.9999
Vehicle Control vs. AuNP	53420	-144898 to 251738	No	ns	0.9828

Day 6

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	1637699	1439380 to 1836017	Yes	****	<0.0001
---------------------------------------	---------	--------------------	-----	------	---------

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	1360851	1162533 to 1559170	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	736905	538587 to 935223	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	260382	62064 to 458701	Yes	**	0.0042
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	1217323	1019005 to 1415642	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	1020209	821891 to 1218528	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	642656	444338 to 840975	Yes	****	<0.0001
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	231852	33534 to 430170	Yes	*	0.0141
Vehicle Control vs. AuNP	241952	43634 to 440270	Yes	**	0.0093

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
Day 0								
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Vehicle Control vs. AuNP	247128	247128	0	72168	3	3	0	80
Day 2								
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	1082315	826286	256030	72168	3	3	3.548	80

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	1082315 820997	261318	72168	3	3	3.621	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	1082315 819795	262520	72168	3	3	3.638	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	1082315 1052505	29810	72168	3	3	0.4131	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	1082315 833498	248817	72168	3	3	3.448	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	1082315 780851	301464	72168	3	3	4.177	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	1082315 832296	250019	72168	3	3	3.464	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	1082315 992163	90152	72168	3	3	1.249	80
Vehicle Control vs. AuNP	1082315 1030868	51447	72168	3	3	0.7129	80

Day 4

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	3040380 2090804	949576	72168	3	3	13.16	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	3040380 2095612	944768	72168	3	3	13.09	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	3040380 2101623	938757	72168	3	3	13.01	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	3040380 3009786	30594	72168	3	3	0.4239	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	3040380 2139614	900766	72168	3	3	12.48	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	3040380 2198042	842338	72168	3	3	11.67	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	3040380 2165100	875280	72168	3	3	12.13	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	3040380 3065390	-25010	72168	3	3	0.3465	80
Vehicle Control vs. AuNP	3040380 2986960	53420	72168	3	3	0.7402	80

Day 6

Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 1000 nM	4189855 2552157	1637699	72168	3	3	22.69	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 500 nM	4189855 2829004	1360851	72168	3	3	18.86	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 100 nM	4189855 3452950	736905	72168	3	3	10.21	80
Vehicle Control vs. Dasa+AuNP 10 nM	4189855 3929473	260382	72168	3	3	3.608	80

Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 1000 nM	4189855	2972532	1217323	72168	3	3	16.87	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 500 nM	4189855	3169646	1020209	72168	3	3	14.14	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 100 nM	4189855	3547199	642656	72168	3	3	8.905	80
Vehicle Control vs. Dasa+EtOH 10 nM	4189855	3958003	231852	72168	3	3	3.213	80
Vehicle Control vs. AuNP	4189855	3947903	241952	72168	3	3	3.353	80

3.2. Solvent-dependent stabilization of gold nanoparticles: A comparative study on polymers and the influence of their molecular weight in water and ethanol

Marilyn Kaul, Rolf Lennart Vanselow, Ahmed Y. Sanin, Ulf D. Kahlert, Christoph Janiak

Chemistry **2025**, 7, 159. DOI: 10.3390/chemistry7050159.

Kurzfassung:

Goldnanopartikel (AuNP) finden in den Lebenswissenschaften zunehmend Beachtung, insbesondere aufgrund ihrer vielseitigen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wobei ihre kolloidale Stabilität in Wasser und organischen Lösungsmitteln von entscheidender Bedeutung ist. In dieser Studie wurde ein systematischer Vergleich verschiedener Polymere, Synthesemethoden und Lösungsmittel durchgeführt. Die AuNP wurden unter Verwendung der Ligandenaustauschreaktion bzw. der postsynthetischen Additionsreaktion (PAR) und der Eintopfsynthese mit den Polymeren Poly(vinylalkohol) (PVA), Poly(ethylenglykol) (PEG), Poly(vinylpyrrolidon) (PVP) und Poly(acrylsäure) (PAA) mit jeweils unterschiedlichen molaren Gewichtsmitteln synthetisiert. Die Analyse der AuNP@Polymer-Konjugate mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ergab im Wesentlichen unveränderte Goldnanopartikel-Kerngrößen von 11–18 bzw. 11–19 nm in Wasser und Ethanol. Der hydrodynamische Durchmesser aus der dynamischen Lichtstreuung (DLS) liegt weitgehend im Bereich von 20 bis 70 nm, und die Ultraviolett-sichtbare (UV-Vis) Spektroskopie zeigte für die meisten Proben bei beiden Synthesemethoden und Lösungsmitteln ein Maximum der Goldplasmonresonanzbandbreite zwischen 517 und 531 nm. Das Polymer PVA zeigte bei beiden Synthesemethoden die beste kolloidale Stabilität, sowohl in Wasser als auch nach dem Transfer in Ethanol. Eine erhöhte Instabilität in Ethanol konnte nur bei den PEG-beschichteten Proben festgestellt werden. Bei den Polymeren PVP und PAA hing die Stabilität stärker von der Kombination aus Synthesemethode, Polymermolekulargewicht und Lösungsmittel ab.

Anteil an der Publikation:

- Ideenfindung, Literaturrecherche und Herstellung von AuNP unter Verwendung unterschiedlicher Polymere und Synthesemethoden mit anschließender Charakterisierung, durchgeführt mit der Unterstützung von Herrn Rolf Lennart Vanselow im Rahmen seiner Bachelorarbeit.

- Stabilitätstest und Charakterisierung der AuNP@Polymer nach 3 Tagen in Ethanol mit Hilfe von DLS, UV-Vis und TEM.
- Beladung der AuNP@Polymer mit DASA, sowie dessen Charakterisierung.
- Optimierung und Berechnung der Beladung von DASA auf der AuNP@Polymer Oberfläche.
- In-vitro Versuche der AuNP@PVA31k-DASA Probe in vier verschiedenen GBM-Zelllinien (GBM1, BTSC233, NCH421K und JHH520) durch Ahmed Sanin.
- Auswertung der Daten, Erstellung von Tabellen, Graphen und Figuren und Zusammenstellung einer wissenschaftlichen Publikation.
- Überarbeitung der Publikation mit den Co-Autoren, sowie Herrn Prof. Dr. Christoph Janiak.
- Einreichung der Publikation im Verlag MDPI im Journal „*Chemistry*“ durch Herrn Prof. Dr. Christoph Janiak.

Article

Solvent-Dependent Stabilization of Gold Nanoparticles: A Comparative Study on Polymers and the Influence of Their Molecular Weight in Water and Ethanol

Marilyn Kaul ¹, Rolf Lennart Vanselow ¹, Ahmed Y. Sanin ² , Ulf D. Kahlert ^{2,3}  and Christoph Janiak ^{1,*} 

- ¹ Institute for Inorganic and Structural Chemistry, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40204 Düsseldorf, Germany; marilyn.kaul@uni-duesseldorf.de (M.K.); rvanselow@web.de (R.L.V.)
² Molecular and Experimental Surgery, University Clinic for General-, Visceral-, Vascular- and Transplant Surgery, Faculty of Medicine, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany; ahmed.sanin@med.ovgu.de (A.Y.S.); ulf.kahlert@med.ovgu.de (U.D.K.)
³ Research Campus Stimulate, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany
 * Correspondence: janiak@uni-duesseldorf.de; Tel.: +49-211-81-12286

Abstract

Gold nanoparticles (AuNPs) are attracting more and more attention in life sciences, especially due to their versatile physicochemical properties whereby their colloidal stability in water and organic solvents is crucial. In this study, a systematic comparison of different polymers, synthesis methods and solvents was carried out. The AuNPs were synthesized using the ligand exchange reaction/postsynthetic addition reaction (PAR) and the one-pot synthesis with the polymers poly(vinyl alcohol) (PVA), poly(ethylene glycol) (PEG), poly(vinylpyrrolidone) (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA), each with different molar weight averages. Analysis of the AuNP@Polymer conjugates by transmission electron microscopy (TEM) finds essentially unchanged gold nanoparticle core sizes of 11–18 or 11–19 nm in water and ethanol, respectively. The hydrodynamic diameter from dynamic light scattering (DLS) lies largely in the range from 20 to 70 nm and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) showed gold plasmon resonance band maxima between 517 and 531 nm over both synthesis methods and solvents for most samples. The polymer PVA showed the best colloidal stability in both synthesis methods, both in water and after transfer to ethanol. An increased instability in ethanol could only be noted for the PEG coated samples. For the polymers PVP and PAA, the stability depended more specifically on the combination of synthesis method, polymer molecular weight and solvent.

Keywords: gold nanoparticles; nanoparticle synthesis; polymer coating; stability; solvent



Academic Editor: Huan Pang

Received: 11 August 2025

Revised: 16 September 2025

Accepted: 25 September 2025

Published: 1 October 2025

Citation: Kaul, M.; Vanselow, R.L.; Sanin, A.Y.; Kahlert, U.D.; Janiak, C. Solvent-Dependent Stabilization of Gold Nanoparticles: A Comparative Study on Polymers and the Influence of Their Molecular Weight in Water and Ethanol. *Chemistry* **2025**, *7*, 159. <https://doi.org/10.3390/chemistry7050159>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) are becoming increasingly popular due to their unique physical, chemical and optical properties and are being used more and more frequently in medicine, sensors, electronics or catalysis [1–3]. The synthesis of AuNPs is simple; they are biocompatible, air and water stable, the size and shape are easy to vary, they can be formulated with high solubility in water and they can be loaded with drugs or antibodies [4–7]. Due to their easy modification, AuNPs represent a versatile platform for a wide range of applications [8–10]. The targeted control of size, shape, monodispersity and surface functionalization of AuNPs plays a central role in their successful use in nanomedicine [11].

However, a key challenge and an important prerequisite for the application of AuNPs is to ensure that they are monodisperse and highly stable, especially when environmental

parameters like the solvent are changed. Therefore, polymers such as poly(vinyl alcohol) (PVA), poly(ethylene glycol) (PEG), poly(vinylpyrrolidone) (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA) are applied as effective steric and electrostatic stabilizers [11] (Figure 1). The use of these polymers represents a promising approach for AuNP stabilization, as they form a protective shell around the AuNPs, minimizing particle-to-particle interactions and biofouling and increasing resistance to solvent changes [12–14]. The molecular weight of the polymers also plays a decisive role, as it significantly influences the density, thickness, and stability of the polymer shell and thus directly determines the stability of the AuNPs [15,16].

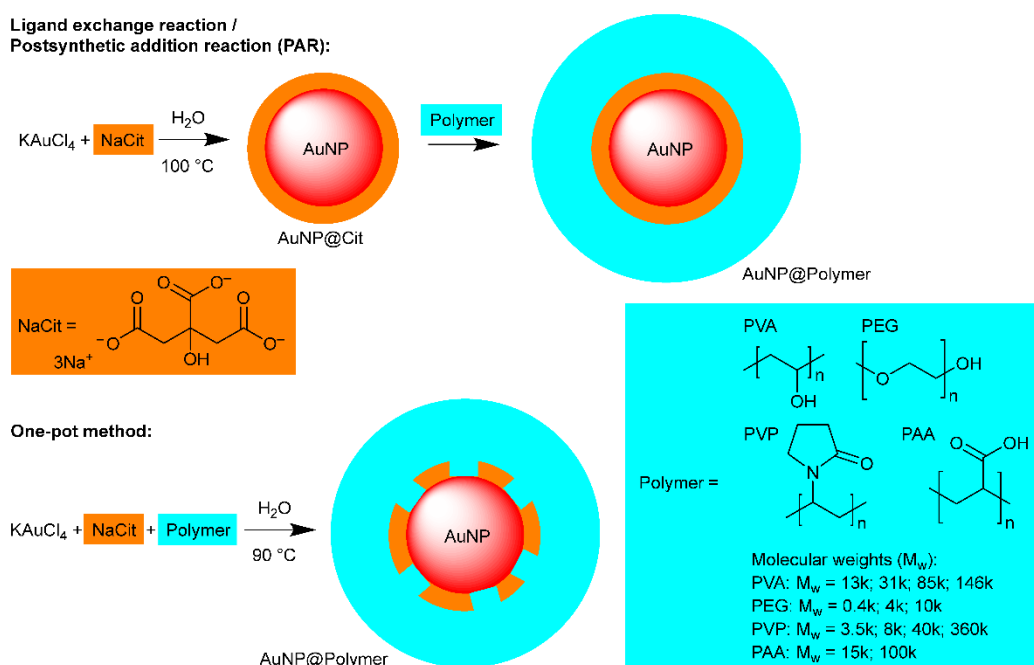


Figure 1. Schematic illustration of the AuNP synthesis methods and the polymers used for the AuNP@Polymer conjugates.

PEG is one of the most commonly used biopolymers for the steric stabilization of AuNPs in nanomedicine, which is also termed PEGylation [17,18]. PEG is thought to form a protective barrier around the nanoparticles to prevent their agglomeration, increase the biocompatibility of the AuNPs, prolong their circulation time in the blood, and to prevent them from being marked by the immune system and rapidly degraded [19–22]. According to reports, high-molecular-weight PEG (5000 Da)-coated AuNPs are more stable than low-molecular-weight PEG (2000 Da)-coated AuNPs in water [17]. A study has shown that AuNPs tend to agglomerate easily in the presence of low-molecular-weight PEG, whereas they remain stable with high-molecular-weight PEG even under extreme conditions, such as in organic solvent [23].

For certain biomedical applications, it is necessary for AuNPs to remain well-dispersed and stable in both water and organic solvents, such as ethanol [24]. A loss of stability and the subsequent associated aggregation usually lead to a loss of function of the AuNPs [25]. For example, some active pharmaceutical ingredients are only soluble in organic solvents and for their loading onto the AuNPs, the latter must be stable in the organic medium [26,27]. The active ingredient can be embedded in the polymer shell through supramolecular interactions with the polymers, which is advantageous as the chemical structure of the active ingredient remains unchanged, thus avoiding unexpected or unwanted reactions [11,28].

Various synthesis methods are often used to produce stabilized AuNPs [29,30], in particular, the ligand exchange reaction (termed here postsynthetic addition reaction, PAR) [31–33] and the one-pot method [34–36] (Figure 1). To our knowledge, however, the two approaches have not yet been systematically compared, especially with regard to the influence of the synthesis methods on the stability of the AuNPs using different polymers. A knowledge and comparison of different polymer-based stabilization and optimized synthesis methods are crucial to prepare stable AuNPs and to avoid unwanted agglomeration with loss of functionality [24,37]. As mentioned above, there are studies that have investigated the influence of the molecular weight of individual polymers on the stability of AuNPs [3,15,38], but there is no systematic comparison of different polymers with varying molecular weights. This was therefore the subject of our investigation.

For this purpose, different biocompatible polymers with varying molar weight averages and functional groups were applied to preformed Au-citrate nanoparticles. A thorough biological validation is outside the scope of this study.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Potassium tetrachloridoaurate(III) (KAuCl_4), PVA $M_w \sim 13,000$ g/mol, 31,000 g/mol, 85,000 g/mol, 146,000 g/mol, PEG $M_w \sim 400$ g/mol, PVP $M_w \sim 3500$ g/mol, 360,000, PAA $M_w \sim 15,000$ g/mol and 100,000 were ordered from Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany. PEG $M_w \sim 10,000$ g/mol and PVP $M_w \sim 8000$ g/mol were from Across Organics, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany. PEG $M_w \sim 4000$ g/mol was purchased from JK Chemicals, Vapi, India and PVP $M_w \sim 40,000$ g/mol was supplied from TCI, Eschborn, Germany. Sodium citrate dihydrate (NaCit) was from J.T. Baker Chemicals, Schwerte, Germany. Dasatinib (DASA) was obtained from BLD Pharmatech GmbH, Kaiserslautern, Germany. Ethanol with p.a. purity was obtained from Merck, Darmstadt, Germany.

Serum-free Dulbecco's modified Eagle medium and 30% F12 medium (DMEM/F12, Cat. Nr. 12634-028), B27 (Cat. Nr. 17504-044), GlutaMAXTM Supplement (Cat. Nr. 35050061), penicillin–streptomycin (Pen/Strep, Cat. 15140122) were purchased from GibcoTM, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany. Human fibroblast growth factor-basic (FGF-2/bFGF, Cat. Nr. 100/18B), human epidermal growth factor (EGF, Cat. Nr. AF-100-15) were purchased from PeproTech[®], GibcoTM, ThermoFisher Scientific, Schwerte, Germany. Heparin (Cat. Nr. 194110) was procured from MP Biomed, Solon, OH, USA. The CellTiter-Glo 2.0 (Cat. G9242) cell viability glo kit was obtained from Promega, Madison, WI, USA.

All materials were commercially available and were used without further purification. Ultrapure water obtained from an Arium Mini[®] system from Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Germany) was used for the AuNPs synthesis.

2.2. Characterization Methods

Centrifuge: The samples were centrifuge using the Sigma 3-30KHS from Sigma Laborzentrifugen GmbH (Sigma, Osterode am Harz, Germany). All centrifugation steps were performed at the specified parameters of the relative centrifugal force of $10,464 \times g$, a time of 20 min, at a temperature of 4°C , where g corresponds to the Earth's gravitational force. The relative centrifugal force (rcf) indicates the force acting on the sample as a multiple of the force of gravity.

Transmission electron microscopy (TEM): TEM images were recorded with a JEOL JEM-2100Plus electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 200 kV with a Matataki Flash camera. The size of the AuNPs were measured with a GatanDigital Micrograph software (version 3.61) and over 200 particles were counted for the size distribution. Each AuNP solution was diluted by adding 20 μL of the AuNP sample to

either 80 μL of water, for the water samples, or 80 μL of ethanol, for the ethanol samples. 10 μL of the diluted dispersion was dropped onto a 200 μm carbon-coated copper grid from Electron Microscopy Sciences (Munich, Germany). The grid with the solution was dried at ambient conditions ($\sim 20^\circ\text{C}$, $\sim 50\%$ relative humidity) and stored at ambient conditions in closed vials under air until the measurement.

Dynamic light scattering (DLS): Hydrodynamic diameters and the polydispersity index (PDI) were recorded with a Malvern Nano S Zetasizer (Malvern Panalytical, GmbH, Kassel, Germany) with a HeNe laser at a wavelength of 633 nm.

Ultraviolet-visible (UV-Vis): UV-Vis spectra were determined on a P9 double beam spectrophotometer (Radnor, PA, USA).

High-performance liquid chromatography (HPLC): The DASA concentration before and after loading was determined on a Shimadzu LC 20AT instrument (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) with an SPD-M20A UV-Vis detector and a Luna C18(2) (250 $\times$ 4.60 mm, 5 micron) column from Phenomenex[®] (Aschaffenburg, Germany). The samples were filtered through a 0.2 μm Millex filter from Millipore[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and all solvents used were degassed with the ultrasonic bath (Bandelin Sonorex, Berlin, Germany) before use. The mobile phase consisted of methanol–water (82:18, *v/v*) and had a flow-rate of 1 mL min^{-1} at room temperature. The detector wavelength was set to 322 nm and the injection volume was 20 μL .

2.3. Synthesis of Polymer-Stabilized Gold Nanoparticles (AuNP@Polymer) in Water

2.3.1. Postsynthetic Addition Reaction

In a 500 mL Erlenmeyer flask with a glass stopper, a total of 20 mg (52.9 μmol) of KAuCl_4 was dispersed in 200 mL ultrapure water and heated to 100°C . 90 mg (350 μmol) of NaCit was then added and the solution was heated to 100°C for a further 15 min. During this time, the solution changed color from light yellow to dark red. Finally, the solution was cooled to room temperature, 4.3 μmol of polymer was added and stirring continued for 12 h. The DLS and UV-Vis measurements were taken directly after the 12 h. The DLS measurements were taken without dilution, and for the UV-Vis measurements, the solution was diluted with water in a ratio of 50:50. The remaining AuNP solutions were stored in the refrigerator at 4°C in the reaction flask.

2.3.2. One-Pot Synthesis

In a 500 mL round bottom flask, the amount of 20 mg (52.9 μmol) of KAuCl_4 and 4.3 μmol of polymer were dissolved in 200 mL of ultrapure water and the solution was heated to 90°C under stirring. At 90°C , 90 mg (350 μmol) of NaCit was added and the solution continued to be stirred for 30 min. The color changed from light yellow to dark red. The DLS and UV-Vis measurements were taken directly after cooling to room temperature and were measured as described in Section 2.3.1 above. The remaining AuNP solutions were stored in the refrigerator at 4°C in the reaction flask.

2.4. Transfer of AuNP@Polymer from Water to Ethanol

From the aqueous dispersion, 5 mL were centrifuged, the supernatant water was separated by decantation and discarded, and the AuNP@Polymer precipitate was resuspended in 5 mL of ethanol. The DLS and UV-Vis measurements were performed immediately afterwards. The solutions were measured in the DLS without dilution and the UV-Vis in a dilution of 50:50 (water:ethanol). The TEM grid and AuNP solutions storage were carried out as described above in Section 2.3.1.

2.5. Loading of DASA on the AuNP@Polymer Conjugates

The AuNP@ conjugate samples were transferred from water to ethanol as described in Section 2.4. The 5 mL water or ethanol dispersion contains a gold mass $m_{Au} = 0.26$ mg. From an ethanolic DASA stock solution (stored in refrigerator at 4 °C) with a concentration of 1 g/L, the volume of 0.8 mL (containing 0.8 mg DASA) was added to the 5 mL of the ethanolic AuNP@Polymer dispersion during stirring. The combined 5.8 mL of dispersion was stirred for further 72 h at ambient temperature. After 72 h the samples were centrifuged, and the supernatants were stored in the refrigerator at 4 °C until the HPLC measurement to determine the remaining DASA concentration in order to obtain the adsorbed amount on the AuNP@Polymer conjugate from the difference.

2.6. Cell Culture

Four patient-derived glioblastoma stem cell (GSC) models were utilized in this study: GBM1, BTSC233, NCH421K and JHH520. GBM1, BTSC233, NCH421K and JHH520 cell models were provided by A. Vescovi, Stemgen S.p.A, Milan, Italy, C. Herold-Mende from the Department of Neurosurgery, Medical Center Heidelberg, Germany, Gregory J. Riggs, Baltimore, USA and M.S. Carro, Freiburg, Germany. Among these models, GBM1 represents the classical subtype, while BTSC233, NCH421K and JHH520 correspond to the mesenchymal subtype. Cells were maintained under serum-free conditions in a defined medium consisting of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 30% F12, 2% B27, 20 ng/mL fibroblast growth factor (FGF), 20 ng mL⁻¹ epidermal growth factor (EGF), 5 µg mL⁻¹ heparin, 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin. To ensure cell line integrity and culture quality, short tandem repeat (STR) profiling was performed (Table S6) and mycoplasma contamination was excluded by PCR analysis following established protocols [27].

2.7. Growth Inhibition and Cell Viability Assay

Cell seeding, viability assessment following drug exposure and statistical analyses of drug efficacy were performed according to the previously described method [27].

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Characterization of the AuNP Samples in Water

In this work, the ligand exchange reaction and the one-pot synthesis for the preparation of spherical AuNPs were investigated. In the two-step ligand exchange reaction, the AuNPs are first synthesized with citrate (from sodium citrate) which has the dual role of a reductant of the Au(III) precursor as well as a stabilizing agent. Then, in a second separate step another ligand or stabilizer is added to form the desired coating. Using this method, targeted surface modifications can be obtained and ligands can be used in the method that would not be suitable under the AuNP synthesis reaction conditions. However, it is unclear if the citrate anion coating on the gold surface is indeed replaced by neutral polymer chains or rather, if the polymer wraps around the citrate-stabilized AuNP particles (AuNP@Cit). In the classic Turkevich method, citrate acts as both a stabilizer and a reducing agent. It binds to the AuNP surface via its carboxylate groups. Through electrostatic interactions, citrate prevents the agglomeration of AuNPs. A polymer can interact with the AuNP surface in two different ways. If the polymer has functional groups with a strong affinity for gold, e.g., thiol groups in HS-PEG, the citrate molecules can be displaced from the AuNP surface [39–41]. If the polymer does not have a strong gold binding group, e.g., PEG, it attaches itself to the AuNP surface primarily via supramolecular interactions without forming a covalent bond. In this case, some of the citrate molecules remain on the AuNP surface, while the polymer forms an additional protective layer around the particles. In

most cases, however, a mixture of both types occurs, and it is for this reason that we will refer to a ‘postsynthetic addition reaction’ (PAR) instead of a ‘ligand-exchange reaction’ (Figure 1) [42,43]. In the single-step one-pot synthesis, the polymer is already present in the reaction mixture where the AuNPs are formed. Hence, the polymer coating can take place during the nucleation and growth steps in competition with citrate. This seems advantageous but can lead to competition between stabilization and growth, resulting in a larger variation in particle size [42,44–48].

In this work here we have started with citrate-stabilized AuNPs instead of ‘uncoated’ (or bare) AuNPs which are rarely produced in practice because they tend to agglomerate quickly. Furthermore, the production of such uncoated AuNPs requires a reduction in the gold precursor with NaBH_4 , SnCl_2 or imidazolium ionic liquids instead of citrate which adds other reagents and renders a comparison to the citrate-polymer route difficult [49,50]. We note also that in the literature, ‘uncoated’ AuNPs are often used as a synonym for citrate-stabilized AuNPs [51,52].

The PAR consisted of first producing AuNP@Cit with the established Turkevich et al. method [53]. For this, KAuCl_4 was used as a gold precursor and sodium citrate as a reducing and stabilizing agent. Subsequently, the polymer was added to produce polymer-coated AuNPs. In the one-pot synthesis, the gold precursor (KAuCl_4), the reducing agent (NaCit) and the polymer were added to the reaction vessel.

The four following polymers with different molar weight averages were used here to compare the stability of the AuNPs: PVA with the molar masses (M_w) of 13,000; 31,000; 85,000 and 146,000 g/mol, PEG in the molar masses of 400; 4000 and 10,000 g/mol, PVP in the molar masses of 3500; 8000; 40,000 and 360,000 g/mol and PAA in the molar masses of 15,000 and 100,000 g/mol. The polymers with their molar masses are in the following designated from PVA13k, PVA146k, over PEG0.4k, PEG10k, PVP3.5k, PVP360k to PAA15k and PAA100k. The molar ratio of KAuCl_4 to polymer was always 12:1. This corresponded to a mass of 0.011 g of gold which was combined with polymer masses from 0.002 to 1.549 g, depending on the molecular weight of the polymer. These ratios were chosen based on a previous study in which they proved to be advantageous [27]. The masses of the polymers used are given in Table S2.

For characterization of the AuNP@Polymer conjugates, TEM provides a direct image of the gold cores of the conjugates with morphology, size, size distribution, dispersion or possible agglomeration, but does not visualize the size with the polymer. The TEM images of the AuNP@Polymer conjugates in water are shown in Figure 2 (PAR) and Figure 3 (one-pot), and Figure 4 provides a summarizing overview of the AuNP size. The corresponding size values are summarized in Table S1. The TEM images and the histograms in Figures 2 and 3 reveal with the PAR method spherical and monodisperse AuNP cores with an average size between 11 and 18 nm and a size-dispersion (σ) of mostly ± 1 –2 nm (Table S1). In contrast, the one-pot method frequently produces anisotropic or elongated particles, particularly with the polymers PVP and PAA15k, where non-spherical and less stable AuNPs dominate. An exception is PAA100k, which yields unusually small spherical particles.

The comparison in Figure 4 illustrates that the one-pot synthesis gives largely a smaller average size of AuNPs than PAR. This may show a stabilizing effect of the polymer when present during the nucleation of the AuNP leading to a slower growth rate resulting in the formation of many small nuclei rather than a few large particles [54].

With the one-pot route and the polymers PVA, PVP and PAA, one can note that there are also smaller AuNPs formed with the longest polymer chains (highest molar mass). Polymers with a longer chain length increase the viscosity, which reduces the diffusion of

the gold ions in the dispersion, and this also slows down the growth rate which leads to smaller particles.

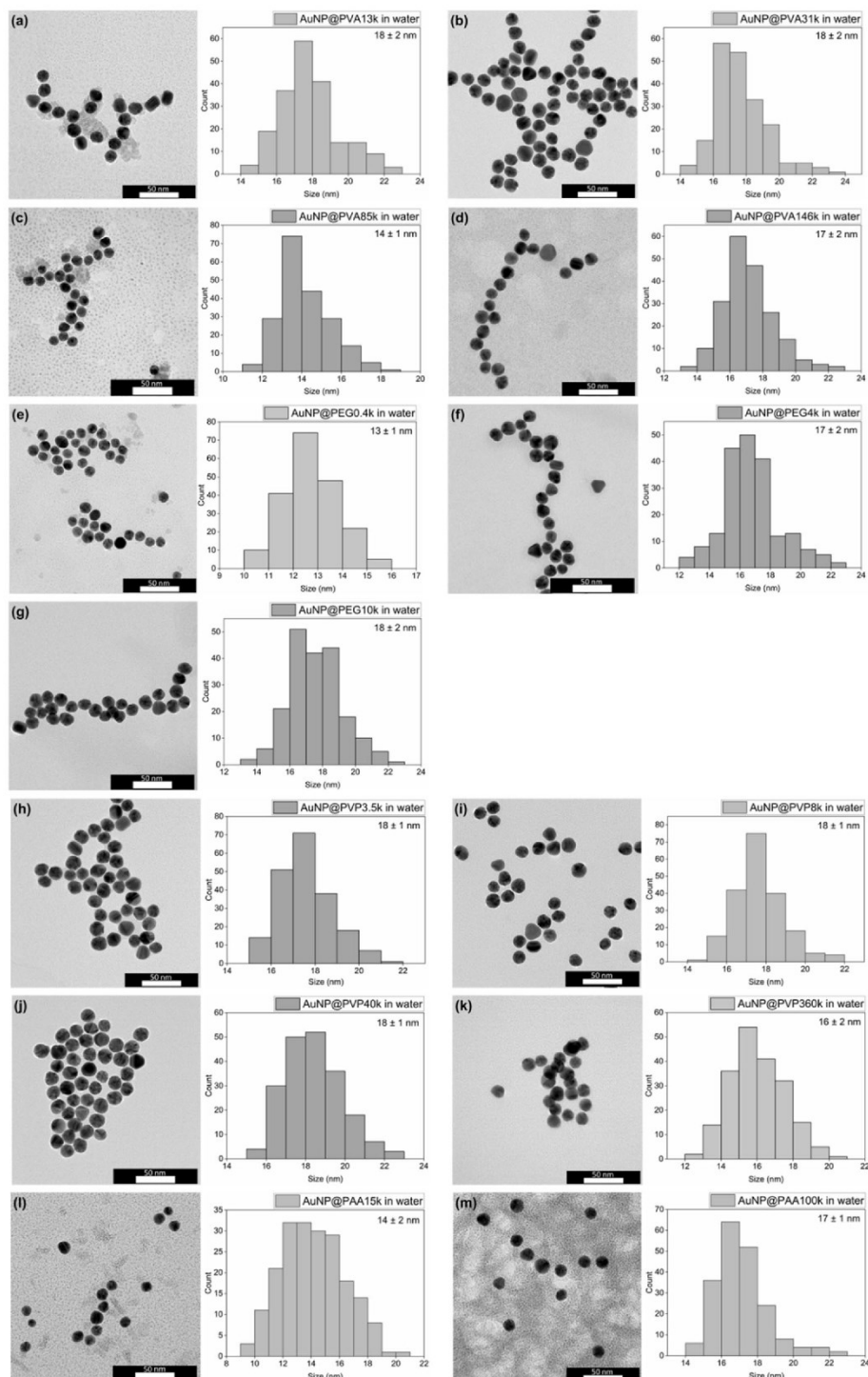


Figure 2. TEM images and histograms (with the average size and its standard deviation given) of the PAR synthesis in water of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k, (d) AuNP@PVA146k, (e) AuNP@PEG0.4k, (f) AuNP@PEG4k, (g) AuNP@PEG10k, (h) AuNP@PVP3.5k, (i) AuNP@PVP8k, (j) AuNP@PVP40k, (k) AuNP@PVP360k, (l) AuNP@PAA15k and (m) AuNP@PAA100k. For the histograms, 200 particles were analyzed using larger areas of the TEM images. For the average size and standard deviation, see Table S1.

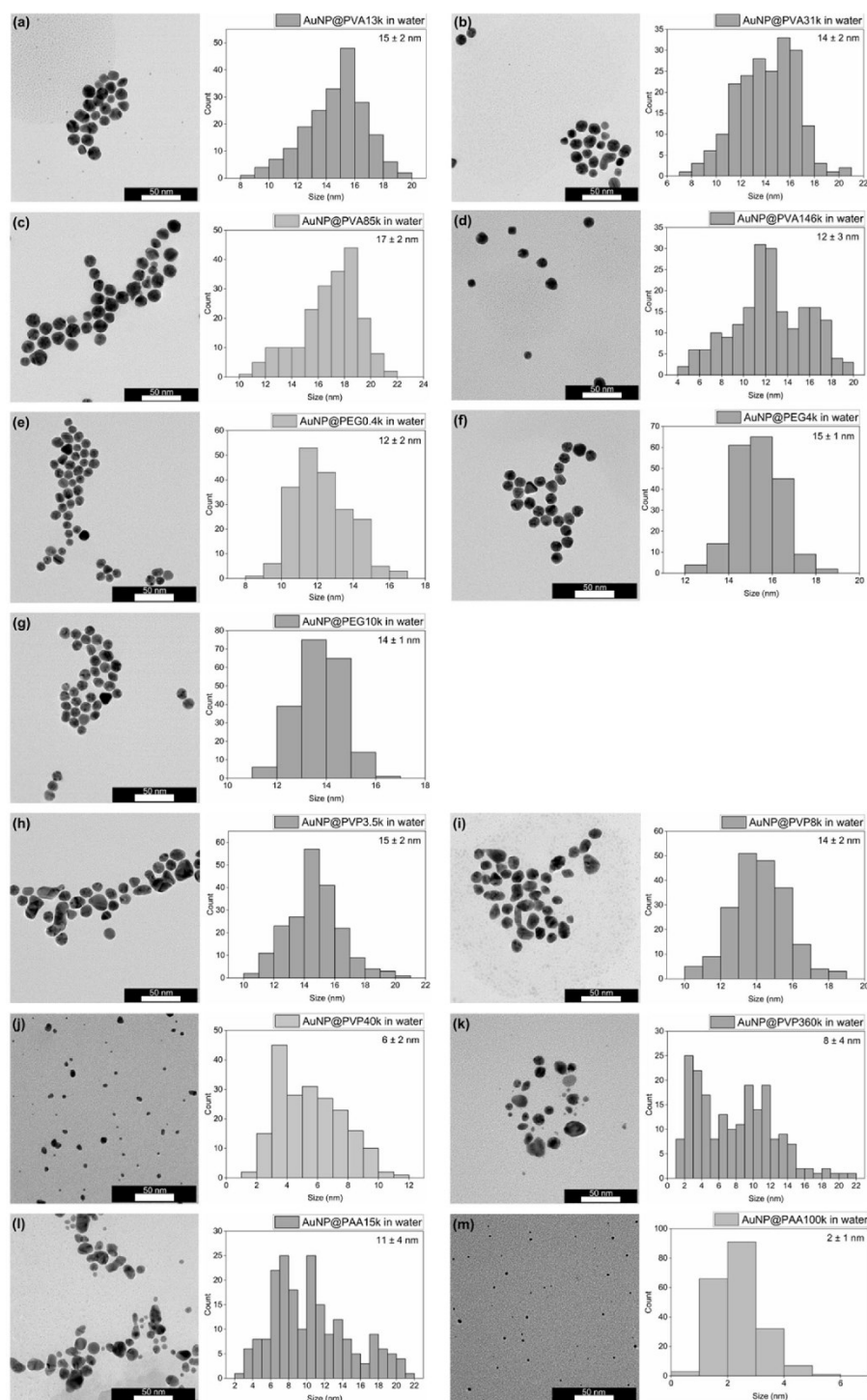


Figure 3. Representative TEM images and histograms (with the average size and its standard deviation given) of the one-pot synthesis in water of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k, (d) AuNP@PVA146k, (e) AuNP@PEG0.4k, (f) AuNP@PEG4000, (g) AuNP@PEG10k, (h) AuNP@PVP3.5k, (i) AuNP@PVP8k, (j) AuNP@PVP40k, (k) AuNP@PVP360k, (l) AuNP@PAA15k and (m) AuNP@PAA100k. For the histograms, 200 particles were analyzed using larger areas of the TEM images. For the average size and standard deviation, see Table S1.

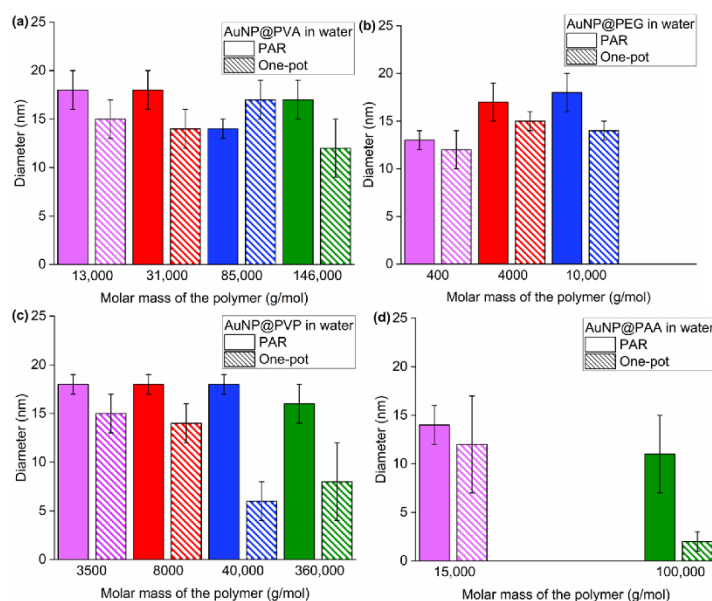


Figure 4. Overview of the TEM-derived AuNP core size and their standard deviation of the conjugates in water: (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA in water (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot) (see also Table S1). The same color for different polymers simply indicates an increasing molecular weight; purple represents the polymer with the lowest molecular weight and green represents those with a molecular weight above 100,000 g/mol.

The gold core size dispersion for the two synthesis methods is also similar for PVA and PEG. Yet, with the polymers PVP and PAA, the size dispersion increases for the one-pot compared to the PAR synthesis. Interestingly, with PVP and PAA the one-pot synthesis also produced non-spherical AuNPs which are considered disadvantageous as non-spherical particles are usually less stable. Furthermore, spherical gold nanoparticles should be aimed for as non-spherical particles are more prone to agglomeration due to their curvature [12]. It is evident that the polymer functional groups, the chain length and mode of addition play a crucial role in determining the AuNP size, size dispersion and morphology.

For the synthesis of spherical AuNPs in water, the PAR method could successfully be used with all polymers and chain lengths. The one-pot method, on the other hand, only leads to the formation of spherical particles independent of chain lengths for the polymers PVA and PEG but not with PVP and PAA.

Direct and rapid size control of the dispersions is essential, and TEM measurements are time-consuming and require expensive instrumentation. Consequently, the samples were analyzed using DLS. The DLS gives the hydrodynamic diameter (D_h) and the polydispersity of the AuNPs, taking into account the polymer coating and the solvate shell due to the solvent, both of which cannot be determined by TEM. Due to the polymer and solvent shell, the DLS data generally show larger size values than the TEM data (see Figure 5 and Tables S1 and S3) [55,56]. From DLS, the heterogeneity of the sample is given by the PDI which is a dimensionless parameter for the width of the particle size distribution in a sample. It is derived from the analysis of the autocorrelation function in the DLS and provides information on the heterogeneity of the particle sizes. A PDI value below 0.05 is typically an indicator of a monomodal dispersion. Values between 0.10 and 0.25 are characteristic of a narrow distribution, while values above 0.50 indicate a significantly broader distribution. At values above 0.70, the system has a very broad size distribution, which is rather unsuitable for DLS measurements [57–59]. The hydrodynamic diameters from DLS of the polymer-stabilized AuNPs in the water are given in Table S1 (together with the TEM diameters and the UV-Vis bands) and the DLS diagrams are shown in Figures S2–S17.

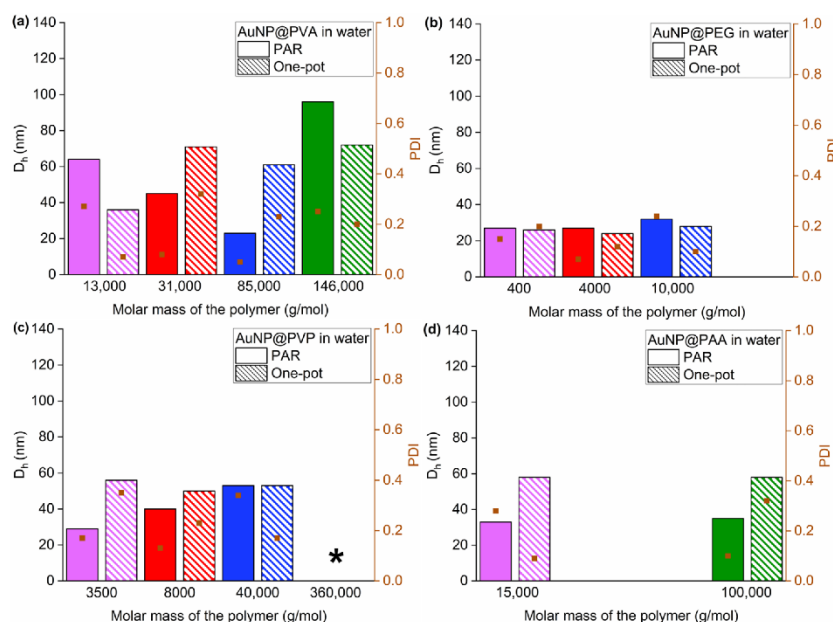


Figure 5. Graphical overview of all the DLS results in water of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot). The brown squares represent the PDI. * The AuNP@PVP360k sample shows unexpectedly large hydrodynamic diameters for both the PAR method (177 nm) and the one-pot method (298 nm), which are off-scale (see also Table S1). The same color for different polymers simply indicates an increasing molecular weight; purple represents the polymer with the lowest molecular weight and green represents those with a molecular weight above 100,000 g/mol.

Figure 5 provides a summarized overview of the DLS results and shows that D_h lies largely in the range of 20–70 nm for most samples, with the expected increase from the gold core size of 11–18 nm due to the polymer (and citrate) shell (Table S1). The one-pot method leads to a similar or higher D_h compared to the PAR method. However, for the polymer PVA, the D_h for the one-pot method also decreases for AuNP@PVA13k and AuNP@PVA146k compared to PAR. The D_h values are generally very similar for the AuNP@PEG samples and the samples with PVP8k and PVP40k. The PEG-based AuNPs show a relative constant D_h , independent of the polymer molar mass. A higher D_h by the one-pot method is then found for the AuNP conjugates with PVA31k and -85k, PVP3.5k and -360k and both PAA samples. The increase in D_h seen for the PVP- and PAA-based AuNPs from the one-pot synthesis could be caused by the non-spherical morphology of the AuNP cores which was visible in the TEM images.

Non-spherical NPs can distort the results of the DLS measurements due to rotational movements and directional scattering, as the method is based on a spherical particle model. Anisotropic particles with different dimensions cannot be differentiated from each other in the DLS, as only an average hydrodynamic diameter is determined, which can deviate significantly from the actual particle dimensions. Although anisotropic particles may stand out in DLS due to a broad or multimodal size distribution, DLS does not provide accurate information about the particle shape [60]. It is again evident that the polymer functional groups, the chain length and mode of addition play a role in determining the AuNP@conjugate size with its hydrodynamic diameter. The effect of increasing or decreasing D_h does not only go in one direction when comparing the two synthesis methods of addition but also can reverse for a given polymer with its chain length. The interfacial interaction between the growing AuNPs, the citrate and polymer shell plays a decisive role, resulting in different and competing surface coverage during the AuNP formation and

growth. The general similarity of the hydrodynamic diameter of the PEG-based conjugates irrespective of polymer chain length which varies from 0.4k to 10k (in g/mol) may indicate little interaction of the PEG polymer with the AuNP@Cit surface. The more so as D_h for AuNP@Cit is 25 nm, close to the D_h values of 27, 27 and 32 nm for the three different AuNP@PEG conjugates (Table S1). This assumption of unperturbed AuNP@Cit particles in the presence of PEG is supported from their analysis in ethanol (see below).

While PEG is a very common polymer which is used for AuNPs in biosciences, it is not a polymer with high binding affinity to gold. However, cationic polymers or polymers with functional thiol, amine, or carboxyl groups have a higher binding affinity to gold [10]. The binding strength of coordinating groups to gold follows the order of $S > P > N > O$, meaning that amines and carboxylic acids form weaker bonds to gold than thiols and phosphines [61].

AuNPs exhibit a characteristic surface plasmon resonance (SPR), which typically occurs at around 520 nm for AuNPs synthesized with sodium citrate (NaCit) [62]. In colloidal form, this results in their reddish color. SPR is sensitive to various physicochemical parameters such as particle size, shape, environment and aggregation state, thereby enabling targeted control of optical properties. The aggregation of AuNPs leads to a shift in SPR and color change from red to blue, which can be used as a simple, visual indicator of instability or interactions in the solution [63]. As a test, we have used NaBH_4 for the reduction of KAuCl_4 and obtained intensely violet-colored solutions which thereby indicate larger AuNPs.

The UV-Vis data overview in Figure 6 for the PAR method and Figure S10 for the one-pot method shows very similar absorption maxima for the surface plasmon resonance in the range from 517 to 525 nm and similar band width for most samples in water (Table S1). The similarity in the absorption maxima and bandwidth reflects the similar size of the AuNP cores from TEM analysis in the range of 11–18 nm and with small size dispersion. An exception is the surface plasmon resonances (SPR) of the samples AuNP@PAA15k and AuNP@PAA100K from the one-pot method in water, with a significant red shift in the maximum to 533 nm which correlates with the polydispersity seen in the TEM sample.

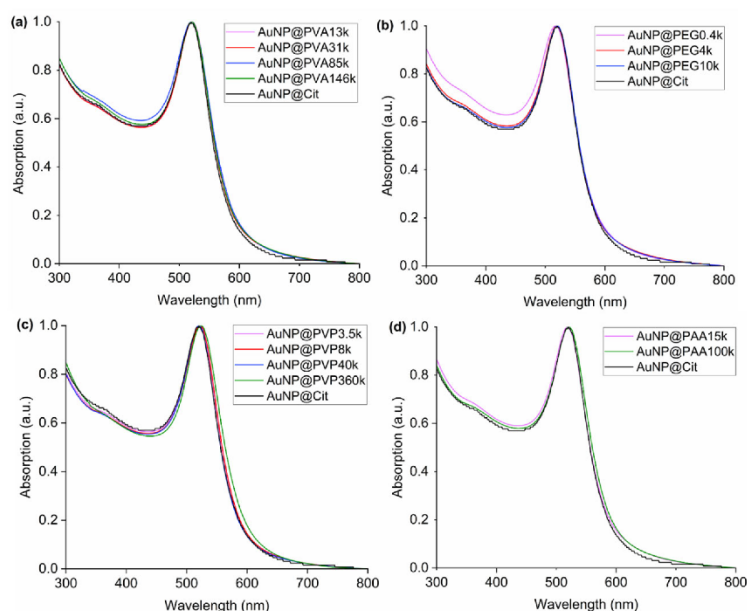


Figure 6. UV-Vis spectra in water from the PAR synthesis method of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. For the spectra from the one-pot method, see Figure S10. The absorption maxima are listed in Table S1.

3.2. Characterization of the AuNP Samples Transferred to Ethanol

The TEM analysis in Figures 7, S11 and S12 of the samples after their transfer into ethanol yields a range of 11–19 nm which is essentially identical to the 11–18 nm region of the samples in water (Table S1). The numerical data of all samples in ethanol are listed in Table S3. Small changes such as an increase in size by a few nanometers, for example, for PAR AuNP@PVA85k, AuNP@PEG0.4k and AuNP@PAA100k, for one-pot AuNP@PVA13k, AuNP@PVA146k, AuNP@PEG0.4k and AuNP@PEG10k (Figure 7) should not be overinterpreted as this deviation is still within the standard deviation of 3σ . However, the samples prepared by the one-pot method (Figure S14) with the polymers PVP and PAA100k, showed no longer well-separated, individual AuNPs. Instead, these samples depicted highly aggregated, anisotropic and non-spherical nanoparticles. The non-spherical nature of the AuNPs with PVP and PAA100k from the one-pot method was already observed in the TEM images in water, which were given in Figure 3, where the individual NPs could still be discerned. Due to this heterogeneous appearance, a reliable particle diameter analysis in ethanol based on the TEM images was not possible. It is evident that the polymers PVP and PAA in combination with the one-pot synthesis are less stabilizing for AuNPs, especially when the nanoparticles are transferred from water to ethanol.

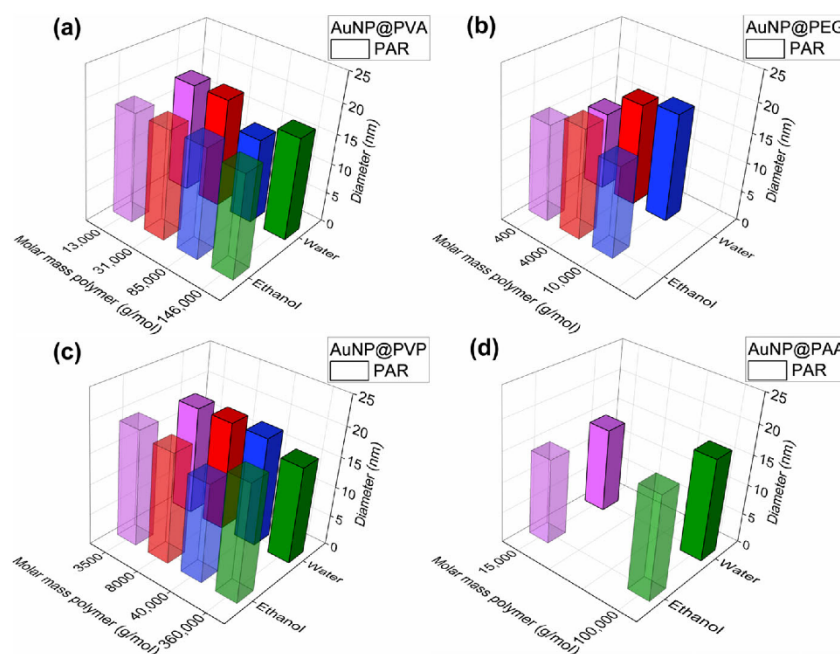


Figure 7. Comparative overview of the TEM size from PAR in water and ethanol of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. The individual TEM images for the ethanol samples are given in Figure S11, numerical data of the samples in ethanol is listed in Table S3. The bars for the ethanol dispersion are shown as transparent so that the bars in the water row can be seen more clearly. The same color for different polymers simply indicates an increasing molecular weight; purple represents the polymer with the lowest molecular weight and green represents those with a molecular weight above 100,000 g/mol.

The comparative overview of the hydrodynamic diameter from DLS from PAR in water and ethanol in Figure 8 indicates the expected increase in D_h with increasing molar mass of the polymer. It can be concluded not only from TEM but also from DLS and UV-Vis (Figures 8, S23 and S25) that the nanoparticles from the PAR method remain rather unperturbed when transferred from water to ethanol. A single exception is the PEG10k-coated NPs. Here, DLS data in ethanol show a hydrodynamic diameter of 163 nm (vs.

32 nm in water) and a strong red-shift to 699 nm can be witnessed in the UV-Vis spectra (vs. 520 nm in water) (cf. Tables S1 and S3). Perhaps this aggregation deduced from the solution methods DLS and UV-Vis of the AuNP@PEG10k conjugates could also be inferred from the TEM image in Figure S11 where the individual gold cores are very close together, much closer than in the TEM images with the other polymers. This proximity where the nanoparticles appear to touch each other could derive from a missing polymer coating that was washed away. In the discussion of the DLS analysis in water, we had already noted that the very similar hydrodynamic diameter of the PEG-based conjugates, irrespective of polymer chain length, may indicate little interaction of the PEG polymer with the gold core, since PEG contains only ether groups that do not have a strong binding affinity to gold. Furthermore, nonpolar PEG provides a largely steric stabilization, whereas the more polar PVA, PVP and PAA polymers enable also some electrostatic stabilization. Further, the high solubility of PEG in ethanol also adds to its removal from the nanoparticle surface, leaving only the citrate layer, if any, and thus contributes to the tendency of the gold cores to aggregate [64–68].

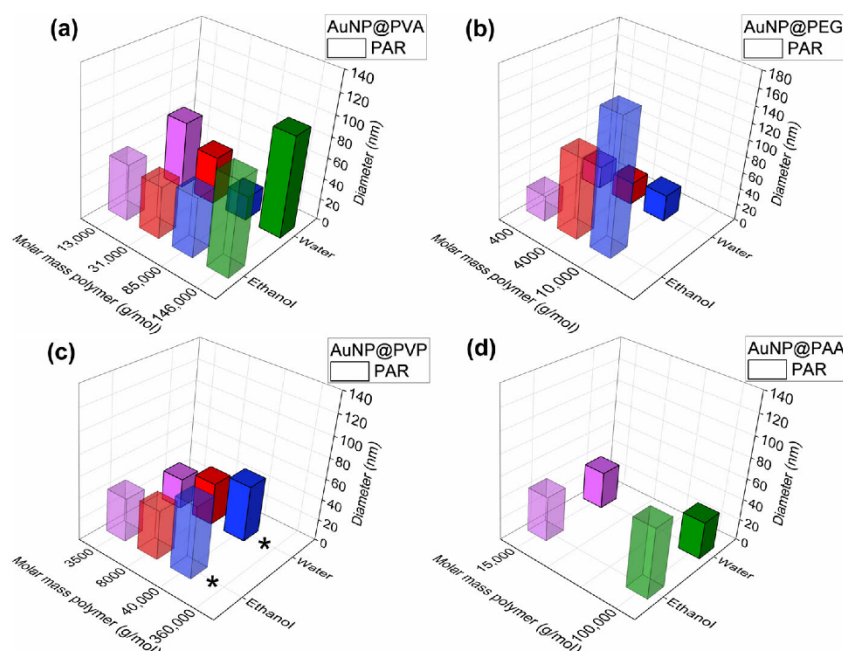


Figure 8. Comparative overview of the hydrodynamic diameter from DLS from PAR in water and ethanol of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. The individual DLS images for the ethanol samples are given in Figures S15–S18 and S23, numerical data of the samples in ethanol is listed in Table S3. The bars for the ethanol dispersion are shown transparent so that the bars in the water row can be seen more clearly. In ethanol some DLS values for PAR featured PDIs > 0.5 (AuNP@PEG10k, AuNP@PAA100k), which makes quantitative comparisons less reliable. * The AuNP@PVP360k samples show unexpectedly large hydrodynamic diameters (Tables S1 and S3), which are off-scale. The same color for different polymers simply indicates an increasing molecular weight; purple represents the polymer with the lowest molecular weight and green represents those with a molecular weight above 100,000 g/mol.

We note that aggregation here can mean two things: agglomeration of the gold nanoparticle cores or of the polymer shells surrounding two or more still separate AuNP cores, or a discrepancy between DLS and TEM will result when the polymer shells but not the AuNP cores aggregate. In TEM, only the still separate, albeit close, gold nanoparticle cores are seen whereas DLS detects the (AuNP)₂₋₃@Polymer conglomerate with its increased hydrodynamic diameter. Depending on the polymer, an opposite effect may

occur when the polymer is desorbed from the gold surface during sample dilution prior to the TEM measurement, thereby enabling AuNP core aggregation.

The nanoparticle instability from the one-pot synthesis (Figure S24) with the polymers PVP and PAA100k, which was evident in the TEM images (compare Figures 3 and S12), was not immediately evident in the DLS analysis of the PVP samples where the hydrodynamic diameter in ethanol remained similar to those measured in water (Figures 8, S23 and S24). Yet, in the UV-Vis spectra in ethanol, there is a broadening of the bands for AuNP@PVP, especially evident for PVP3.5k and PVP360k, also with a bathochromic shift to 531 nm and more significant to 576 nm for PVP360k (Figure S26, Table S3). From the one-pot synthesis, the longer-chain PEG conjugates exhibit a very large increase in hydrodynamic diameter in DLS after their transfer into ethanol (Figure 8). For UV-Vis and AuNP@PEG10k, the same strong red-shift as with PAR is seen in the one-pot product (Figures S25 and S26). For PAA100k, the hydrodynamic diameter increased in ethanol to 139 nm (vs. 58 nm in water) (cf. Tables S1 and S3) and the UV-Vis band strongly broadened (Figure S26).

For the AuNPs functionalized with PEG a tendency towards instability in ethanol can be inferred from the DLS and UV-Vis measurements similar to what observed in the case of PAR. Of all the polymers used in both synthesis methods, the PVA-coated AuNPs exhibit the highest colloidal stability both in water and after transfer to ethanol.

Overall, the AuNP@Polymer conjugates show less stabilization in ethanol than in water, also because highly polar water has a high dielectric constant (approx. 80), which gives stronger electrostatic interactions and can shield charges more efficiently. The dielectric constant of less polar ethanol is only about 25, which means that the electrostatic shielding is weaker, and the particles can attract each other and agglomerate [69,70]. Water also builds a stable hydrogen bond network to polymer chains with H-bond acceptors (OH in PVA, N-CO in PVP and CO₂- in PAA), which then can be solvated effectively. In ethanol, a weaker hydrogen bonding network is formed, so that the polymer shells of the AuNP@Polymer conjugates can approach and interact better, which results in their aggregation in solution [71–75].

To assess short-term stability, the AuNPs were suspended in ethanol for 3 days. The particle size determination by TEM shows no significant change for most samples after 3 days in ethanol (Figure S29, cf. Table S4 and Figure S13). However, despite the unchanged particle size, a clear agglomeration of the AuNP@PEG samples for both synthesis methods becomes evident (Figures S27 and S28). Further, the AuNP@PVP samples and AuNP@PAA100k from the one-pot method continued to show the highly aggregated, anisotropic and non-spherical nanoparticles as after the immediate TEM measurement (Figure S12).

3.3. Loading of DASA on the AuNP@Polymer Conjugates

As a test for drug loading, we have investigated here the loading of the tyrosine kinase inhibitor (TKI) DASA (BMS-354825, Sprycel®), which required a change of the solvent to ethanol, as DASA is not soluble in water but in ethanol.

DASA (see Scheme S1 for the molecular structure) can be used as a drug to treat cancer and against drug resistance [76]. It inhibits the phosphorylation of the oncogenic and Src kinase families and can thus prevent angiogenesis and the associated tumor growth and support apoptosis [27,77,78]. As a TKI, it can be used in many tumor types such as leukemia, glioblastoma multiforme (GBM), pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and many others [79–82].

To determine the mass loading of DASA per mass of gold, the combined DASA and AuNP@Polymer dispersions (volume 5.8 mL) were stirred and centrifuged after 72 h. The supernatants were removed with a pipette and stored in the refrigerator at 4 °C until the HPLC measurement was performed. From the HPLC measurement, the remaining DASA

concentration was determined with the calibration curve in Figure S41. From the difference to the starting concentration of DASA the mass which was adsorbed on the AuNP@Polymer conjugate was obtained.

A typical DASA loading was in the range of 100–300 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of gold for all polymers except for PVA for both the PAR and one-pot method samples. For the PVA samples, the loading was consistently below 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and often close to no loading at all. This is because PVA has multiple hydroxyl groups and forms a stable hydrogen bond network with water in aqueous media, allowing it to swell in water. In ethanol, however, PVA has the lowest solubility of the polymers used here, which means that the H-bridge network with ethanol is significantly weaker [83–85]. This reduces the degree of swelling, causing the PVA polymer shell to adhere more densely and compactly to the AuNP surface, so that AuNP@PVA exhibit higher stability in ethanol than the conjugates with the other polymers, but this also means that the DASA molecules can only penetrate the polymer corona to a limited extent. There may be some correlation of the DASA loading for the PEG, PVP and PAA conjugates with their observed tendency of aggregation in ethanol as discussed above.

3.4. Growth Inhibition in Glioblastoma Stem Cell Models

To evaluate whether AuNP@Polymer formulations could modulate the activity of DASA, we tested AuNPs, free DASA and DASA-loaded at AuNP@PVA31k across four glioblastoma stem cell (GSC) models, which represent both classical and mesenchymal molecular subtypes. As expected, AuNPs, that is, AuNP@PVA31k had negligible effects on cell viability, confirming the biocompatibility of the carrier system.

Treatment with DASA alone resulted in a time-dependent reduction in viability, with the most pronounced effect in NCH421K cells, where a significant decrease compared to control was observed by days 2 and 3 (Figure S42) at relatively high dose of 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. This indicates that certain GSC models retain partial sensitivity to Src-family kinase inhibition. In contrast, the remaining models (GBM1, BTSC233 and JHH520) displayed only modest viability reductions, in line with the heterogeneous and overall limited response profile of glioblastoma to DASA reported in preclinical and clinical studies [86].

When combined with AuNP@PVA31k, DASA induced growth inhibition patterns closely resembling those of free drug across all models. Importantly, activity was preserved after nanoparticle formulation, demonstrating that the drug remains bioactive after loading and release. However, no consistent potentiation of efficacy was observed compared with free DASA. This suggests that intrinsic resistance mechanisms in GSCs, such as the activation of compensatory pathways and efflux transporters like ABCB1/ABCG2 at the blood–brain barrier and at the cellular level likely dominate the therapeutic response [87].

Thus, our results confirm that DASA–AuNPs are stable, non-toxic carriers that preserve drug activity in vitro and reveal differential sensitivity among GSC models, with NCH421K showing the clearest response. The lack of marked improvement compared with DASA alone suggests that future work should focus on pairing AuNP delivery with compounds or drug combinations that have higher intrinsic potency in glioblastoma, thereby leveraging the delivery benefits of nanoparticles more effectively.

4. Conclusions

AuNP@Polymer conjugates were prepared in water by two different synthesis methods using polymers with different functional groups and chain lengths to compare their eligibility to stabilize the nanoparticles in water and ethanol. The gold precursor KAuCl_4 was reduced to Au(0) with sodium citrate. The polymers were either post-synthetically added (PAR) or were already present during the reduction in a one-pot method. Stable conjugates in water could be produced with all AuNP polymer systems using both PAR

and one-pot methods. Characterization by TEM and DLS yielded similar gold core sizes of 11–18 in water or 11–19 nm in ethanol, and hydrodynamic diameters of 20–70 nm for most AuNP@Polymer samples and both synthesis methods and solvents. Among all polymers tested (i) PVA is the most stable polymer in both water and ethanol, (ii) PEG shows poor stability in ethanol, (iii) PVP and PAA give solvent- and MW-dependent outcomes, (iv) DASA can be loaded successfully onto PEG, PVP, and PAA conjugates but not PVA and (v) PAR consistently yields spherical, stable particles across all polymers, while one-pot synthesis sometimes results in anisotropic or aggregated particles.

For future work, polymers with better coordinating groups such as thiol groups should be used, as gold has a high affinity for thiolated molecules; for example, Thio-PEG or Thio-PVA. These polymers bind to the AuNP surface via an S-linker and can enable a more stable polymer shell. Hydrophobic polymers such as poly(lactide-co-glycolide) could also be tested towards hydrophobic drug loading. Future works on the stabilizing effect of different polymers should also focus on the colloidal stability of AuNPs in complex biological media under physiologically relevant cell culture media conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/chemistry7050159/s1>, Section S1. Characterization of AuNP@Cit and AuNP@Polymer in water; Section S2.1. Characterization of AuNP@Polymer in ethanol after transfer from water; Section S2.2. Synthesis and characterization of the AuNP samples after 3 days in ethanol; Section S3. Quantification of DASA loading; Section S4. In vitro drug sensitivity test results. Section S5. References. References [88,89] are cited in the Supplementary Materials.

Author Contributions: Conceptualization, M.K., A.Y.S. and U.D.K.; methodology, M.K.; software, M.K.; validation, M.K.; formal analysis, M.K. and A.Y.S.; investigation, M.K., R.L.V. and A.Y.S.; resources, C.J.; data curation, M.K.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, M.K., A.Y.S., U.D.K. and C.J.; visualization, M.K.; supervision, C.J.; project administration, C.J.; funding acquisition, C.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Bundesamt für Strahlenschutz (FKZ 3622S7229B, Integrated molecular Imaging for Personalized Biomarker-based Breast Cancer Characterization and Treatment, IMMPRINT). This research has received funding from the European Union's EURATOM research and training programme under grant agreement No. 101061037 as part of the PIANOFORTE partnership. Further, the project was carried out with funds provided by the Federal Ministry for the Environment, Climate Action, Nature Conservation and Nuclear Safety (BMUKN) and on behalf of the Federal Office for Radiation Protection (BfS).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Core Facility for Electron Microscopy of the Institute of Medical Faculty of the Heinrich Heine University Düsseldorf for access to the JEOL JEM-2100Plus electron microscope instrument.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AuNPs	Gold nanoparticles
PAR	Postsynthetic addition reaction
PVA	Poly(vinyl alcohol)

PEG	Poly(ethylene glycol)
PVP	Poly(vinyl pyrrolidone)
PAA	Poly(acrylic acid)
TEM	Transmission electron microscopy
UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy
DLS	Dynamic light scattering
HPLC	High-performance liquid chromatography
NaCit	Sodium citrate dihydrate
PDI	Polydispersity index
DASA	Dasatinib
GSC	Glioblastoma stem cells

References

- Liang, M.; Lin, I.-C.; Whittaker, M.R.; Minchin, R.F.; Monteiro, M.J.; Toth, I. Cellular Uptake of Densely Packed Polymer Coatings on Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *4*, 403–413. [\[CrossRef\]](#)
- Richards, S.-J.; Gibson, M.I. Optimization of the Polymer Coating for Glycosylated Gold Nanoparticle Biosensors to Ensure Stability and Rapid Optical Readouts. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 1004–1008. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Y.; Quinsaat, J.E.Q.; Ono, T.; Maeki, M.; Tokeshi, M.; Isono, T.; Tajima, K.; Satoh, T.; Sato, S.-i.; Miura, Y.; et al. Enhanced dispersion stability of gold nanoparticles by the physisorption of cyclic poly(ethylene glycol). *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6089. [\[CrossRef\]](#)
- Silva, V.C.J.D.; Silva, R.N.O.; Colli, L.G.; Carvalho, M.H.C.; Rodrigues, S.F. Gold nanoparticles carrying or not anti-VEGF antibody do not change glioblastoma multiforme tumor progression in mice. *Heliyon* **2020**, *6*, e05591. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kang, J.H.; Cho, J.; Ko, Y.T. Investigation on the effect of nanoparticle size on the blood-brain tumor barrier permeability by in situ perfusion via internal carotid artery in mice. *J. Drug Target.* **2018**, *27*, 103–110. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, Y.; Feng, X. Gold nanoparticles for skin drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2022**, *625*, 122122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nejati, K.; Dadashpour, M.; Gharibi, T.; Mellatyar, H.; Akbarzadeh, A. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *J. Clust. Sci.* **2022**, *33*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
- Jain, P.K.; Lee, K.S.; El-Sayed, I.H.; El-Sayed, M.A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238–7248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Huang, X.; El-Sayed, I.H.; Qian, W.; El-Sayed, M.A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2115–2120. [\[CrossRef\]](#)
- Siddique, S.; Chow, J.C.L. Gold Nanoparticles for Drug Delivery and Cancer Therapy. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 3824. [\[CrossRef\]](#)
- Ghobashy, M.M.; Alkhursani, S.A.; Alqahtani, H.A.; El-damhougy, T.K.; Madani, M. Gold Nanoparticles in microelectronics advancements and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. B* **2024**, *301*, 117191. [\[CrossRef\]](#)
- Sen, G.T.; Ozkemahtli, G.; Shahbazi, R.; Erkekoglu, P.; Ulubayram, K.; Kocer-Gumusel, B. The Effects of Polymer Coating of Gold Nanoparticles on Oxidative Stress and DNA Damage. *Int. J. Toxicol.* **2020**, *39*, 328–340. [\[CrossRef\]](#)
- Anniebell, S.; Gopinath, S.C.B. Polymer Conjugated Gold Nanoparticles in Biomedical Applications. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 1433–1445. [\[CrossRef\]](#)
- Hecold, M.; Buczkowska, R.; Mucha, A.; Grzesiak, J.; Rac-Rumijowska, O.; Teterycz, H.; Marycz, K. The Effect of PEI and PVP-Stabilized Gold Nanoparticles on Equine Platelets Activation: Potential Application in Equine Regenerative Medicine. *J. Nanomater.* **2017**, *1*, 8706921. [\[CrossRef\]](#)
- Ling, K.; Jiang, H.; Zhang, Q. A colorimetric method for the molecular weight determination of polyethylene glycol using gold nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 538. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Seo, E.; Lee, S.-H.; Lee, S.; Choi, S.-H.; Hawker, C.J.; Kim, B.-S. Highly Stable Au Nanoparticles with Double Hydrophilic Block Copolymer Templates: Correlation between Structure and Stability. *Polym. Chem.* **2017**, *31*, 4528. [\[CrossRef\]](#)
- Retout, M.; Blond, P.; Jabin, I.; Bruylants, G. Ultrastable PEGylated Calixarene-Coated Gold Nanoparticles with a Tunable Bioconjugation Density for Biosensing Applications. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 290–300. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, X.; Guo, X.; Kang, X.; Yang, H.; Guo, W.; Guan, L.; Wu, H.; Du, L. Surface Functionalization of Pegylated Gold Nanoparticles with Antioxidants Suppresses Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33*, 1195–1205. [\[CrossRef\]](#)
- Kozics, K.; Sramkova, M.; Kopecka, K.; Begerova, P.; Manova, A.; Krivosikova, Z.; Sevcikova, Z.; Liskova, A.; Rollerova, E.; Dubaj, T.; et al. Pharmacokinetics, Biodistribution, and Biosafety of PEGylated Gold Nanoparticles In Vivo. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1702. [\[CrossRef\]](#)

20. Pedziwiatr-Werbicka, E.; Gorzkiewicz, M.; Horodecka, K.; Lach, D.; Barrios-Gumiel, A.; Sánchez-Nieves, J.; Gómez, R.; de la Mata, F.J.; Bryszewska, M. PEGylation of Dendronized Gold Nanoparticles Affects Their Interaction with Thrombin and siRNA. *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125*, 1196–1206. [\[CrossRef\]](#)
21. Soares, S.; Faria, I.; Aires, F.; Monteiro, A.; Pinto, G.; Sales, M.G.; Correa-Duarte, M.A.; Guerreiro, S.G.; Fernandes, R. Application of Gold Nanoparticles as Radiosensitizer for Metastatic Prostate Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4122. [\[CrossRef\]](#)
22. Nguyenova, H.Y.; Kalbacova, M.H.; Dendisova, M.; Sikorova, M.; Jarolimkova, J.; Kolska, Z.; Ulrychova, L.; Weber, J.; Reznickova, A. Stability and biological response of PEGylated gold nanoparticles. *Heliyon* **2024**, *10*, e30601. [\[CrossRef\]](#)
23. Lee, J.W.; Choi, S.-R.; Heo, J.H. Simultaneous Stabilization and Functionalization of Gold Nanoparticles via Biomolecule Conjugation: Progress and Perspectives. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 42311–42328. [\[CrossRef\]](#)
24. Tsutsui, G.; Huang, S.; Sakaue, H.; Shingubara, S.; Takahagi, T. Well-size-controlled Colloidal Gold Nanoparticles Dispersed in Organic Solvents. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2001**, *40*, 346–349. [\[CrossRef\]](#)
25. Hussain, M.H.; Abu Bakar, N.F.; Mustapa, A.N.; Low, K.-F.; Othman, N.H.; Adam, F. Synthesis of Various Size Gold Nanoparticles by Chemical Reduction Method with Different Solvent Polarity. *Nanoscale Res. Lett.* **2020**, *15*, 140. [\[CrossRef\]](#)
26. Aboudzadeh, M.A.; Kruse, J.; Iglesias, M.S.; Cangialosi, D.; Alegria, A.; Grzelczak, M.; Barroso-Bujans, F. Gold nanoparticles endowed with low-temperature colloidal stability by cyclic polyethylene glycol in ethanol. *Soft Matter* **2021**, *17*, 7792–7801. [\[CrossRef\]](#)
27. Kaul, M.; Sanin, A.Y.; Shi, W.; Janiak, C.; Kahlert, U.D. Nanoformulation of dasatinib cannot overcome therapy resistance of pancreatic cancer cells with low LYN kinase expression. *Pharmacol. Rep.* **2024**, *76*, 793–806. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Giesen, B.; Nickel, A.-C.; Barthel, J.; Kahlert, U.D.; Janiak, C. Augmented Therapeutic Potential of Glutaminase Inhibitor CB839 in Glioblastoma Stem Cells Using Gold Nanoparticle Delivery. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 295. [\[CrossRef\]](#)
29. Vinnacombe-Willson, G.A.; Conti, Y.; Stefancu, A.; Weiss, P.S.; Cortés, E.; Scarabelli, L. Direct Bottom-Up In Situ Growth: A Paradigm Shift for Studies in Wet-Chemical Synthesis of Gold Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 8488–8529. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Guyot, C.; Leclère, P.; Voué, M. Gold nanoparticles growing in a polymer matrix: What can we learn from spectroscopic imaging ellipsometry? *J. Vac. Sci. Technol. B* **2020**, *38*, 013602. [\[CrossRef\]](#)
31. Maleeva, K.; Pavlova, A.; Samofalov, G.; Baranov, M.; Smirnov, E.; Bogdanov, K. Easily fabricated SERS tags based on spherical polymer matrices decorated by gold nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.* **2025**, *2978*, 012003. [\[CrossRef\]](#)
32. Duan, H.; Luo, Q.; Wie, Z.; Lin, Y.; He, J. Symmetry-Broken Patches on Gold Nanoparticles through Deficient Ligand Exchange. *ACS Macro Lett.* **2021**, *10*, 786–790. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Hočevár, S.; Milošević, A.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Ackermann-Hirschi, L.; Mottas, I.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B.; Bourquin, C.; Clift, M.J.D. Polymer-Coated Gold Nanospheres Do Not Impair the Innate Immune Function of Human B Lymphocytes in Vitro. *ACS Nano* **2019**, *13*, 6790–6800. [\[CrossRef\]](#)
34. Wen, C.; Broholm, M.M.; Dong, J.; Uthuppu, B.; Jakobsen, M.H.; Fjordbøge, A.S. Transport of citrate and polymer coated gold nanoparticles (AuNPs) in porous media: Effect of surface property and Darcy velocity. *J. Environ. Sci.* **2020**, *92*, 235–244. [\[CrossRef\]](#)
35. Mondo, G.B.; da Silva Ribeiro, C.A.; Schlüter, L.G.; Bellettini, I.C.; Pavlova, E.; Giacomelli, F.C. One-Pot Bottom-up Synthesis of Gold Nanoparticles Mediated by Nitrogen-Containing Polymers: The Role of Chain Features and Environmental Conditions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2024**, *703*, 135116. [\[CrossRef\]](#)
36. Ribeiro, C.A.S.; Albuquerque, L.J.C.; de Castro, C.E.; Pereira, R.M.; Albuquerque, B.L.; Pavlova, E.; Schlüter, L.G.; Batista, B.L.; Bellettini, I.C.; Giacomelli, F.C. Ready-to-use room temperature one-pot synthesis of surface-decorated gold nanoparticles with targeting attributes. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *614*, 489–501. [\[CrossRef\]](#)
37. Reznickova, A.; Slepicka, P.; Slavikova, N.; Staszek, M.; Svorcik, V. Preparation, aging and temperature stability of PEGylated gold nanoparticles. *Colloids Surf. A* **2017**, *523*, 91–97. [\[CrossRef\]](#)
38. Brough, C.; Miller, D.A.; Keen, J.M.; Kucera, S.A.; Lubda, D.; Williams, R.O., III. Use of Polyvinyl Alcohol as a Solubility-Enhancing Polymer for Poorly Water Soluble Drug Delivery (Part 1). *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17*, 167–179. [\[CrossRef\]](#)
39. Li, J.; Zhu, B.; Yao, X.; Zhang, Y.; Zhu, Z.; Tu, S.; Jia, S.; Liu, R.; Kang, H.; Yang, C.J. Synergetic Approach for Simple and Rapid Conjugation of Gold Nanoparticles with Oligonucleotides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 16800–16807. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Meesaragandla, B.; García, I.; Biedenweg, D.; Toro-Mendoza, J.; Coluzza, I.; Liz-Marzán, L.M.; Delcea, M. H-Bonding-Mediated Binding and Charge Reorganization of Proteins on Gold Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 4490–4500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Weisbecker, C.S.; Merritt, M.V.; Whitesides, G.M. Molecular Self-Assembly of Aliphatic Thiols on Gold Colloids. *Langmuir* **1996**, *12*, 3763–3772. [\[CrossRef\]](#)
42. Thambiliyagodage, C. Ligand exchange reactions and PEG stabilization of gold nanoparticles. *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* **2022**, *5*, 100245. [\[CrossRef\]](#)
43. Singh, R.; Srinivas, S.P.; Kumawat, M.; Daima, H.K. Ligand-based surface engineering of nanomaterials: Trends, challenges, and biomedical perspectives. *OpenNano* **2024**, *15*, 100194. [\[CrossRef\]](#)

44. Le Goas, M.; Saber, J.; Bolívar, S.G.; Rabanel, J.-M.; Awogni, J.-M.; Boffito, D.C.; Banquy, X. (In)stability of ligands at the surface of inorganic nanoparticles: A forgotten question in nanomedicine? *Nano Today* **2022**, *45*, 101516. [\[CrossRef\]](#)
45. Woehrle, G.H.; Brown, L.O.; Hutchison, J.E. Thiol-Functionalized, 1.5-nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions: Scope and Mechanism of Ligand Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2172–2183. [\[CrossRef\]](#)
46. Ishida, Y.; Suzuki, J.; Akita, I.; Yonezawa, T. Ultrarapid Cationization of Gold Nanoparticles via a Single-Step Ligand Exchange Reaction. *Langmuir* **2018**, *34*, 10668–10672. [\[CrossRef\]](#)
47. Fan, B.; Liu, Y.; Wan, J.; Crawford, S.; Thang, S.H. Polymerization-Induced Self-Assembly (PISA) and “Host–Guest” Complexation-Directed Polymer/Gold Nanocomposites. *ACS Mater. Lett.* **2020**, *2*, 492–498. [\[CrossRef\]](#)
48. Young, H.L.; McCormick, C.R.; Butterfield, A.G.; Gomez, E.D.; Schaak, R.E. Postsynthetic Thiol-Induced Reshaping of Copper Sulfide Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2022**, *34*, 11014–11025. [\[CrossRef\]](#)
49. Redel, E.; Walter, M.; Thomann, R.; Vollmer, C.; Hussein, L.; Scherer, H.; Krüger, M.; Janiak, C. Synthesis, stabilization, functionalization and DFT calculations of gold nanoparticles in fluorinated phases (PTFE and ILs). *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10047–10059. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Redel, E.; Walter, M.; Thomann, R.; Hussein, L.; Krüger, M.; Janiak, C. Stop-and-go, stepwise and “ligand-free” nucleation, nanocrystal growth and formation of Au-NPs in ionic liquids (ILs). *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1159–1161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Albertini, B.; Mathieu, V.; Iraci, N.; Van Woensel, M.; Schoubben, A.; Donnadio, A.; Greco, S.M.; Ricci, M.; Temperini, A.; Blasi, P.; et al. Tumor Targeting by Peptide-Decorated Gold Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 2430–2444. [\[CrossRef\]](#)
52. Alobaid, M.A.; Richards, S.-J.; Alexander, M.R.; Gibson, M.I. Ghaemmaghami. Monosaccharide coating modulate the intracellular trafficking of gold nanoparticles in dendritic cells. *Mater. Today Bio* **2024**, *29*, 101371. [\[CrossRef\]](#)
53. Turkevich, J.; Stevenson, P.C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75. [\[CrossRef\]](#)
54. Shimmin, R.G.; Schoch, A.-B.; Braun, P.V. Polymer Size and Concentration Effects on the Size of Gold Nanoparticles Capped by polymeric Thiols. *Langmuir* **2004**, *20*, 5613–5620. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Leoncini, M.; Ortile, C.; Tinello, S.; Gross, S.; Mognato, M. Comparative cytotoxicity of biogenic and chemical silver and gold nanoparticles on normal and tumoral lung cells. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2025**, *113*, 107335. [\[CrossRef\]](#)
56. Mahapatra, S.D.; Bhattacharya, D.; Das, S.; Mandal, S.; Sen, N.; Sepay, N.; Bhattacharya, S.K.; Ghosh, A.; Sinha, C. Allium Sativum Manipulated AgNP-Metformin Conjugated Nanostructure: Therapeutic Strategy for Enhanced Antibacterial Action against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *ChemistrySelect* **2025**, *10*, e01282. [\[CrossRef\]](#)
57. Gharib, R.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S.; Charcosset, C. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a membrane protectant during freeze-drying of hydrogenated and non-hydrogenated liposomes and molecule-in-cyclodextrin-in- liposomes: Application to trans-anethole. *Food Chem.* **2018**, *267*, 67–74. [\[CrossRef\]](#)
58. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [\[CrossRef\]](#)
59. Hoseini, B.; Jaafari, M.R.; Golabpour, A.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Karimi, M.; Eslami, S. Application of ensemble machine learning approach to assess the factors affecting size and polydispersity index of liposomal nanoparticles. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 18012. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Feller, D.; Otten, M.; Hildebrandt, M.; Krüsmann, M.; Bryant, G.; Karg, M. Translational and rotational diffusion coefficients of gold nanorods functionalized with a high molecular weight, thermoresponsive ligand: A depolarized dynamic light scattering study. *Soft Matter* **2021**, *17*, 4019. [\[CrossRef\]](#)
61. Raji, F.; Peng, Y. Review of gold-ligand interactions: Implications for metallurgical processes and nanoparticle synthesis. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2025**, *345*, 103644. [\[CrossRef\]](#)
62. Sani, A.; Cao, C.; Cui, D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *26*, 100991. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Kesharwani, P.; Ma, R.; Sang, L.; Fatima, M.; Sheikh, A.; Abourehab, M.A.S.; Gupta, N.; Chen, Z.-S.; Zhou, Y. Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy. *Mol. Cancer* **2023**, *22*, 98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Zhang, X.; Jimmy Huang, P.-J.; Servos, M.R.; Liu, J. Effects of Polyethylene Glycol on DNA Adsorption and Hybridization on Gold Nanoparticles and Graphene Oxide. *Langmuir* **2012**, *28*, 14330–14337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Uz, M.; Bulmus, V.; Altinkaya, S.A. Effect of PEG Grafting Density and Hydrodynamic Volume on Gold Nanoparticle–Cell Interactions: An Investigation on Cell Cycle, Apoptosis, and DNA Damage. *Langmuir* **2016**, *32*, 5997–6009. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Chen, H.; Paholak, H.; Ito, M.; Sansanaphongpricha, K.; Qian, W.; Che, Y.; Sun, D. ‘Living’ PEGylation on gold nanoparticles to optimize cancer cell uptake by controlling targeting ligand and charge densities. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 355101. [\[CrossRef\]](#)
67. Aboudzadeh, M.A.; Iturrospe, A.; Arbe, A.; Grzelczak, M.; Barroso-Bujans, F. Cyclic Polyethylene Glycol as Nanoparticle Surface Ligand. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 1604–1610. [\[CrossRef\]](#)
68. Paul, D.; Ganesan, R.; Ray Dutta, J. Effect of polymeric additives on gold nanoparticles for colorimetric detection of hepatitis C virus. *Gold Bull.* **2025**, *58*, 8. [\[CrossRef\]](#)

69. Mohsen-Nia, M.; Amiri, H.; Jazi, B. Dielectric Constants of Water, Methanol, Ethanol, Butanol and Acetone: Measurement and Computational Study. *J. Solut. Chem.* **2010**, *39*, 701–708. [\[CrossRef\]](#)
70. Tseng, K.-H.; Liao, C.-Y.; Huang, J.-C.; Tien, D.-C.; Tsung, T.-T. Characterization of gold nanoparticles in organic or inorganic medium (ethanol/water) fabricated by spark discharge method. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 3341–3344. [\[CrossRef\]](#)
71. Liao, J.; Zhang, Y.; Yu, W.; Xu, L.; Ge, C.; Liu, J.; Gu, N. Linear aggregation of gold nanoparticles in ethanol. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *223*, 177–183. [\[CrossRef\]](#)
72. Tilaki, R.M.; Irajizad, A.; Mahdavi, S.M. The effect of liquid environment on size and aggregation of gold nanoparticles prepared by pulsed laser ablation. *J. Nanopart. Res.* **2007**, *9*, 853–860. [\[CrossRef\]](#)
73. Lu, H.; Huang, W.M.; Fu, Y.Q.; Leng, J. Quantitative separation of the influence of hydrogen bonding of ethanol-water mixture on the shape recovery behavior of polyurethane shape memory polymer. *Smart Mater. Struct.* **2014**, *23*, 125041. [\[CrossRef\]](#)
74. Jewrajka, S.K.; Chatterjee, U. Block copolymer mediated synthesis of amphiphilic gold nanoparticles in water and an aqueous tetrahydrofuran medium: An approach for the preparation of polymer–gold nanocomposites. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2006**, *44*, 1841–1854. [\[CrossRef\]](#)
75. Mani, S.; Khabaz, F.; Godbole, R.V.; Hedden, R.C.; Khare, R. Structure and Hydrogen Bonding of Water in Polyacrylate Gels: Effects of Polymer Hydrophilicity and Water Concentration. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 15381–15393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Galanis, E.; Anderson, S.K.; Twohy, E.L.; Carrero, X.W.; Dixon, J.G.; Tran, D.D.; Jeyapalan, S.A.; Anderson, D.M.; Kaufmann, T.J.; Feathers, R.W.; et al. A phase 1 and randomized, placebo-controlled phase 2 trial of bevacizumab plus dasatinib in patients with recurrent glioblastoma: Alliance/North Central Cancer Treatment Group N0872. *Cancer* **2019**, *125*, 3790–3800. [\[CrossRef\]](#)
77. Gnani, A.; Marech, I.; Silvestris, N.; Vacca, A.; Lorusso, V. Dasatinib: An anti-tumour agent via Src inhibition. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 563–578. [\[CrossRef\]](#)
78. Usama, S.M.; Jiang, Z.; Pflug, K.; Sitcheran, R.; Burgess, K. Conjugation of Dasatinib with MHI-148 Has a Significant Advantageous Effect in Viability Assays for Glioblastoma Cells. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 1575–1579. [\[CrossRef\]](#)
79. Dumont, R.A.; Hildebrandt, I.; Su, H.; Haubner, R.; Reischl, G.; Czernin, J.G.; Mischel, P.S.; Weber, W.A. Noninvasive imaging of alphaVbeta3 function as a predictor of the antimigratory and antiproliferative effects of dasatinib. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3173–3179. [\[CrossRef\]](#)
80. de Groot, J.; Milano, V. Improving the prognosis for patients with glioblastoma: The rationale for targeting Src. *J. Neurooncol.* **2009**, *95*, 151–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Teng, T.; Cai, Y.; Pi, W.; Gao, L.; Shay, C. Augmentation of the anticancer activity of CYT997 in human prostate cancer by inhibiting Src activity. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 118. [\[CrossRef\]](#)
82. Rice, L.; Lepler, S.; Pampo, C.; Siemann, D.W. Impact of the SRC inhibitor dasatinib on the metastatic phenotype of human prostate cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **2012**, *29*, 133–142. [\[CrossRef\]](#)
83. Cazón, P.; Vázquez, M.; Velázquez, G. Composite films of regenerate cellulose with chitosan and polyvinyl alcohol: Evaluation of water adsorption, mechanical and optical properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *117*, 235–246. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Mishra, S.; Bajpai, R.; Katore, R.; Bajpai, A.K. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol based biomaterials: Water sorption and in vitro blood compatibility study. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *100*, 2402–2408. [\[CrossRef\]](#)
85. Lopes, J.F.A.; Simoneau, C. Solubility of Polyvinyl Alcohol in Ethanol. *EFSA Support. Publ.* **2014**, *11*, 660E. [\[CrossRef\]](#)
86. Schiff, D.; Sarkaria, J. Dasatinib in recurrent glioblastoma: Failure as a teacher. *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, 910–911. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Schulz, J.A.; Hartz, A.M.S.; Bauer, B. ABCB1 and ABCG2 Regulation at the Blood-Brain Barrier: Potential New Targets to Improve Brain Drug Delivery. *Pharmacol. Rev.* **2023**, *75*, 815–853. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Lee, M.-J.; Lin, T.-K. Density and Viscosity for Monoethanolamine + Water, + Ethanol, and + 2-Propanol. *J. Chem. Eng.* **1995**, *40*, 336–339. [\[CrossRef\]](#)
89. Antoniou, E.; Alexandridis, P. Polymer conformation in mixed aqueous-polar organic solvents. *Eur. Polym. J.* **2010**, *46*, 324–335. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Materials:

Solvent-Dependent Stabilization of Gold Nanoparticles: A Comparative Study on Polymers and the Influence of Their Molecular Weight in Water and Ethanol

Marilyn Kaul ¹, Rolf Lennart Vanselow ¹, Ahmed Y. Sanin ², Ulf D. Kahlert ² and Christoph Janiak ^{1,*}

¹ Institute for Inorganic and Structural Chemistry, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40204 Düsseldorf, Germany; marilyn.kaul@uni-duesseldorf.de (M.K.); rvanselow@web.de (R.L.V)

² Molecular and Experimental Surgery, University Clinic for General-, Visceral-, Vascular- and Transplant Surgery, Faculty of Medicine, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany; ahmed.sanin@med.ovgu.de (A.Y.S.); ulf.kahlert@med.ovgu.de (U.D.K.)

* Correspondence: janiak@uni-duesseldorf.de (C.J.); Tel.: +49-211-81-12286

Content

Section 1. Characterization of AuNP@Cit and AuNP@Polymer in water	2-8
Section 2.1. Characterization of AuNP@Polymer in ethanol after transfer from water within 1 day	9-19
Section 2.2. Characterization of AuNP@Polymer in ethanol after transfer from water after 3 days	20-28
Section S3. Quantification of DASA loading	29-30
Section S4. In vitro drug sensitivity test results	31
Section S5. References	32

Section 1. Characterization of AuNP@Cit and AuNP@Polymer in water

Table S1. Measurements of AuNP@Cit and AuNP@Polymer in water of PAR and one-pot synthesis with the transmission electron microscopy (TEM) particle size (nm), the hydrodynamic radius D_h (nm), the corresponding PDI and the absorption maximum $\lambda_{\max}$ (nm).

Sample	TEM (nm)	D_h (nm)	PDI	$\lambda_{\max}$ (nm)
AuNP@Cit	-	25	0.09	520
PAR Method				
AuNP@PVA13k	18 ± 2	64	0.27	521
AuNP@PVA31k	18 ± 2	45	0.08	521
AuNP@PVA85k	14 ± 1	23	0.05	520
AuNP@PVA146k	17 ± 2	96	0.25	521
AuNP@PEG0.4k	13 ± 1	27	0.15	517
AuNP@PEG4k	17 ± 2	27	0.07	519
AuNP@PEG10k	18 ± 2	32	0.24	520
AuNP@PVP3.5k	18 ± 1	29	0.17	521
AuNP@PVP8k	18 ± 1	40	0.13	522
AuNP@PVP40k	18 ± 1	53	0.34	524
AuNP@PVP360k	16 ± 2	177	0.22	524
AuNP@PAA15k	14 ± 2	33	0.28	519
AuNP@PAA100k	17 ± 1	35	0.10	521
One-pot Method				
AuNP@PVA13k	15 ± 2	36	0.07	522
AuNP@PVA31k	14 ± 2	71	0.32	524
AuNP@PVA85k	17 ± 2	61	0.23	520
AuNP@PVA146k	12 ± 3	72	0.20	525
AuNP@PEG0.4k	12 ± 2	26	0.20	521
AuNP@PEG4k	15 ± 1	24	0.12	521
AuNP@PEG10k	14 ± 1	28	0.10	521
AuNP@PVP3.5k	15 ± 2	56	0.35	520
AuNP@PVP8k	14 ± 2	50	0.23	521
AuNP@PVP40k	6 ± 2	53	0.17	520
AuNP@PVP360k	8 ± 4	298	0.15	524
AuNP@PAA15k	11 ± 4	58	0.09	533
AuNP@PAA100k	2 ± 1	58	0.32	534

The gold nanoparticles which were only stabilized with citrate, AuNP@Cit were also analyzed by DLS and UV-Vis as a reference to evaluate the effects of polymer functionalization on the AuNPs. Figure S1 shows the size distribution of the AuNP@Cit, which have a hydrodynamic diameter (D_h) of 25 nm and a PDI of 0.09 and are monodisperse. The absorption maximum of the dispersion is at 520 nm.

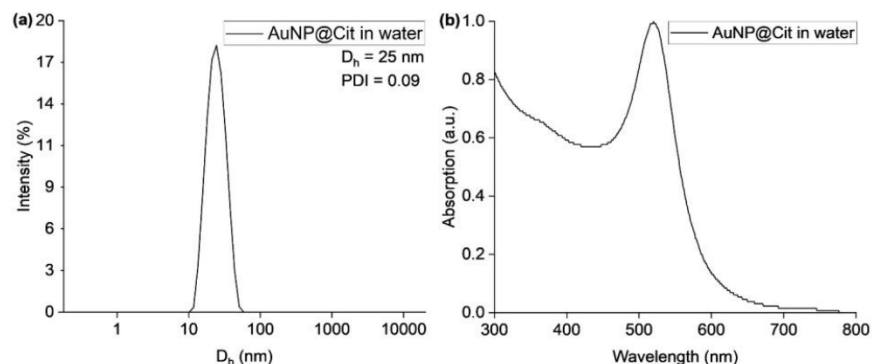


Figure S1. DLS measurement (a) and UV-Vis measurement (b) of AuNP@Cit in water. The absorption maximum is listed in Table S1.

Table S2. The masses of polymers used for 4.3 μ mol of polymer.

Polymer	Polymer mass (g)
PVA13k	0.056
PVA31k	0.133
PVA85k	0.366
PVA146k	0.628
PEG0.4k	0.002
PEG4k	0.017
PEG10k	0.043
PVP3.5k	0.015
PVP8k	0.034
PVP40k	0.172
PVP360k	1.548
PAA15k	0.064
PAA100k	0.430

DLS is based on light scattering, whereby in the intensity distribution larger particles dominate the signal due to their stronger scattering and thus the particles are measured as a function of their size.

In the number distribution, each size has the same influence, regardless of its intensity, which is why the number of particles per size is determined here. The intensity distribution was considered in the measurements, as the number distribution of some samples measured values below 1, which cannot be possible according to the TEM data. It is

likely that in these cases not only the AuNPs but also the pure polymer was recorded, which is why in this case the intensity distribution provides a more realistic representation of the particle size. When evaluating the DLS data for samples with multiple distributions, only the main peak was analyzed, as this represents the dominant proportion of the population.

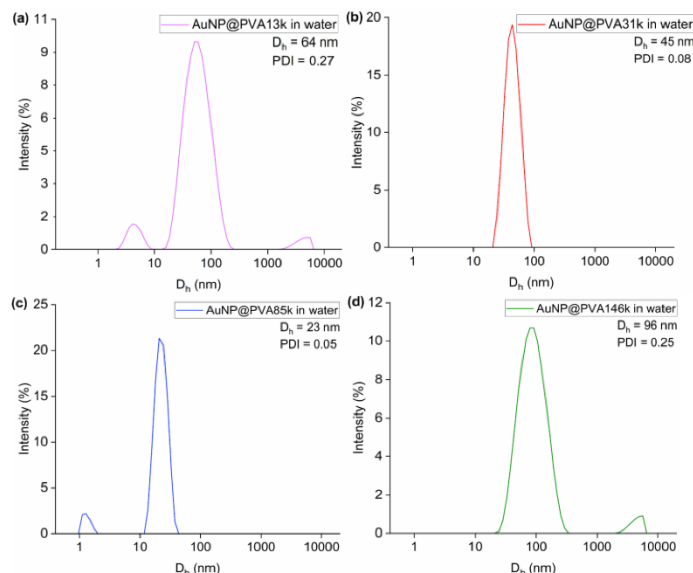


Figure S2. DLS measurements in water from the PAR method of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k and (d) AuNP@PVA146k in water.

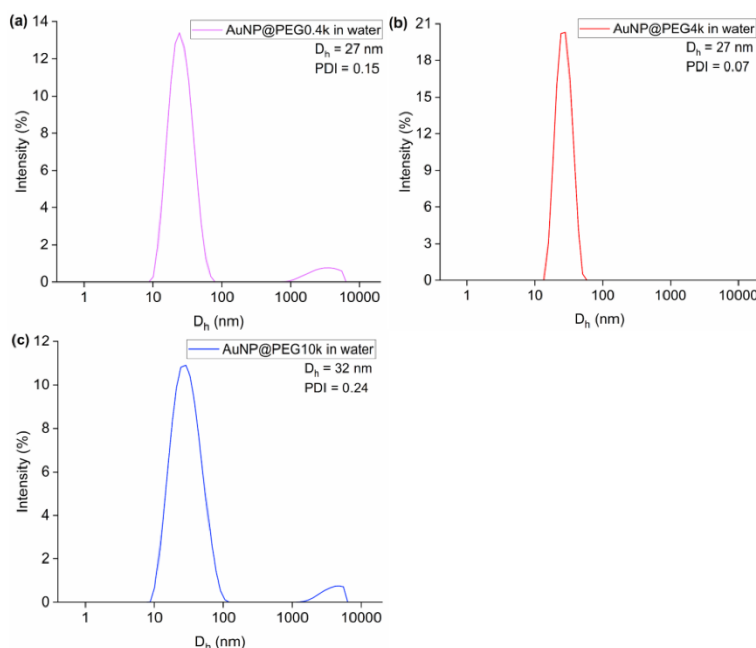


Figure S3. DLS measurements in water from the PAR method of (a) AuNP@PEG0.4k, (b) AuNP@PEG4k and (c) AuNP@PEG10k in water.

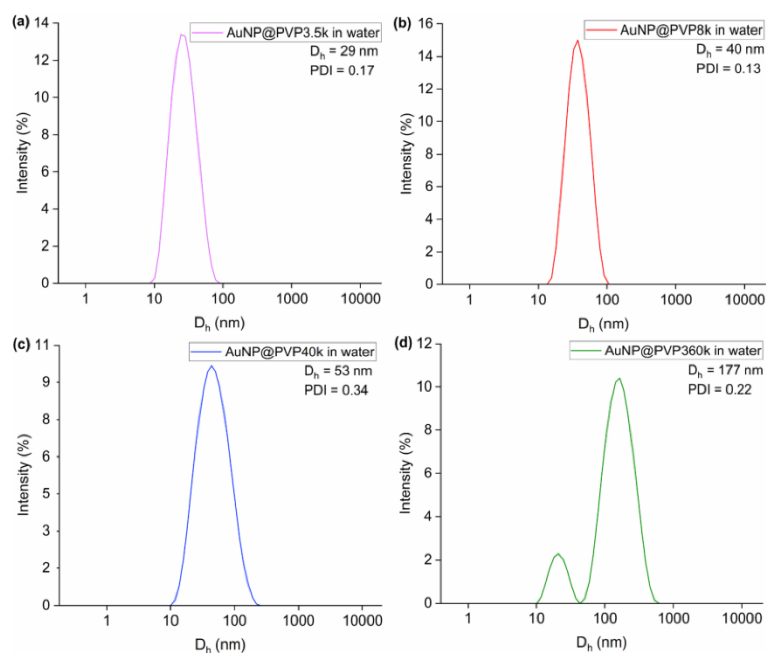


Figure S4. DLS measurements in water from the PAR method of (a) AuNP@PVP3.5k, (b) AuNP@PVP8k, (c) AuNP@PVP40k and (d) AuNP@PVP360k in water.

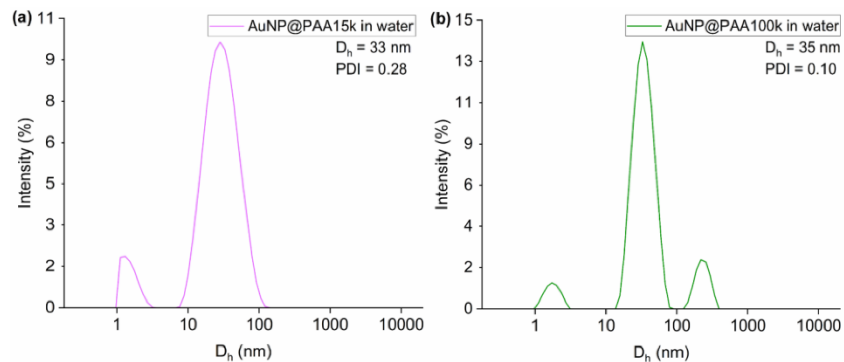


Figure S5. DLS measurements in water from the PAR method of (a) AuNP@PAA15k and (b) AuNP@PAA100k in water.

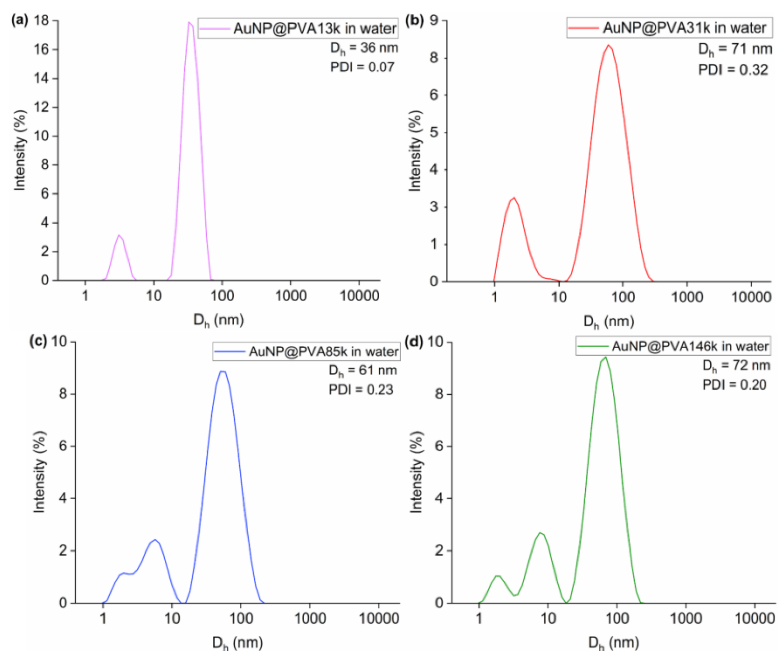


Figure S6. DLS measurements in water from the one-pot method of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PV85k and (d) AuNP@PVA146k in water.

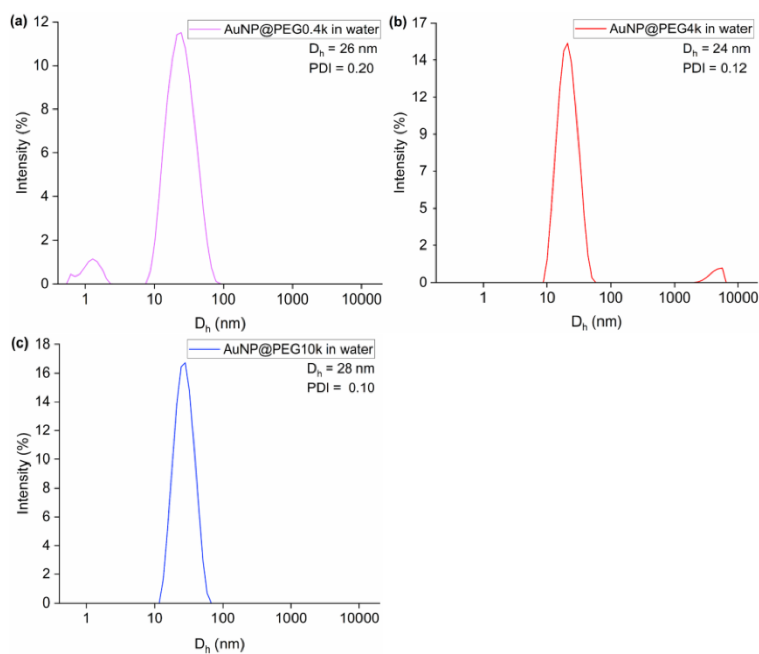


Figure S7. DLS measurements in water from the one-pot method of (a) AuNP@PEG0.4k, (b) AuNP@PEG4k and (c) AuNP@PEG10k in water.

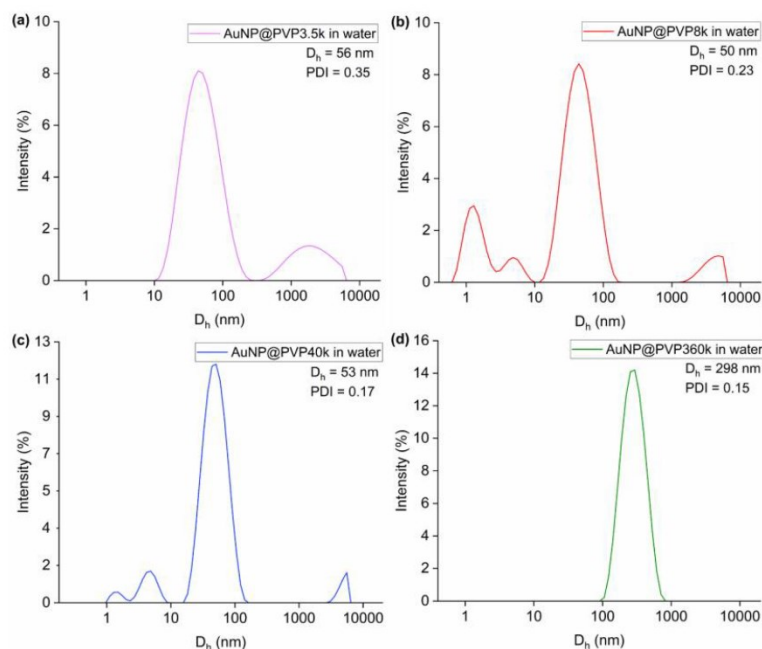


Figure S8. DLS measurements in water from the one-pot method of (a) AuNP@PVP3.5k, (b) AuNP@PVP8k, (c) AuNP@PVP40k and (d) AuNP@PVP360k in water.

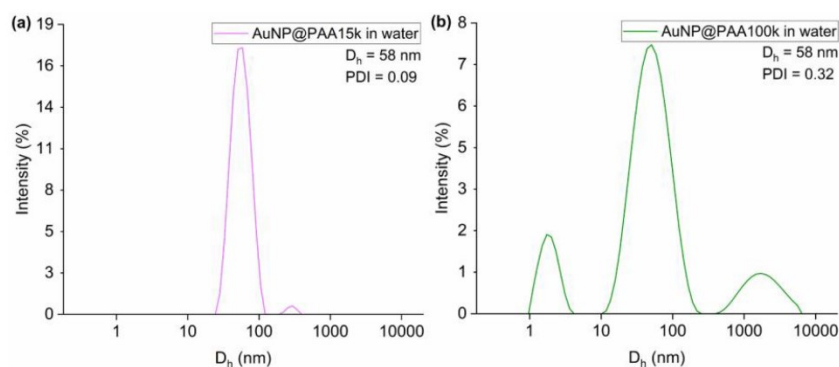


Figure S9. DLS measurements in water from the one-pot method of (a) AuNP@PAA15k and (b) AuNP@PAA100k.

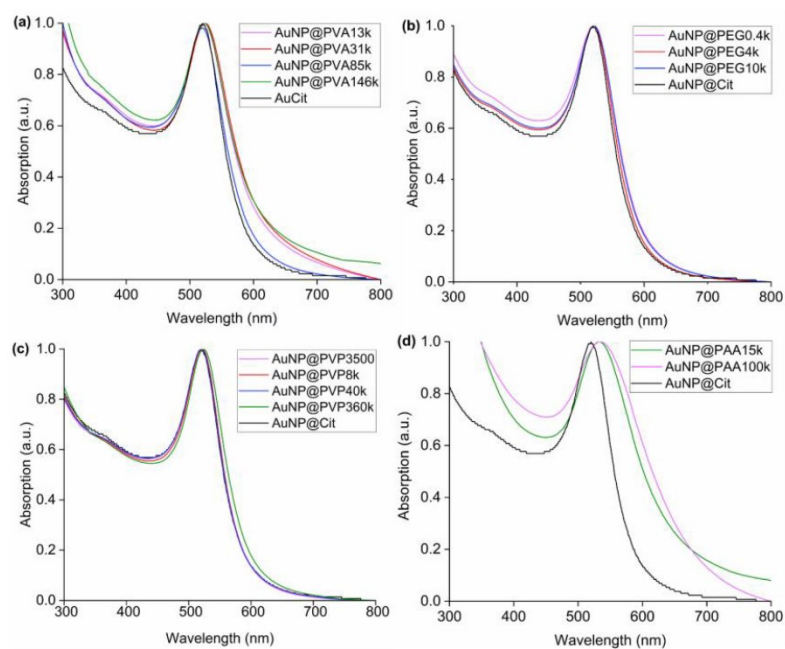


Figure S10. UV-Vis spectra in water from the one-pot synthesis method of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. The absorption maxima are listed in Table S1.

Section 2.1. Characterization of AuNP@Polymer in ethanol after transfer from water

Table S3. Measurements of AuNP@Polymer in EtOH after transfer from PAR and one-pot synthesis in water with the TEM particle size (nm), the hydrodynamic radius D_h (nm), the corresponding PDI and the absorption maximum λ_{max} (nm).

Sample	TEM (nm)	D_h (nm)	PDI ^(a)	λ_{max} (nm)
PAR Method				
AuNP@PVA13k	18 ± 2	53	0.12	524
AuNP@PVA31k	18 ± 2	49	0.10	524
AuNP@PVA85k	18 ± 2	56	0.32	523
AuNP@PVA146k	17 ± 2	88	0.24	525
AuNP@PEG0.4k	16 ± 1	31	0.24	519
AuNP@PEG4k	18 ± 2	98	0.41	522
AuNP@PEG10k	15 ± 2	163	0.61	699
AuNP@PVP3.5k	19 ± 2	41	0.15	523
AuNP@PVP8k	18 ± 2	46	0.07	523
AuNP@PVP40k	16 ± 1	67	0.34	522
AuNP@PVP360k	19 ± 2	189	0.17	526
AuNP@PAA15k	14 ± 2	42	0.25	521
AuNP@PAA100k	17 ± 1	65	0.54	523
One-pot Method				
AuNP@PVA13k	18 ± 2	63	0.16	524
AuNP@PVA31k	15 ± 2	98	0.34	526
AuNP@PVA85k	15 ± 2	104	0.28	526
AuNP@PVA146k	14 ± 2	115	0.65	526
AuNP@PEG0.4k	17 ± 2	76	0.39	531
AuNP@PEG4k	16 ± 1	1068	0.02	521
AuNP@PEG10k	19 ± 2	788	0.006	709
AuNP@PVP3.5k	-	56	0.30	532
AuNP@PVP8k	-	70	0.45	531
AuNP@PVP40k	-	72	0.19	531
AuNP@PVP360k	-	275	0.14	576
AuNP@PAA15k	17 ± 2	81	0.57	538
AuNP@PAA100k	-	139	0.29	550

^(a) In ethanol some DLS values featured PDIs > 0.5 (AuNP@PEG10k, AuNP@PAA100k (PAR), and AuNP@PVA146k, AuNP@PAA15k (one-pot)) which makes quantitative comparisons less reliable.

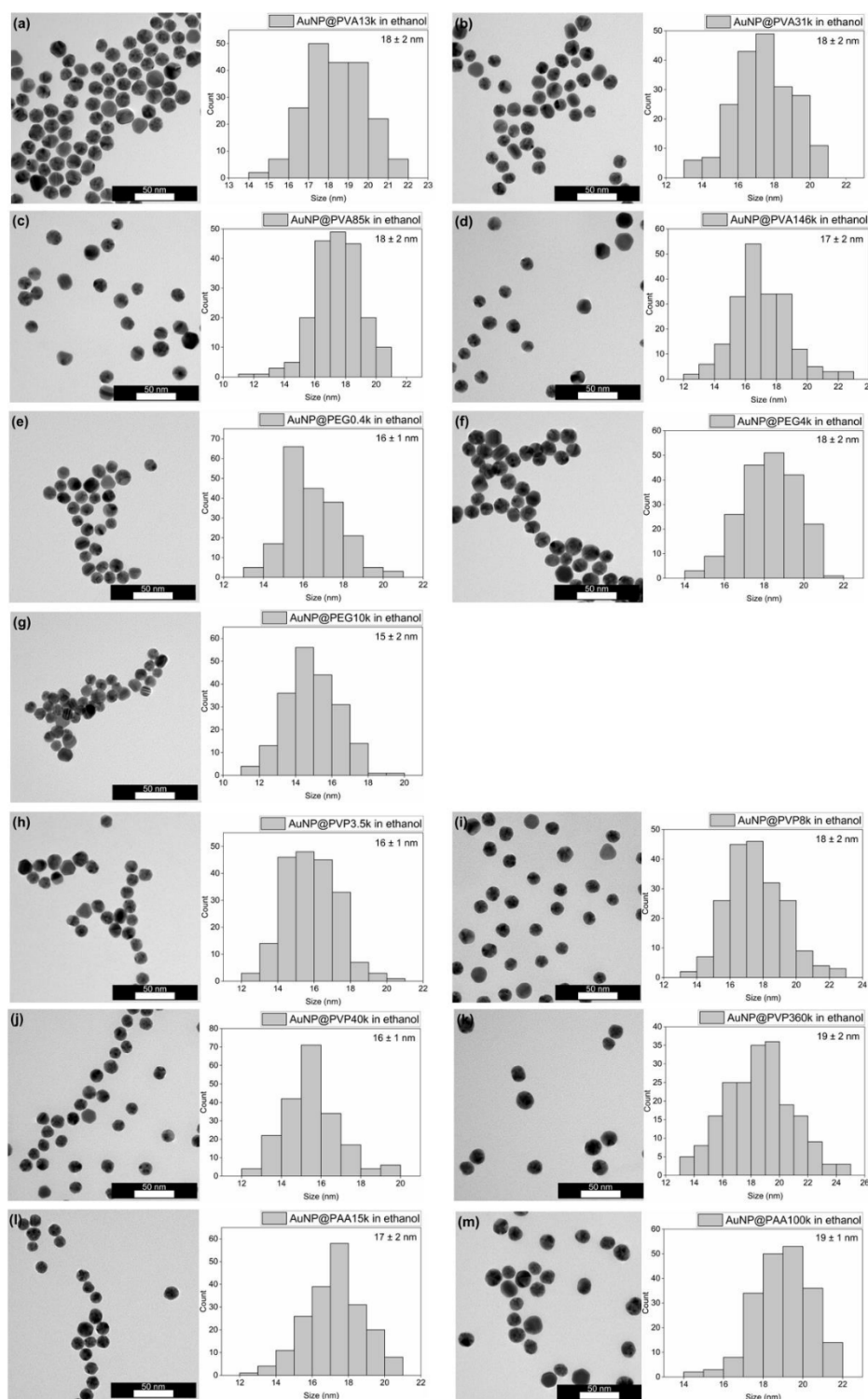


Figure S11. TEM images and histograms (with the average size and its standard deviation given) of the PAR synthesis after transfer to ethanol of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k, (d) AuNP@PVA146k, (e) AuNP@PEG0.4k, (f) AuNP@PEG4k, (g) AuNP@PEG10k, (h) AuNP@PVP3.5k, (i) AuNP@PVP8k, (j) AuNP@PVP40k, (k) AuNP@PVP360k, (l) AuNP@PAA15k and (m) AuNP@PAA100k. For the histograms 200 particles were analyzed using larger areas of the TEM images. For the average size and standard deviation, see Table S3.

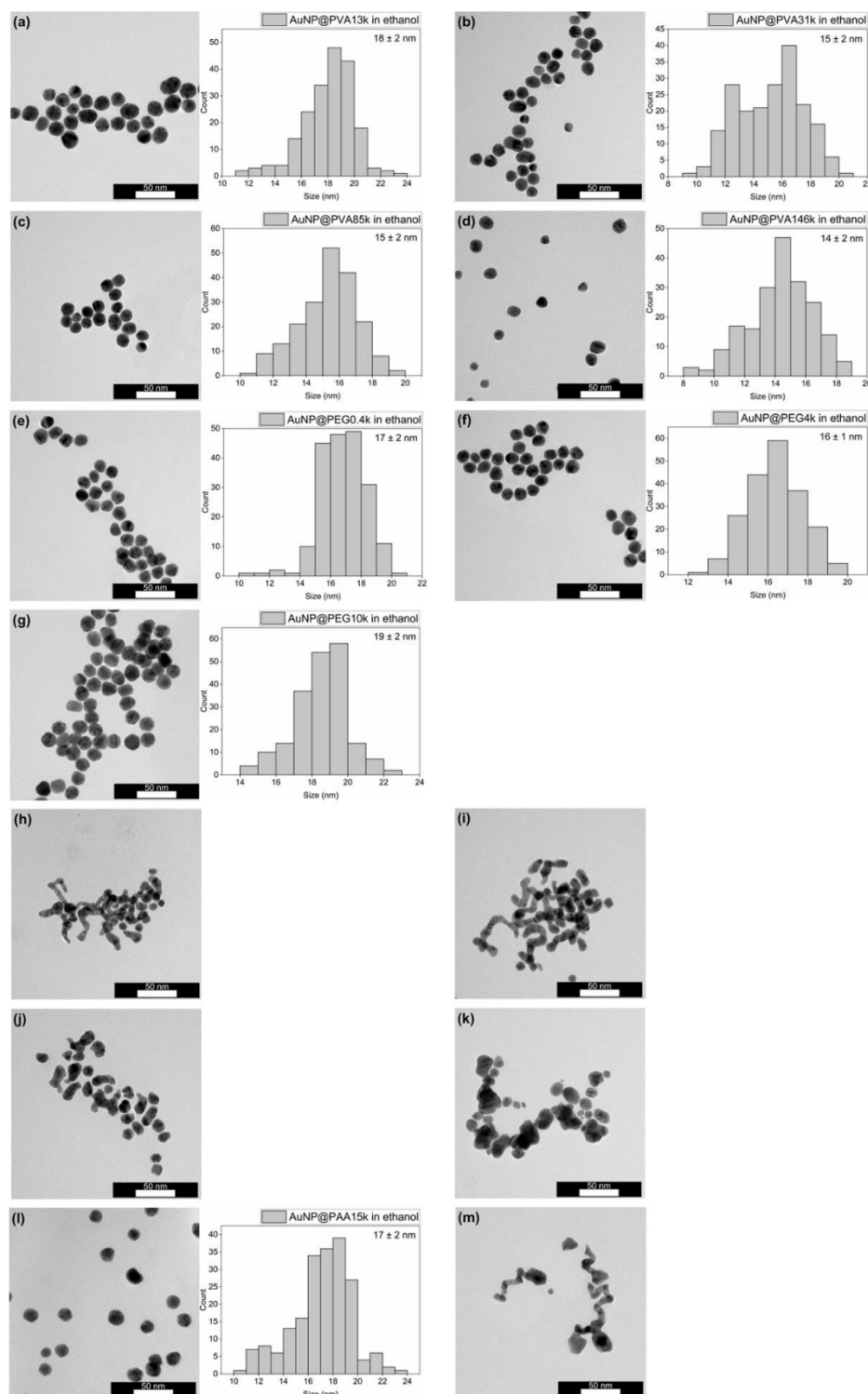


Figure S12. Representative TEM images and histograms (with the average size and its standard deviation given) of the one-pot synthesis after transfer to ethanol of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k, (d) AuNP@PVA146k, (e) AuNP@PEG0.4k, (f) AuNP@PEG4k, (g) AuNP@PEG10k, (h) AuNP@PVP3.5k, (i) AuNP@PVP8k, (j) AuNP@PVP40k, (k) AuNP@PVP360k, (l) AuNP@PAA15k and (m) AuNP@PAA100k. For the histograms 200 particles were analyzed using larger areas of the TEM images. It was not possible to measure the remaining samples, as they do not have a spherical morphology, but rather elongated structures. For the average size and standard deviation, see Table S3.

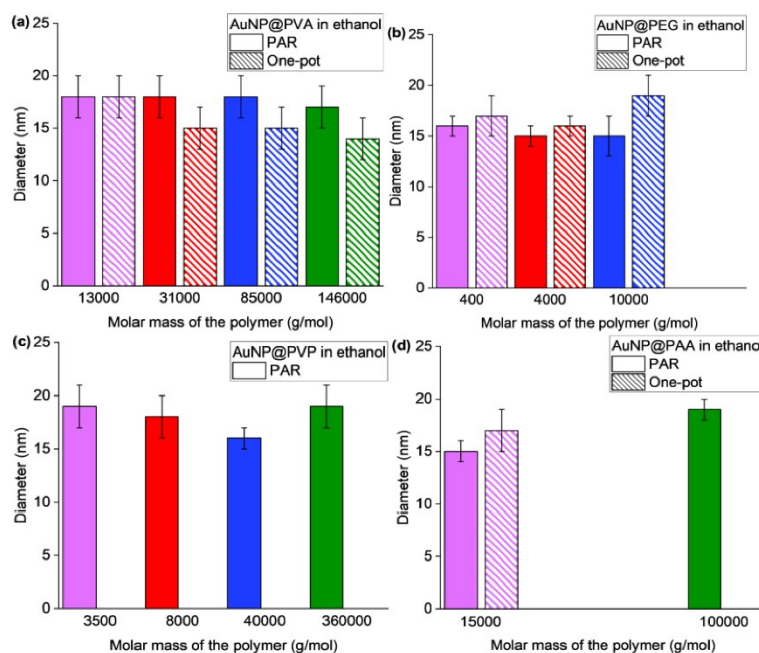


Figure S13. Graphical overview of the TEM size and their deviation in ethanol of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot).

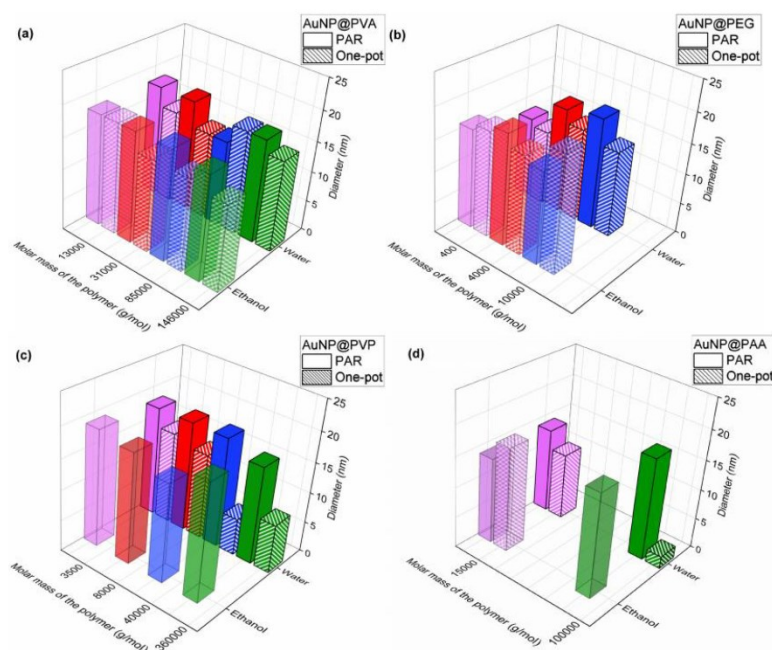


Figure S14. Graphical comparative overview of the TEM size in water and ethanol of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot). The individual TEM images for the ethanol samples are given in Figure S11 and S12, numerical data of the samples in ethanol is listed in Table S3. The bars for the ethanol dispersion are shown transparent so that the bars in the water row can be seen more clearly.

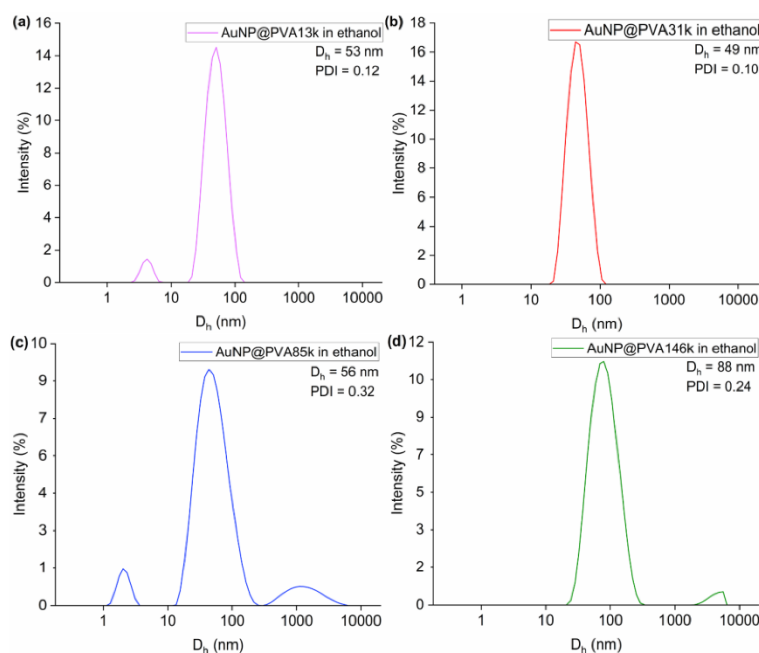


Figure S15. DLS measurements in ethanol from the PAR method of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k and (d) AuNP@PVA146k.

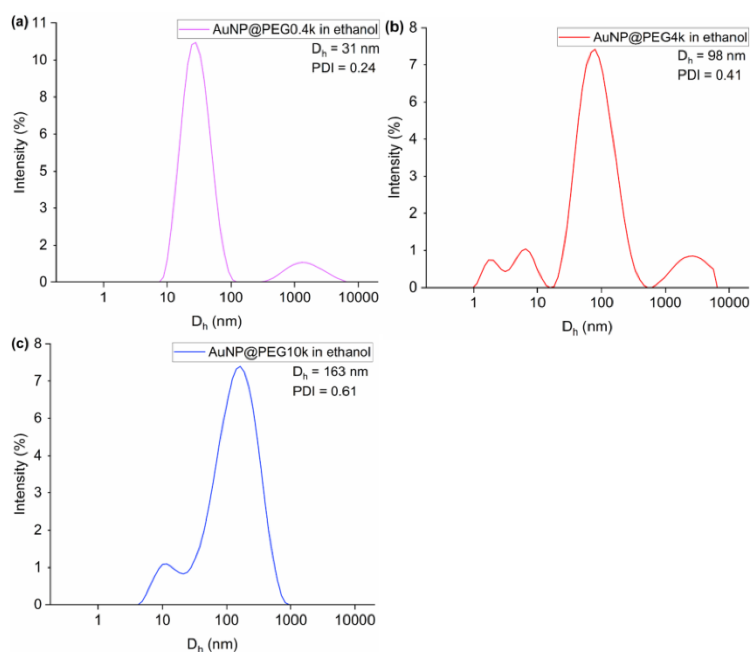


Figure S16. DLS measurements in ethanol from the PAR method of (a) AuNP@PEG0.4k, (b) AuNP@PEG4k and (c) AuNP@PEG10k.

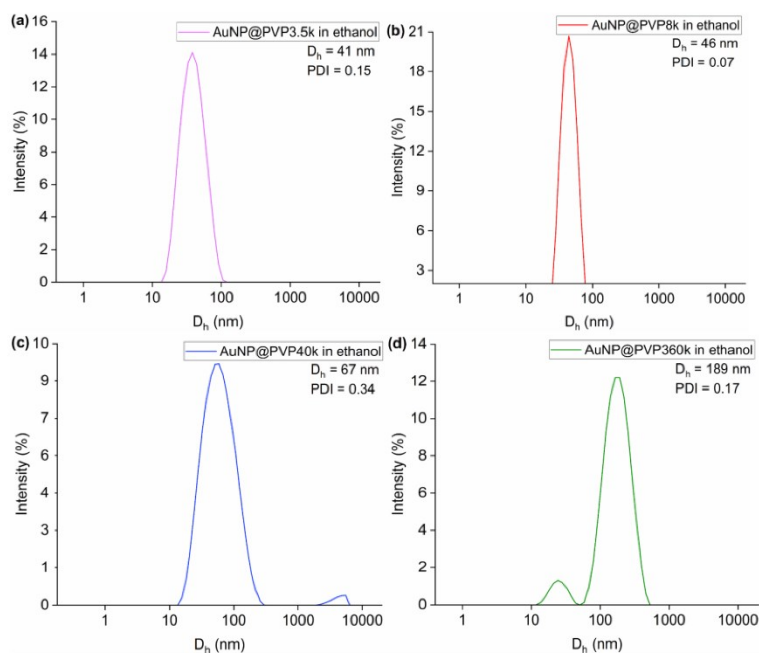


Figure S17. DLS measurements in ethanol from the PAR method of (a) AuNP@PVP3.5k, (b) AuNP@PVP8k, (c) AuNP@PVP40k and (d) AuNP@PVP360k.

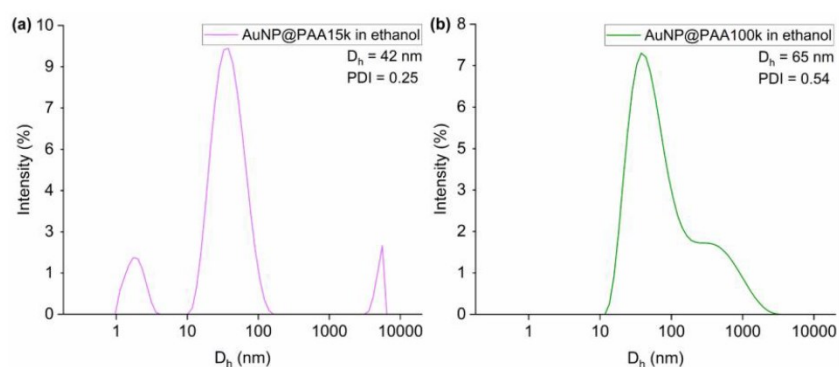


Figure S18. DLS measurements in ethanol from the PAR method of (a) AuNP@PAA15k and (b) AuNP@PAA100k.

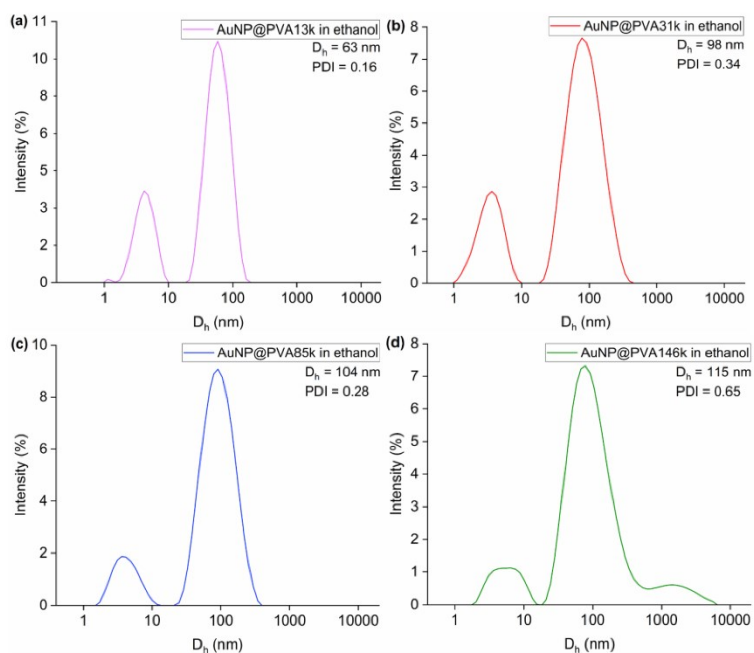


Figure S19. DLS measurements in ethanol from the one-pot method of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k and (d) AuNP@PVA146k.

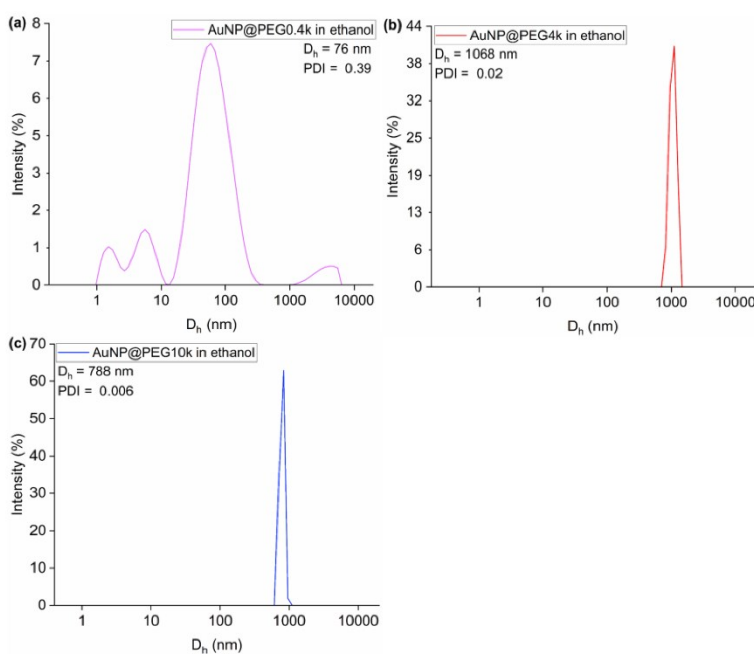


Figure S20. DLS measurements in ethanol from the one-pot method of (a) AuNP@PEG0.4k, (b) AuNP@PEG4k and (c) AuNP@PEG10k.

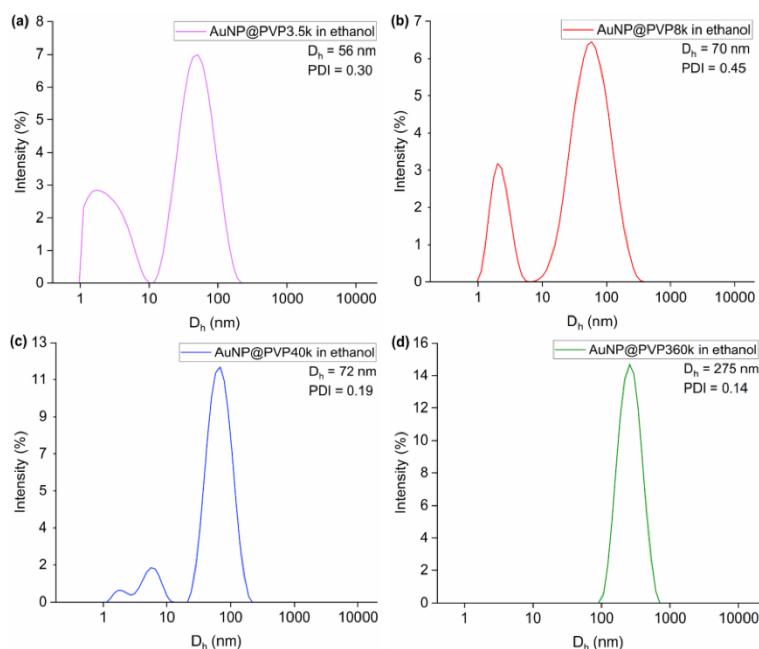


Figure S21. DLS measurements in ethanol from the one-pot method of (a) AuNP@PVP3.5k, (b) AuNP@PVP8k, (c) AuNP@PVP40k and (d) AuNP@PVP360k.

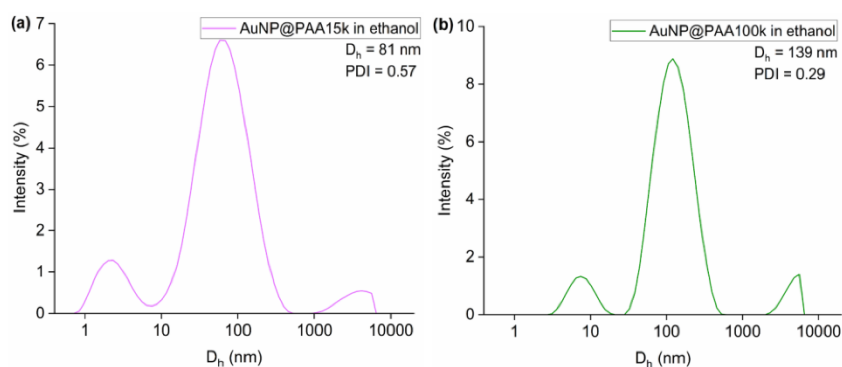


Figure S22. DLS measurements in ethanol from the one-pot method of (a) AuNP@PAA15k and (b) AuNP@PAA100k.

A slight increase in D_h , see Figure 8 and S14-S21, was observed in almost all samples.

This increase can be explained because ethanol has a lower viscosity than water, which means that the AuNP@Polymer conjugates can move faster which gives them a larger hydrodynamic diameter [1,2] but the actual gold core size does not change [3]. In Samples with a significant increase in D_h after their transfer from water to ethanol are noted and discussed in the main text.

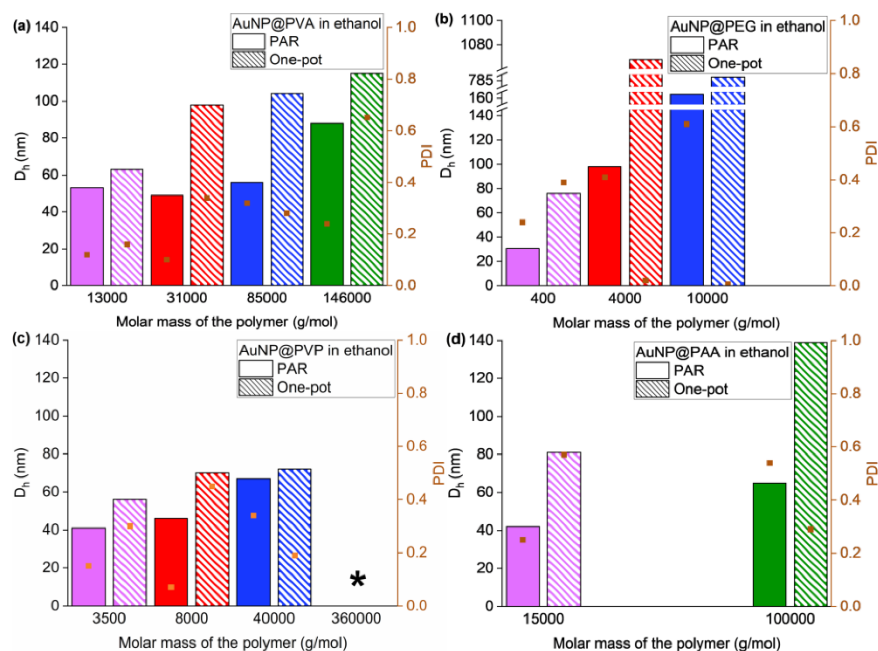


Figure S23. Graphical overview of all the DLS results in ethanol of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot). The brown squares represent the PDI. *The AuNP@PVP360k sample shows an unexpectedly very large hydrodynamic diameter for both the PAR method (189 nm) and the one-pot method (275 nm), which is off-scale.

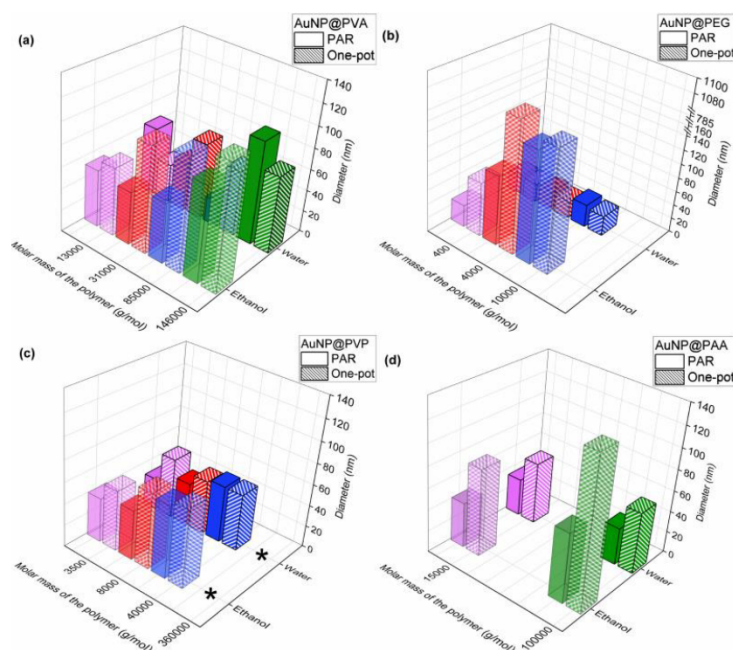


Figure S24. Comparative overview of the hydrodynamic diameter from DLS in water and ethanol of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot). Note the split diameter axis for the PEG samples. The individual DLS images for the ethanol samples are given in Figure S15-S22 and S23, numerical data of the samples in ethanol is listed in Table S3. The bars for the ethanol dispersion are shown transparent so that the bars in the water row can be seen more clearly. In ethanol some DLS values featured PDIs > 0.5 (AuNP@PEG10k, AuNP@PAA100k (PAR), and AuNP@PVA146k, AuNP@PAA15k (one-pot)) which

makes quantitative comparisons less reliable. *The AuNP@PVP360k samples show unexpectedly large hydrodynamic diameters (Table S1 and S3), which are off-scale.

The UV-Vis spectra in Figure S23 (PAR) and in Figure S24 (one-pot) shown for the PAR samples a similar bandwidth in the 519-526 nm range and for the one-pot samples in the 521-531 nm range without the exceptions where are discussed in the main text (Table S3). The maxima exhibit a slightly bathochromically shift in ethanol compared to the samples in water (Table S1).

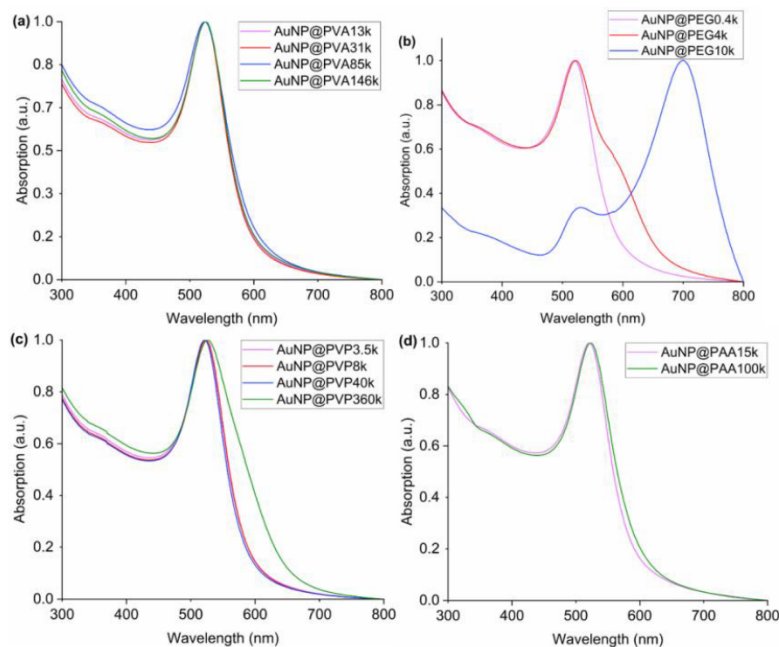


Figure S25. UV-Vis spectra in ethanol from the PAR synthesis method of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. The absorption maxima are listed in Table S3.

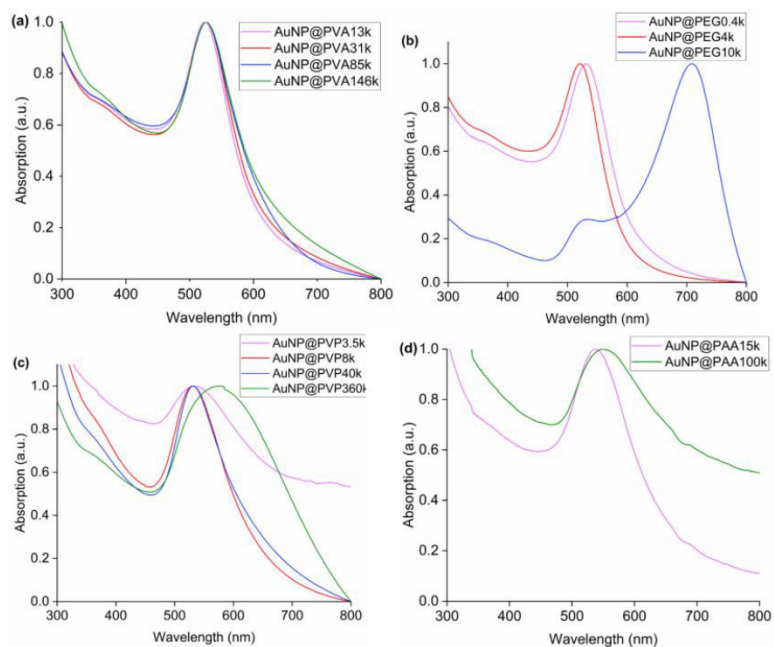


Figure S26. UV-Vis spectra in ethanol from the one-pot synthesis method of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. The absorption maxima are listed in Table S3.

Section 2.2. Characterization of AuNP@Polymer in ethanol after transfer from water after 3 days

Table S4. Measurements of AuNP@Polymer after 3 days in EtOH of PAR and one-pot synthesis with the TEM particle size (nm), the hydrodynamic radius D_h (nm), the corresponding PDI and the absorption maximum λ_{max} (nm) of the AuNPs.

Sample	TEM (nm)	D_h (nm)	PDI	λ_{max} (nm)
PAR Method				
AuNP@PVA13k	18 ± 2	703	0.001	535
AuNP@PVA31k	17 ± 2	82	0.15	524
AuNP@PVA85k	15 ± 2	85	0.28	531
AuNP@PVA146k	17 ± 2	187	0.45	523
AuNP@PEG0.4k	16 ± 2	44	0.10	524
AuNP@PEG4k	18 ± 2	1005	0.02	752
AuNP@PEG10k	14 ± 2	993	0.02	724
AuNP@PVP3.5k	16 ± 2	65	0.22	524
AuNP@PVP8k	18 ± 2	69	0.09	523
AuNP@PVP40k	16 ± 2	60	0.15	522
AuNP@PVP360k	18 ± 2	192	0.11	526
AuNP@PAA15k	17 ± 2	63	0.39	523
AuNP@PAA100k	19 ± 2	105	0.11	526
One-pot Method				
AuNP@PVA13k	19 ± 2	76	0.25	527
AuNP@PVA31k	15 ± 2	103	0.52	529
AuNP@PVA85k	14 ± 2	150	0.50	525
AuNP@PVA146k	14 ± 2	162	0.34	524
AuNP@PEG0.4k	17 ± 1	103	0.05	525
AuNP@PEG4k	16 ± 1	465	0.001	708
AuNP@PEG10k	18 ± 2	837	0.01	755
AuNP@PVP3.5k	-	147	0.07	530
AuNP@PVP8k	-	112	0.02	523
AuNP@PVP40k	-	192	0.41	531
AuNP@PVP360k	-	283	0.20	574
AuNP@PAA15k	18 ± 2	87	0.37	531
AuNP@PAA100k	-	158	0.18	550

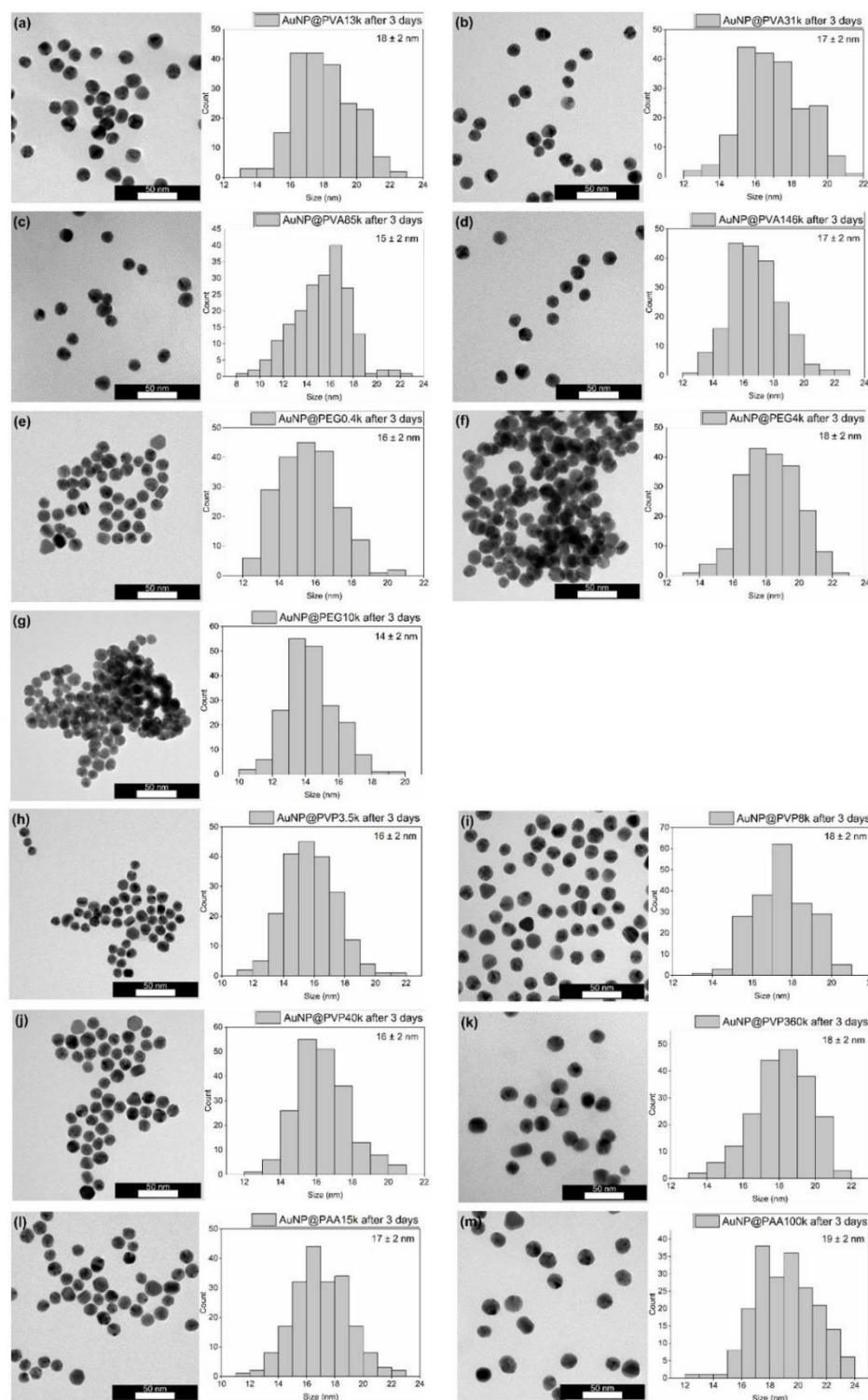


Figure S27. Representative TEM images and histograms (with the average size and its standard deviation given) of the PAR synthesis after 3 days in ethanol of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k, (d) AuNP@PVA146k, (e) AuNP@PEG0.4k, (f) AuNP@PEG4k, (g) AuNP@PEG10k, (h) AuNP@PVP3.5k, (i) AuNP@PVP8k, (j) AuNP@PVP40k, (k) AuNP@PVP360k, (l) AuNP@PAA15k and (m) AuNP@PAA100k. For the histograms 200 particles were analyzed using larger areas of the TEM images. For the average size and standard deviation, see Table S4.

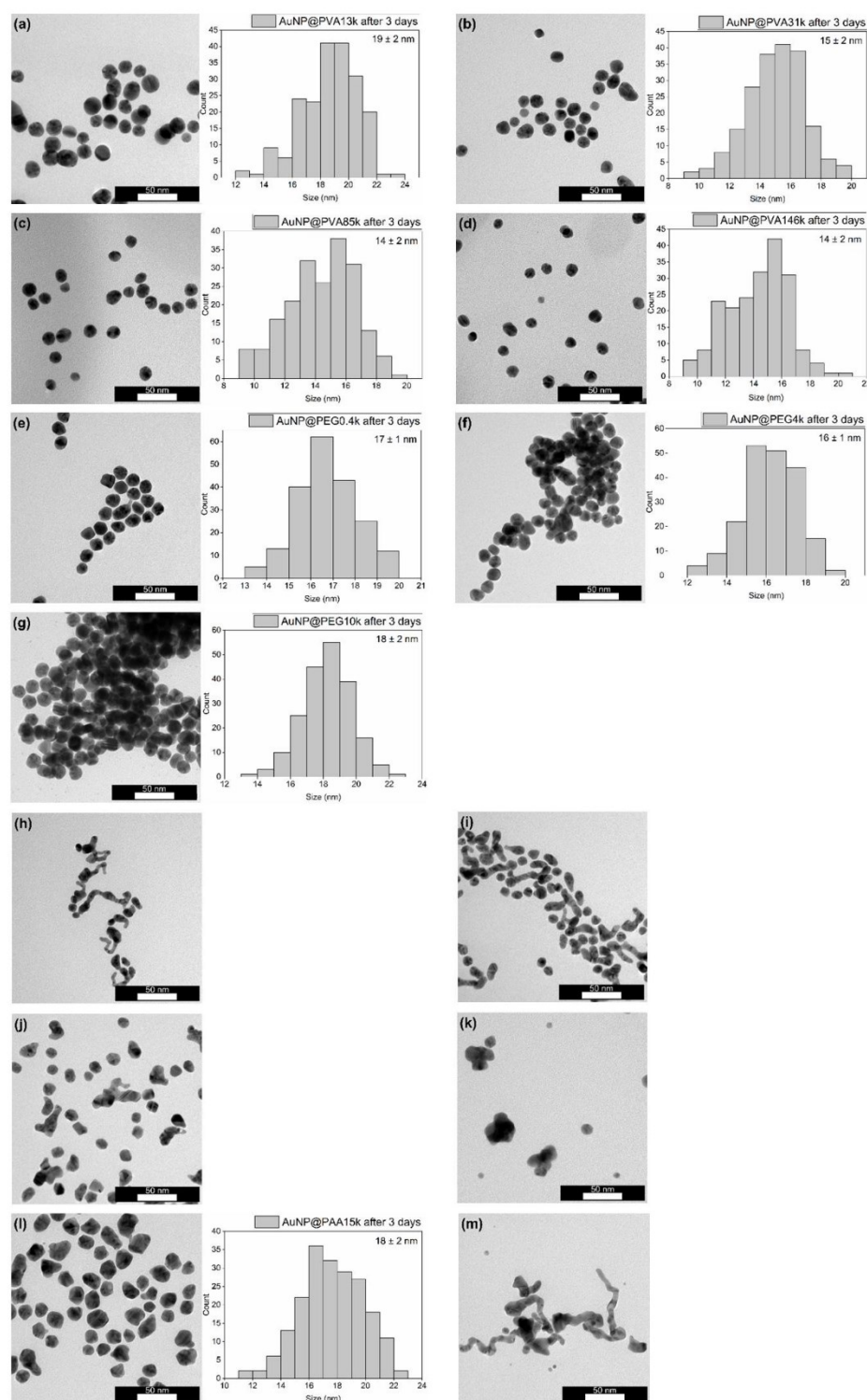


Figure S28. Representative TEM images and histograms (with the average size and its standard deviation given) of the one-pot synthesis after 3 days in ethanol of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k, (d) AuNP@PVA146k, (e) AuNP@PEG0.4k, (f) AuNP@PEG4k, (g) AuNP@PEG10k, (h) AuNP@PVP3.5k, (i) AuNP@PVP8k, (j) AuNP@PVP40k, (k) AuNP@PVP360k, (l) AuNP@PAA15k and (m) AuNP@PAA100k. For the histograms 200 particles were analyzed using larger areas of the TEM images. It was not possible to measure the remaining samples, as they do not have a spherical morphology, but rather elongated structures. For the average size and standard deviation, see Table S4.

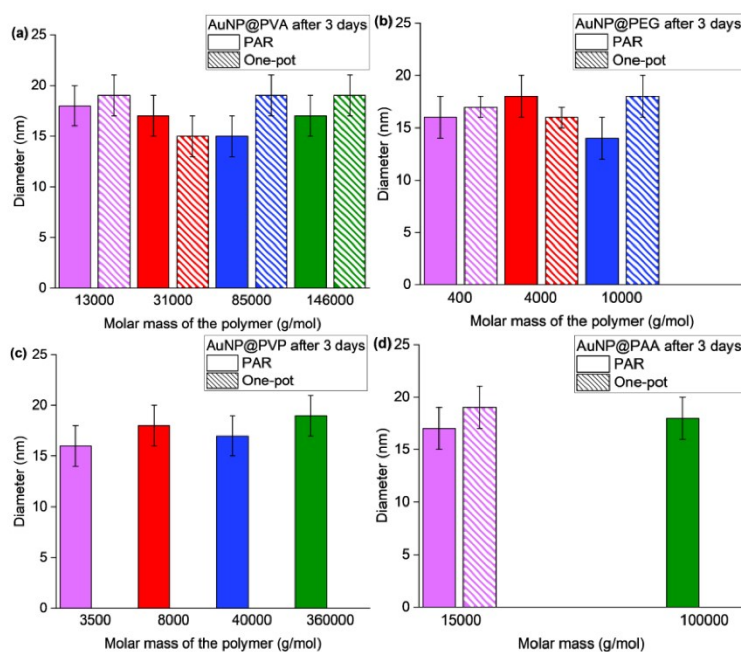


Figure S29. Graphical overview of the TEM size and their variance of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA after 3 days in ethanol (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot).

In general, all samples in the DLS in Figure S30 and S31-38 show an increase in D_h , indicating a decrease in the stability of the AuNPs with increasing residence time in ethanol.

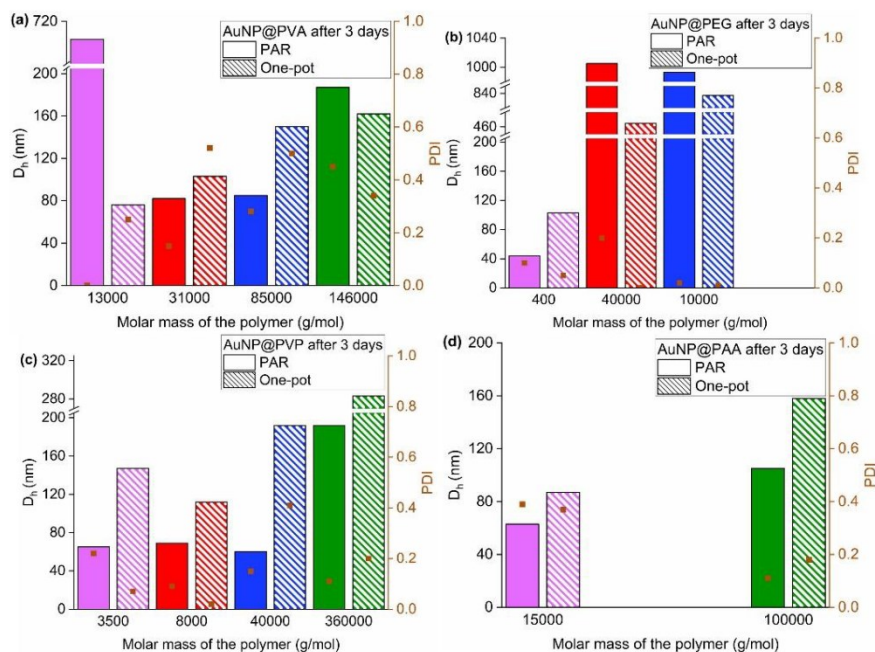


Figure S30. Graphical overview of all the DLS results of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA after 3 days in ethanol (fully colored bar PAR; hatched bar one-pot). The brown squares represent the PDI.

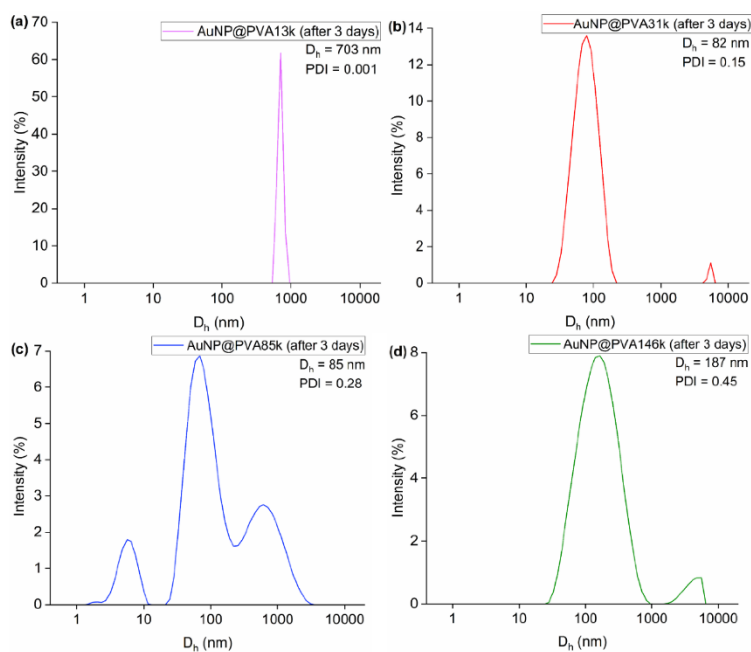


Figure S31. DLS measurements of the PAR after 3 days in ethanol with a D_h and PDI of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k and (d) AuNP@PVA146k.

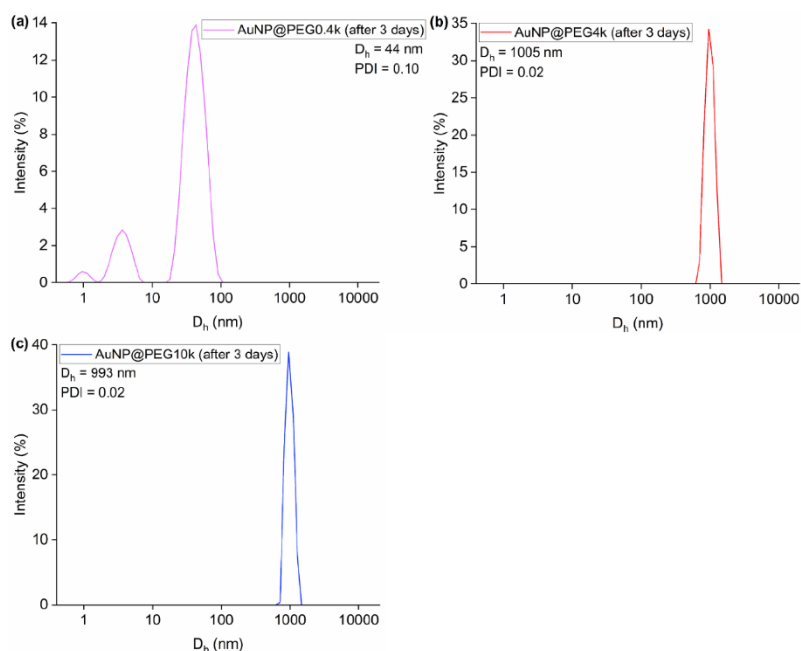


Figure S32. DLS measurements of the PAR after 3 days in ethanol with a D_h and PDI of (a) AuNP@PEG0.4k, (b) AuNP@PEG4k and (c) AuNP@PEG10k.

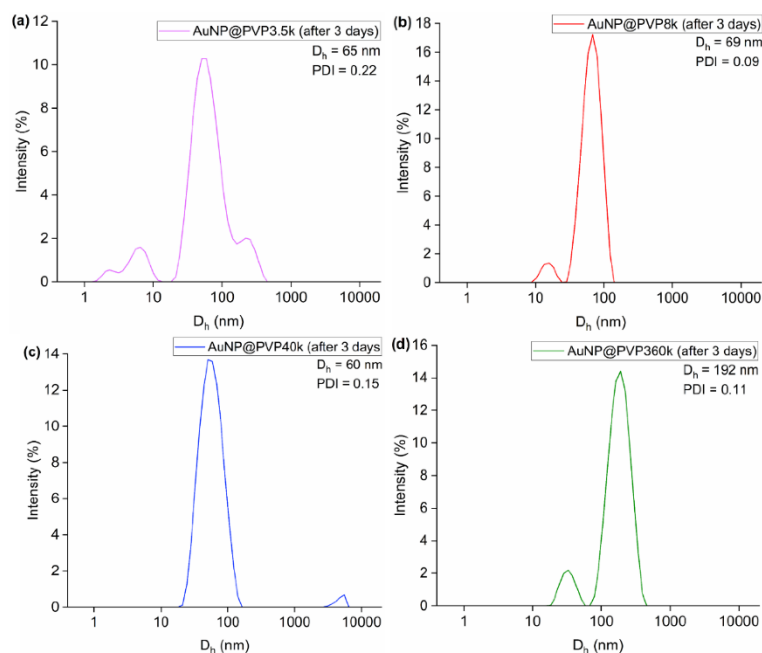


Figure S33. DLS measurements of the PAR after 3 days in ethanol with a D_h and PDI of (a) AuNP@PVP3.5k, (b) AuNP@PVP8k, (c) AuNP@PVP40k and (d) AuNP@PVP360k.

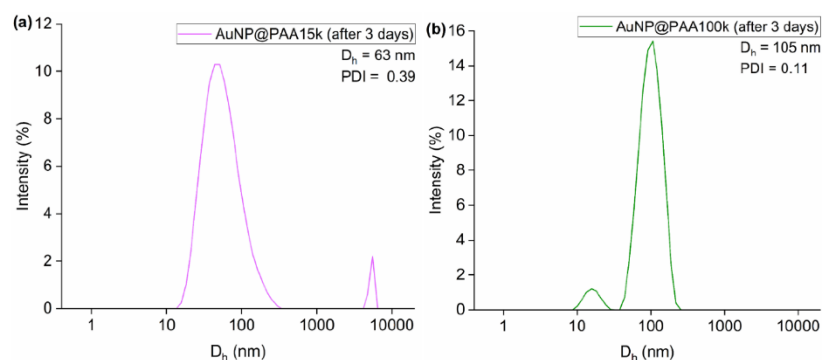


Figure S34. DLS measurements of the PAR after 3 days in ethanol with a D_h and PDI of (a) AuNP@PAA15k and (b) AuNP@PAA100k.

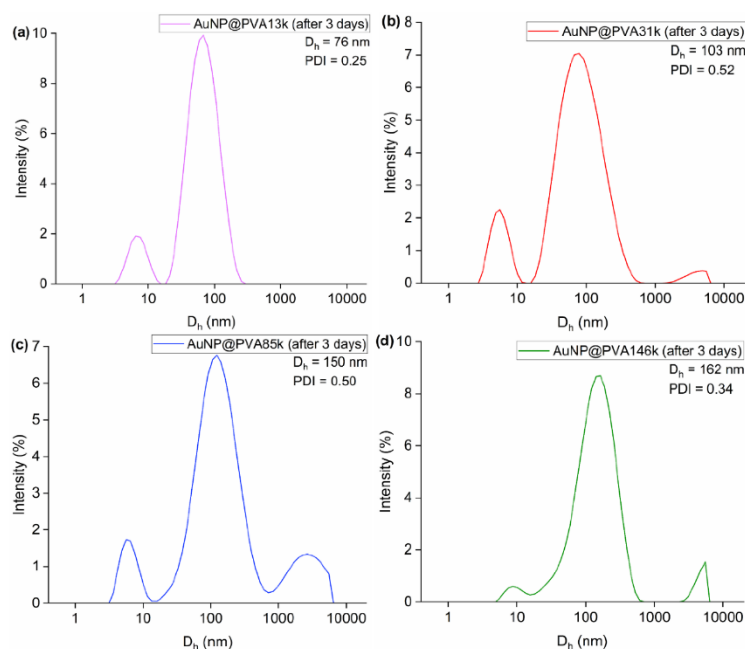


Figure S35. DLS measurements of the one-pot reaction **after 3 days in ethanol** with a D_h and PDI of (a) AuNP@PVA13k, (b) AuNP@PVA31k, (c) AuNP@PVA85k and (d) AuNP@PVA146k.

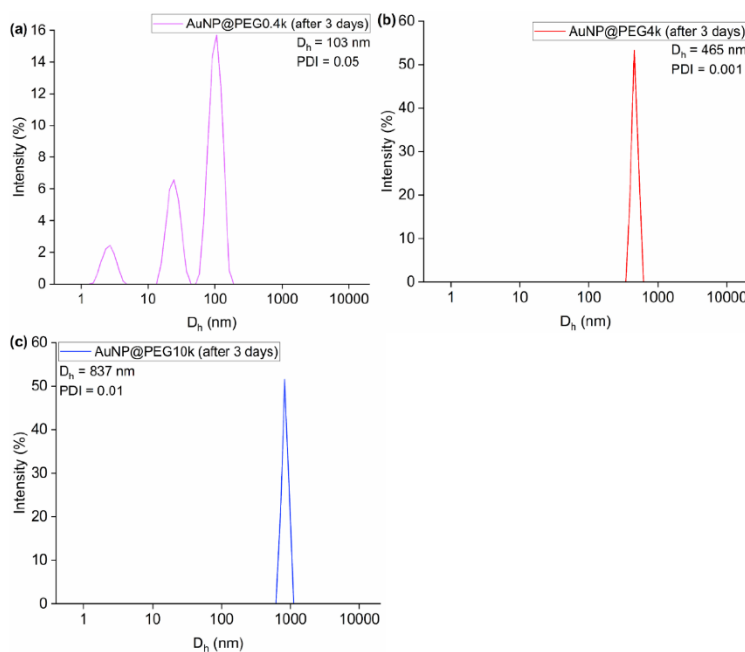


Figure S36. DLS measurements of the one-pot reaction **after 3 days in ethanol** with a D_h and PDI of (a) AuNP@PEG0.4k, (b) AuNP@PEG4k and (c) AuNP@PEG10k.

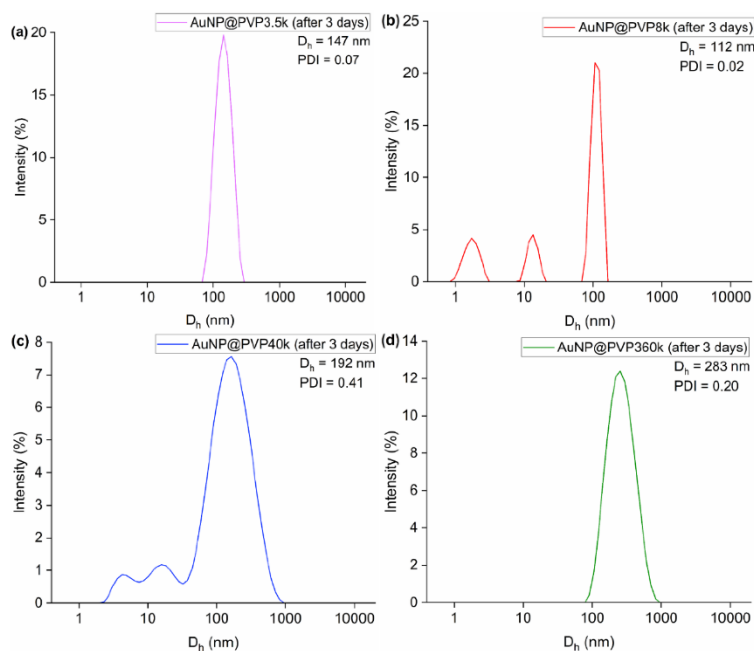


Figure S37. DLS measurements of the one-pot reaction **after 3 days in ethanol** with a D_h and PDI of (a) AuNP@PVP3.5k, (b) AuNP@PVP8k, (c) AuNP@PVP40k and (d) AuNP@PVP360k.

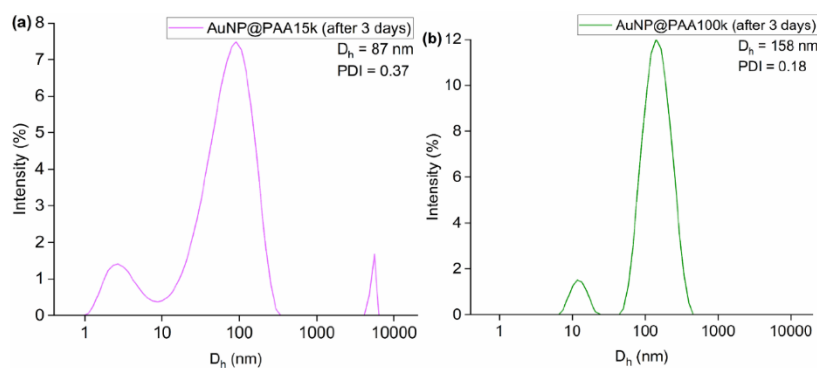


Figure S38. DLS measurements of the one-pot reaction **after 3 days in ethanol** with a D_h and PDI of (a) AuNP@PAA15k and (b) AuNP@PAA100k.

The UV-Vis spectra in Figure S39 and S40 show no significant shift after 3 days. Only AuNP@PEG4k, in PAR and one-pot, shows a clear red shift.

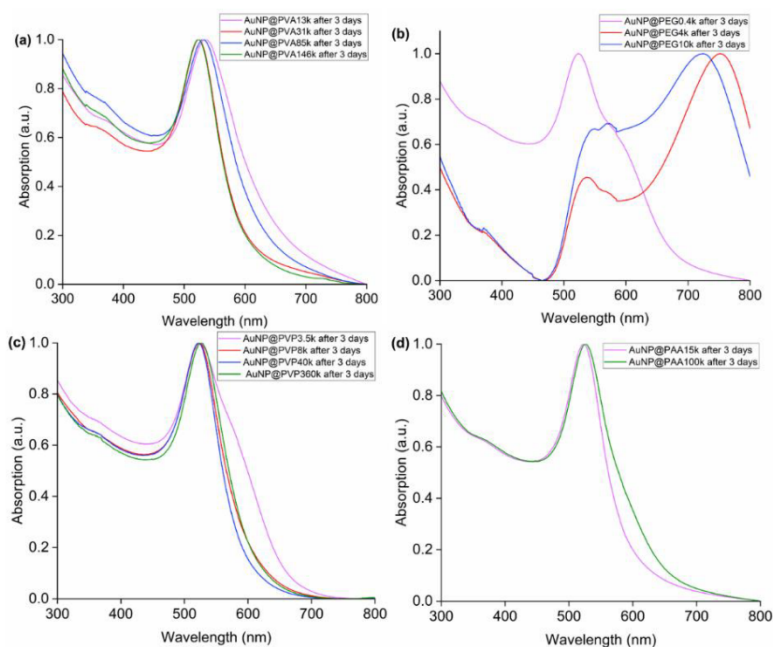


Figure S39. UV-Vis spectra after 3 days in ethanol from the PAR synthesis method of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. The absorption maxima are listed in Table S4.

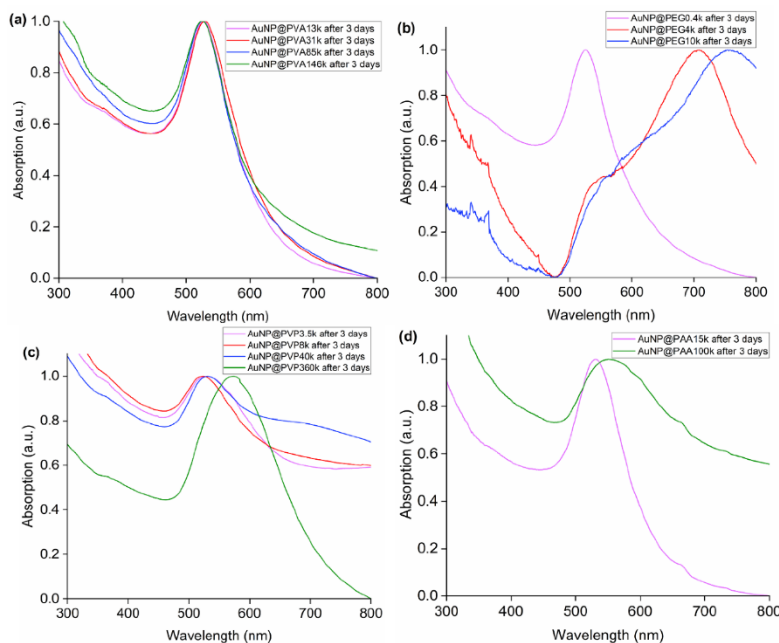
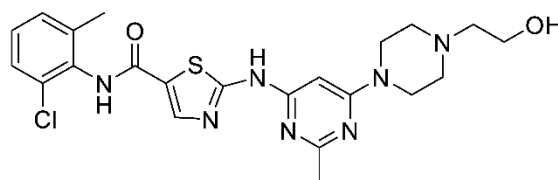


Figure S40. UV-Vis spectra after 3 days in ethanol from the one-pot synthesis method of (a) AuNP@PVA, (b) AuNP@PEG, (c) AuNP@PVP and (d) AuNP@PAA. The absorption maxima are listed in Table S4.

Section S3. Quantification of DASA loading

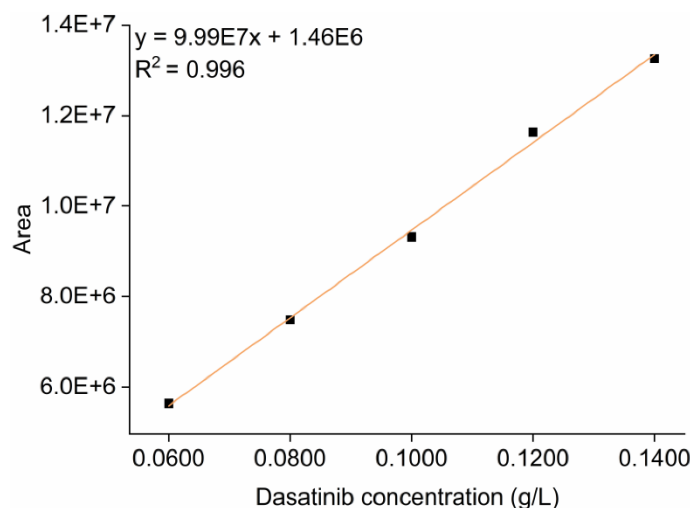
**Scheme S1.** Molecular structure of DASA.

To calculate the mass loading of DASA per mass of gold, the combined DASA and AuNP@Polymer dispersions (volume 5.8 mL) were centrifuged ($10,464 \times g$, 20 min, 4°C) after 72 h. The supernatants were removed with a pipette and stored in the refrigerator at 4°C until the HPLC measurement. From the HPLC measurement the remaining DASA concentration was determined with the calibration curve in Figure S25. From the difference to the starting concentration of DASA of 0.1379 g/L ($= 0.8 \text{ mg} / 5.8 \text{ mL}$) the mass which was adsorbed on the AuNP@Polymer conjugate was determined (Equation S1).

$$m_{\text{DASAadsorbed}} (\text{in } \mu\text{g}) = (C_{\text{DASAbefore}} - C_{\text{DASAafter}}) \times V = (C_{\text{DASAbefore}} - C_{\text{DASAafter}}) \times 5.8 \text{ mL} \quad (\text{S1})$$

The values for the different AuNP@Polymer loadings with DASA are listed in Table S5.

The calibration curve in Figure S25 was set up with mass concentrations of 0.0600; 0.0800; 0.1000; 0.1200 und 0.1400 g/L.

**Figure S41.** Calibration curve for the HPLC quantification of DASA.

For the mass of gold in 5 mL of solution a 100% conversion of KAuCl_4 (20 mg, containing the mass $m = 10.53 \text{ mg Au}$) to AuNP in 200 mL of water was assumed, from which 5 mL was centrifuged, the supernatant was removed with a pipette and the residue was resuspended in 5 mL ethanol for the DASA loading. The final 5 mL ethanol dispersion then contains the gold mass of $10.53 \text{ mg} \times 5/200 = m_{\text{Au}} = 0.26 \text{ mg}$.

The DASA mass loading was then obtained by dividing the adsorbed DASA mass through the mass of the gold $m_{\text{Au}} = 0.26 \text{ mg}$ in the 5 mL ethanol dispersion (Equation S2).

$$\text{DASALoading} (\text{in } \mu\text{g/mg}) = m_{\text{DASAadsorbed}} / m_{\text{Au}} = m_{\text{DASAadsorbed}} / 0.26 \text{ mg} \quad (\text{S2})$$

Table S5. DASA loading on the AuNP@Polymer conjugates.

Sample	CDASAafter (g/L)	mDASAadsorbed (μg)	DASAloading (μg/mg)
PAR Method			
AuNP@PVA13k	0.1343	21	81
AuNP@PVA31k	0.1366	8	31
AuNP@PVA85k	0.1369	6	23
AuNP@PVA146k	0.1360	11	42
AuNP@PEG0.4k	0.1296	48	185
AuNP@PEG4k	0.1255	72	277
AuNP@PEG10k	0.1297	48	185
AuNP@PVP3.5k	0.1240	81	312
AuNP@PVP8k	0.1339	23	88
AuNP@PVP40k	0.1366	8	31
AuNP@PVP360k	0.1300	46	177
AuNP@PAA15k	0.1263	67	258
AuNP@PAA100k	0.1291	51	196
One-pot Method			
AuNP@PVA13k	0.1345	20	77
AuNP@PVA31k	0.1344	20	77
AuNP@PVA85	0.1357	13	50
AuNP@PVA146k	0.1336	25	96
AuNP@PEG0.4k	0.1304	44	169
AuNP@PEG4k	0.1354	15	58
AuNP@PEG10k	0.1261	68	262
AuNP@PVP3.5k	0.1307	42	162
AuNP@PVP8k	0.1347	19	73
AuNP@PVP40k	0.1306	42	162
AuNP@PVP360k	0.1316	37	142
AuNP@PAA15k	0.1301	45	173
AuNP@PAA100k	0.1289	52	200

Section S4. In vitro drug sensitivity test results

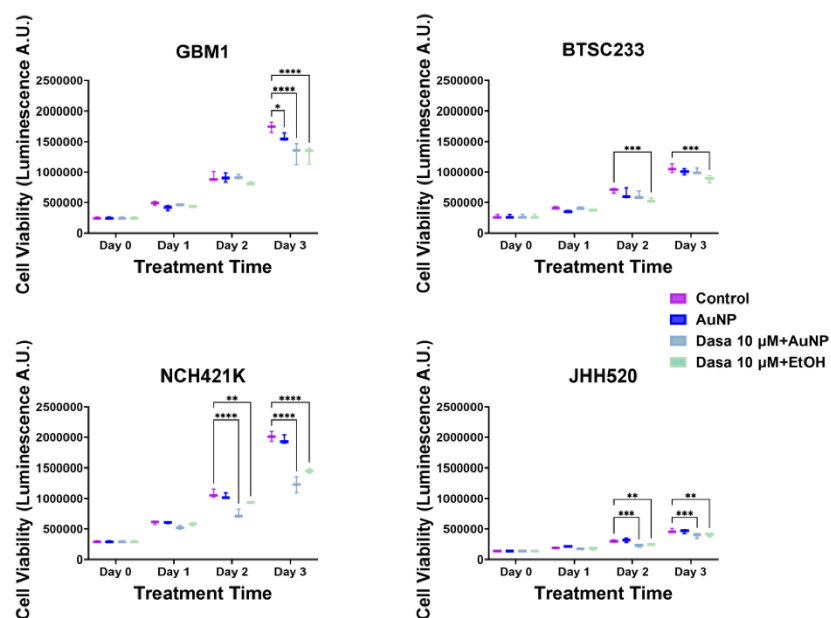


Figure S42. Effect of dasatinib and dasatinib-loaded AuNP@PVA31k on glioblastoma stem cell viability. GBM1, BTSC233, NCH421K and JHH520 cells were treated with AuNP@PVA31ks, dasatinib (DASA 10 μ M), DASA-loaded AuNP@PVA31k. Viability was assessed over 3 days using luminescence assays. Data represent mean $\pm$ SD; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Table S6. Short tandem repeat (STR) profiling of GSC models used in this study.

Marker	GBM1	BTSC233	NCH421K	JHH520
D3S1358	16, 17	14, 15	14, 16	14, 18
D13S317	8, 11	15	8, 11	12
D16S539	8, 13	13	10, 11	9, 13
D18S51	14, 15	15, 18	13	17
D2S1338	18, 19	17, 19	14, 28	17, 25
CSF1PO	11, 12	9, 11	10, 11	11
TH01	6, 7	8, 9	6	9, 10
VWA	16, 17	18, 19	17, 18	19
D21S11	29, 30.2	29, 30	30	29, 30
D7S820	10	8, 10	10, 12	10, 11
D5S818	10, 11	12, 14	11, 13	11
TPOX	8	8, 11	8, 11	8
D8S1179	12, 15	12, 16	12, 15	12, 13
D19S433	14	12, 14	14, 16	14
FGA	23	20, 15	21, 25	23, 25
AMEL	X, Y	X	X, Y	X

Section S5. References

1. Lee, M.-J.; Lin, T.-K. Density and Viscosity for Monoethanolamine + Water, + Ethanol, and + 2-Propanol. *J. Chem. Eng.* **1995**, *40*, 336-339, <https://doi.org/10.1021/je00017a074>.
2. Hoseini, B.; Jaafari, M.R.; Golabpour, A.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Karimi, M.; Eslami, S. Application of ensemble machine learning approach to assess the factors affecting size and polydispersity index of liposomal nanoparticles. *Sci. Rep.* **2023**, *13* (1), 18012, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43689-4>.
3. Antoniou, E.; Alexandridis, P. Polymer conformation in mixed aqueous-polar organic solvents. *Eur. Polym. J.* **2010**, *46* (2), 324-335, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2009.10.005>.
4. Liao, J.; Zhang, Y.; Yu, W.; Xu, L.; Ge, C.; Liu, J.; Gu, N. Linear aggregation of gold nanoparticles in ethanol. *Colloids Surf. A; Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *223* (1-3), 177-183, [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00156-0).
5. Hussain, M.H.; Abu Bakar, N.F.; Mustapa, A.N.; Low, K.-F.; Othman, N.H.; Adam, F. Synthesis of Various Size Gold Nanoparticles by Chemical Reduction Method with Different Solvent Polarity. *Nanoscale Res. Lett.* **2020**, *15*, 140 <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03370-5>.
6. Tsutsui, G.; Huang, S.; Shakaue H.; Shingubara, S.; Takahagi, T. Well-size-controlled Colloidal Nanoparticles Dispersed in Organic Solvents. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2001**, *40*, 346-349, <https://doi.org/10.1143/JJAP.40.346>.

3.3. Beiträge an weitere Veröffentlichungen

In diesem Kapitel werden alle bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Publikationen in der Rolle als Co-Autor vorgestellt. Hierfür wurden die Kurzzusammenfassungen übersetzt und der Eigenanteil an der jeweiligen Publikation gesondert hervorgehoben.

3.3.1. CD133-Functionalized Gold Nanoparticles as a Carrier Platform for Telaglenastat (CB839) against Tumor Stem Cells

Elham Poonakim, Ann-Christin Nickel, Mehdi Shafiee Ardestani, Lars Rademacher, Marilyn Kaul, Evgeny Apartsin, Sven G. Meuth, Ali Gorji, Christoph Janiak, Ulf Dietrich Kahlert

Int. J. Mol. Sci. **2022**, 23, 5479. DOI: 10.3390/ijms23105479

Kurzfassung:

Das Versagen einer lang anhaltenden kurativen therapeutischen Wirkung der derzeit angewendeten Chemotherapien gegen bösartige Krebserkrankungen wird vermutlich durch die Unwirksamkeit solcher Interventionen bei Krebsstammzellen (engl.: *Cancer stem cells*, CSC) verursacht. CD133/AC133 ist ein Zelloberflächenprotein, das nachweislich das Potenzial hat, CSC in verschiedenen Tumoren, einschließlich Hirntumoren, zu identifizieren. Darüber hinaus trägt eine Erhöhung der Zellstoffwechselrate von Glutamin und Glukose zur schnellen Zellproliferation einiger hochgradiger Malignome bei. Die Hemmung der Glutaminolyse durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren des Enzyms Glutaminase 1 (GLS1) kann eine wirksame Anti-CSC-Strategie sein. In dieser Studie wurde der klinisch erprobte GLS1-Inhibitor Telaglenastat (CB-839) in PEGylierte Goldnanopartikel geladen, die mit dem kovalent konjugierten CD133-Aptamer (Au-PEG-CD133-CB-839) ausgestattet waren, und in vitro einer Reihe von CD133-positiven Hirntumormodellen ausgesetzt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Au-PEG-CD133-CB-839 die Lebensfähigkeit von CD133-positiven Krebszellen in einer dosisabhängigen Weise signifikant verringerte, die höher war als die Wirkung der Behandlung der Zellen mit den einzelnen Komponenten des zusammengesetzten Nanomedikaments. Interessanterweise wurde die Behandlungswirkung bei Glioblastom-Stammzellen beobachtet, die verschiedene transkriptomische Subtypen der Erkrankung modellieren. Die vorgestellte Plattform bildet die Grundlage für die anschließende Charakterisierung der Zielspezifität und die In-vivo-Anwendung.

Anteile an der Publikation:

- Unterstützung bei der praktischen Durchführung experimenteller Arbeiten.

- Durchsicht und Korrektur des Manuskripts als Co-Autor.

3.3.2. Magnesium Hydroxide Nanoneedles Derived from Anthocleista schweinfurthii Gilg (Loganiaceae) Support Mesenchymal Stromal Cell Proliferation and Wound Healing

Francois Eya'ane Meva, Rita Pereira, Sandrine Elodie Ngnihamy, Armel Florian Tchangou Njiemou, Agnes Antoinette Ntomba, Jean Baptiste Houndou Fokou, Thi Hai Yen Beglau, Marcus N. A. Fetzer, Marilyn Kaul, Bianca Schlierf, Ulrich Armel Mintang Fongang, Phillipe Belle Ebanga Kedi, Simone Veronique Fannang, Marietta Herrmann, Christoph Janiak

J. Inorg. Organomet. Polym. **2025**. DOI: 10.1007/s10904-025-03833-1

Kurzfassung:

Diese Studie untersucht das Wundheilungs- und Knochenreparaturpotenzial von nanoskaligem Magnesiumhydroxid [$\text{nanoMg}(\text{OH})_2$], das aus den Blättern von *Anthocleista schweinfurthii* Gilg (Loganiaceae) gewonnen wird, einer in Afrika heimischen Pflanze, die traditionell zur Behandlung von Verletzungen verwendet wird. $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -AS-Nanonadeln wurden aus wässrigen Extrakten der Blätter von *Anthocleista schweinfurthii* Gilg (Loganiaceae) (AS) und Magnesiumnitrat synthetisiert. Die Verbindung wurde mittels UV-Vis, DLS, FTIR, PXRD, SEM-EDX und TEM untersucht. Die Sicherheit der topischen Anwendung wurde anhand eines akuten Hauttoxizitätstests an Tiermodellen untersucht. Es wurden In-vitro-Experimente zum entzündungshemmenden Potenzial und In-vivo-Wundheilungsversuche an Wistar-Ratten durchgeführt. Um die Auswirkungen von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -AS auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark (BM-MSCs) verwendet. Die $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Grenzfläche enthält sekundäre Metaboliten wie Polyphenole. Das Pulver-Röntgendiffraktogramm konnte mit dem $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Muster abgeglichen werden, und die Scherrer-Gleichung ergab Korngrößen von < 50 nm nach verschiedenen Temperaturbedingungen. Die Pulver bilden Aggregate, die C-, O- und Mg-Elemente enthalten. Es wurden Nadeln von 33 ± 9 nm Länge und 4 ± 2 nm Breite von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -AS abgebildet. $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -AS wurde als sicher für die topische Anwendung befunden. $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -AS hat entzündungshemmendes Potenzial und kann die Wundheilung verbessern. Im Gegensatz zu reinem $\text{Mg}(\text{OH})_2$ oder AS wurden die Lebensfähigkeit und Proliferation der Zellen durch $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -AS nicht beeinträchtigt. Die Zellmorphologie blieb nach Zugabe von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -AS zum Medium unverändert. Es wurde eine Verbesserung der osteogenen Differenzierung von BM-MSCs beobachtet. Diese Ergebnisse

motivieren zu weiteren Forschungen hinsichtlich der Einbeziehung des Materials, das sekundäre Pflanzenstoffe in Implantaten für die Knochenheilung fördert.

Anteile an der Publikation:

- Durchführung der DLS-Messungen.
- Durchsicht und Korrektur des Manuskripts als Co-Autor.

4. Zusammenfassung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Charakterisierung biokompatibler AuNP@Polymer-Konjugate in Wasser sowie deren Beladung mit einem Krebsmedikament in Ethanol, da das Krebsmedikament eine gute Löslichkeit in Ethanol besaß. Dabei wurde die Stabilität der unbeladenen als auch der beladenen AuNP@Polymer-Konjugate analysiert. Anschließend wurde die pharmakologische Wirksamkeit der beladenen Konjugate im Vergleich zu dem reinen Medikament mit Hilfe von in-vitro Zellversuchen untersucht.

Im ersten Forschungsschwerpunkt wurde mittels computergestützter Analysen von Genomdatensätze gezeigt, dass Src-Kinase-Signalwege eine wichtige Rolle für die Diagnose und das Fortschreiten von PDAC spielen und eine Dysregulation dieser Signalwege als Treiber der Tumorentstehung dienen. Die Untersuchung der Überlebensraten bestätigten, dass die Aktivierung des Src-Kinoms ein vielversprechendes therapeutisches Ziel darstellt. Außerdem wurde belegt, dass das Src-Familienmitglied BLK an der Entstehung von PDAC bei Diabetes Patienten beteiligt sein könnte. Trotz des Potenzials von Src-Inhibitoren zur Verbesserung der Standardchemotherapie blieben die Ergebnisse klinischer Studien mit dem Src-Inhibitor DASA bislang enttäuschend. Für die Überwindung der starken DASA-Resistenz gegenüber PDAC wurden goldnanopartikelbasierte Systeme für die Wirkstoffverabreichung entwickelt. DASA ist ein klinisch eingesetzter niedermolekularer Inhibitor der Src-Kinase-Familie, die eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung spielt. Es hemmt die Signalübertragung der Src-Tyrosinkinasen, wodurch das Wachstum und die Zellteilung der Krebszellen gestoppt werden können. Da die Wirkung von DASA bereits klinisch untersucht wurde, sollte die Anbindung an der AuNP-Oberfläche über nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen, um so eine Strukturveränderung und folglich eine Beeinträchtigung der Wirkung zu vermeiden. Die Hürde an der DASA-Anbindung ist die schlechte Wasserlöslichkeit und die geringe chemische Reaktivität von DASA. Aus den vorigen genannten Gründen wurde für die Herstellung und Stabilisierung der biokompatiblen Goldnanopartikel-Systeme das Polymer PVA eingesetzt. Mit Hilfe des Eintopfverfahrens wurden die AuNP@PVA in Wasser synthetisiert und für die anschließende Beladung des wasserunlöslichen Medikaments DASA wurden die AuNP@PVA in Ethanol dispergiert. Mit Hilfe von TEM konnte trotz des Lösungsmittelwechsels keine Agglomeration der AuNP festgestellt werden. Mit Hilfe von weiteren Analytikmethoden wie UV-Vis, IR und Zeta-Potenzial konnte qualitativ die Beladung des Medikaments gezeigt werden. Unter Verwendung der HPLC wurde die Beladungsmenge von DASA quantifiziert. Es konnten 2,7 DASA-Moleküle pro individuellem AuNP@PVA beladen werden. Für die Internalisierung der AuNP@PVA in die PDAC Zellen

wurden diese mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) funktionalisiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte nur eine geringe zelluläre Aufnahme der AuNP@PVA-FITC Partikeln festgestellt werden. Nach der Charakterisierung der AuNP@PVA-DASA Proben wurde die Wirkung dieses Systems an PDAC Krebszelllinien untersucht. Zusammenfassend konnte keine wesentliche verstärkte Wirksamkeit des Medikaments an den Goldnanopartikel-Systemen im Vergleich zum freien Medikament gezeigt werden. Die bioinformatischen Analysen bestätigen, dass das Src-Familienmitglied LYN eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie des PDAC spielt. LYN zeigte eine signifikante Assoziation mit Tumorgroße und Krankheitsstadium sowie eine erhöhte Expression im DASA-sensitiven Zellmodell COLO357. Frühere Studien stützen diese Befunde, die eine Überaktivierung von LYN in PDAC und seine Bedeutung als Überlebensfaktor und Resistenzmediator der Krebszellen feststellen. Ebenfalls unterstützen die untersuchten Zellliniendaten die Wichtigkeit von LYN bei PDAC weiter, da eine hohe mRNA-Expression von LYN die Sensitivität gegenüber DASA erhöhen könnte. Ergänzend wurde eine erhebliche Überregulierung des BLK in Tumoren von Diabetes-Patienten im Vergleich zu nicht Diabetikern beobachtet, die mit einer verkürzten Lebenszeit assoziiert ist. Zugleich wurden die Risikofaktoren der Src-Mitglieder hinsichtlich der Entwicklungsförderung von perineuraler Invasion (PNI) in Tumoren untersucht, um eine Basis für die Entwicklung des AuNP@PVA-DASA-Systems zu schaffen, welches gezielt auf dieses Protein ausgerichtet ist. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Src-Signalumgebung vermutlich keine Rolle in der durch PNI-vermittelten Biologie von PDAC spielt. Obwohl die Untersuchungen keine Unterschiede ergaben, deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Kandidaten LYN und BLK als potenzielle therapeutische Zielstruktur in der Pankreaskrankheit von Bedeutung sein können.

Zur Verbesserung der praktischen Anwendbarkeit lag der zweite Forschungsschwerpunkt stärker auf der Optimierung der kolloidalen Stabilität der AuNP-Arzneimittelträgersysteme sowohl in Wasser als auch in Ethanol. Folglich wurden erneut Polymere zur nichtkovalenten Bindung des Medikaments und zur Stabilisierung der AuNP eingesetzt. Neben PVA kamen PEG, PVP und PAA zum Einsatz, um den Einfluss verschiedener funktioneller Gruppen zu untersuchen und zu testen, welche Polymere die Anlagerung von DASA durch intermolekulare Kräfte begünstigen können. Zusätzlich zu den funktionellen Gruppen sollte der Einfluss der Kettenlänge des Polymers sowie die Synthesemethoden für die Herstellung der AuNP@Polymer-Konjugate untersucht werden. Dafür wurden die zuvor genannten Polymeren entsprechend mit unterschiedlichen Kettenlängen eingesetzt. Die Synthese der AuNP@Polymer-Konjugate erfolgte entweder mittels der Eintopfsynthese oder der PAR Methode. TEM zeigte, dass stabile Konjugate in Wasser mit Hilfe der PAR und der Eintopfmethode hergestellt werden konnte. Die

Goldkerngröße der in Wasser dispergierten Konjugate lagen zwischen 11 bis 18 nm und die in Ethanol dispergierten Konjugate wiesen eine Goldkerngröße von 11 bis 19 nm auf. Die DLS wies für die meisten Proben für beide Synthesemethoden und Lösungsmittel einen hydrodynamischen Durchmesser von 20 bis 70 nm auf. Abschließend zeigte sich, dass die Konjugate mit PVA sowohl in Wasser als auch in Ethanol die höchste Stabilität aufwiesen, hingegen die Konjugate mit PEG in Ethanol eine geringe Stabilität zeigten. Die Polymere PVP und PAA lieferten Resultate, die lösungsmittel- und molekulargewichtsabhängig sind. Mit PEG, PVP und PAA konnte DASA erfolgreich auf die AuNP-Konjugate beladen werden, jedoch nicht mit PVA. Die PAR Methode führt bei allen Polymeren zu sphärischen und stabilen AuNP, während die Eintopfsynthese teilweise anisotrope oder aggregierte AuNP produzierte.

5. Literaturverzeichnis

- [1] A. S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan, S. Seal, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2024–2040. DOI: 10.1002/ange.201002969.
- [2] O. Mařátková, J. Michailidu, A. Miřkovská, I. Kolouchová, J. Masák, A. Čejková, *Biotechnol. Adv.* **2022**, 58, 107905. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.107905.
- [3] S. Gharpure, A. Akash, B. Ankamwar, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, 20, 3303–3339. DOI: 10.1166/jnn.2020.17677.
- [4] S. Mourdikoudis, L. M. Liz-Marzán, *Chem. Mater.* **2013**, 25, 1465–1476. DOI: 10.1021/cm4000476.
- [5] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small* **2008**, 4, 26–49. DOI: 10.1002/smll.200700595.
- [6] D. R. Boverhof, C. M. Bramante, J. H. Butala, S. F. Clancy, M. Lafranconi, J. West, S. C. Gordon, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, 73, 137–150. DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.06.001.
- [7] R. R. Arvizo, S. Bhattacharyya, R. A. Kudgus, K. Giri, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2943–2970. DOI: 10.1039/C2CS15355F.
- [8] K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, B. Klajnert-Maculewicz, *Mol. Pharmaceutics* **2019**, 16, 1–23. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810.
- [9] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1857**, 147, 145–181. DOI: 10.1098/rstl.1857.0011.
- [10] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, M. K. Danquah, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, 9, 1050–1074. DOI: 10.3762/bjnano.9.98.
- [11] J. N. Sharma, D. K. Pattadar, B. P. Mainali, F. P. Zamborini, *Anal. Chem.* **2018**, 90, 9308–9314. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b01905.
- [12] D. K. Pattadar, J. N. Sharma, B. P. Mainali, F. P. Zamborini, *J. Phys. Chem. C* **2019**, 123, 24304–24312. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b06555.
- [13] K. Nejati, M. Dadashpour, T. Gharibi, H. Mellatyar, A. Akbarzadeh, *J. Clust. Sci.* **2022**, 33, 1–16. DOI: 10.1007/s10876-020-01955-9.
- [14] Z. Jiang, L. Li, H. Huang, W. He, W. Ming, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 14658. DOI: 10.3390/ijms232314658.
- [15] M. Azharuddin, G. H. Zhu, D. Das, E. Ozgur, L. Uzun, A. P. F. Turner, H. K. Patra, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 6964–6996. DOI: 10.1039/C9CC01741K.
- [16] J. Park, J. Joo, G. K. Soon, Y. Jang, T. Hyeon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4630–4660. DOI: 10.1002/anie.200603148.
- [17] H. Birol, C. R. Rambo, M. Guiotoku, D. Hotza, *RSC Advances* **2013**, 3, 2873. DOI: 10.1039/c2ra21810k.

- [18] B. García-Merino, E. Bringas, I. Ortiz, *Rev. Chem. Eng.* **2021**, 1–22. DOI: 10.1515/revce-2020-0072.
- [19] H. You, J. Fang, *Nano Today* **2016**, 11, 145–167. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.04.003.
- [20] Z. L. Wang, H. Ma, F. Wang, M. Li, L.-G. Zhang, X.-H. Xu, *Chinese Phys. Lett.* **2016**, 33, 107501. DOI 10.1088/0256-307X/33/10/107501.
- [21] A. A. Guda, M. V. Kirichkov, V. V. Shapovalov, A. I. Muravlev, D. M. Pashkov, S. A. Guda, A. P. Bagliy, S. A. Soldatov, S. V. Chapek, A. V. Soldatov, *J. Phys. Chem. C* **2023**, 127, 1097–1108. DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c06625.
- [22] V. K. Lamer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4847–4854. DOI: 10.1021/ja01167a001.
- [23] Y. Huang, J. E. Pemberton, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, 360, 175–183. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.02.031.
- [24] C. B. Whitehead, S. Özkar, R. G. Finke, *Chem. Mater.* **2019**, 31, 7116–7132. DOI: 10.1021/acs.chemmater.9b01273.
- [25] A. Ullrich, M. M. Rahman, A. Azhar, M. Kühn, M. Albrecht, *J. Nanopart. Res.* **2022**, 24, 183. DOI 10.1007/s11051-022-05554-9.
- [26] J. Song, D. Kim, D. Lee, *Langmuir* **2011**, 27, 13854–13860. DOI: 10.1021/la203113r.
- [27] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1402–1437. DOI: 10.1002/ange.200903053.
- [28] W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1900**, 34, 495–503. DOI: 10.1515/zpch-1900-3431.
- [29] T. W. Hansen, A. T. Delariva, S. R. Challa, A. K. Datye, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 1720–1730. DOI: 10.1021/ar3002427.
- [30] N. G. Bastús, J. Comenge, V. Puentes, *Langmuir* **2011**, 27, 11098–11105. DOI: 10.1021/la201938u.
- [31] P. Taylor, *Adv. Colloid. Interface Sci.* **1998**, 106, 261–285. DOI: 10.1016/s0001-8686(03)00113-1.
- [32] T. L. Moore, L. Rodriguez-Lorenzo, V. Hirsch, S. Balog, D. Urban, C. Jud, B. Rothen-Rutishauser, M. Lattuada, A. Petri-Fink, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 6287–6305. DOI: 10.1039/C4CS00487F.
- [33] S. Nazir, T. Hussain, A. Ayub, U. Rashid, A. J. MacRobert, *Nanomedicine* **2014**, 10, 19–34. DOI: 10.1016/j.nano.2013.07.001.
- [34] A. S. Thakor, J. Jokerst, C. Zavaleta, T. F. Massoud, S. S. Gambhir, *Nano Lett.* **2011**, 11, 4029–4036. DOI: 10.1021/nl202559p.
- [35] Ujfalussy, É. Koó, M. Seszták, P. Gergely, *Z Rheumatol.* **2003**, 62, 155–160. DOI: 10.1007/s00393-003-0458-2.

- [36] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75. DOI: 10.1039/DF9511100055.
- [37] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740–2779. DOI: 10.1039/C1CS15237H.
- [38] M. Roskamp, *Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln Zur Gezielten Wechselwirkung Mit Biomolekülen*, Dissertation, Freien Universität Berlin, Berlin, **2010**.
- [39] J. Fan, Y. Cheng, M. Sun, *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 1474–1504. DOI: 10.1002/tcr.202000087.
- [40] F. Amourizi, K. Dashtian, M. Ghaedi, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *230*, 118026. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118026.
- [41] A. K. Sharma, S. Shankhwar, M. S. Gaur, *J. Exp. Nanosci.* **2014**, *9*, 892–905. DOI: 10.1080/17458080.2012.736641.
- [42] M. Pelton, J. Aizpurua, G. Bryant, *Laser Photonics Rev.* **2008**, *2*, 136–159. DOI: 10.1002/lpor.200810003.
- [43] A. Sani, C. Cao, D. Cui, *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *10*, 100991. DOI: 10.1016/j.bbrep.2021.100991.
- [44] P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, B. Moudgil, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *123–126*, 471–485. DOI: 10.1016/j.cis.2006.05.026.
- [45] J. L. Montaño-Priede, M. Sanromán-Iglesias, N. Zabala, M. Grzelczak, J. Aizpurua, *ACS Sens.* **2023**, *8*, 1827–1834. DOI: 10.1021/acssensors.3c00287.
- [46] N. Li, P. Zhao, D. Astruc, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1784–1818. DOI: 10.1002/ange.201300441.
- [47] M. Shameer, K. V. Anand, J. B. M. Parambath, S. Columbus, H. Alawadhi, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2025**, *327*, 125412. DOI: 10.1016/j.saa.2024.125412.
- [48] R. Cheng, D. Jia, Z. Du, J.-X. Cheng, C. Yang, *RSC Adv.* **2023**, *13*, 27321–27332. DOI: 10.1039/D3RA04365G.
- [49] C. Kuttner, V. Piotto, L. M. Liz-Marzán, *Chem. Mat.* **2021**, *33*, 8904–8914. DOI: 10.1021/acs.chemmater.1c03223.
- [50] Á. I. López-Lorente, *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1168*, 338474. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338474.
- [51] K. Rhee, A. Tukova, M. T. Yarak, Y. Wang, *Nanoscale* **2023**, *15*, 2087–2095. DOI: 10.1039/D2NR05287C.
- [52] V. Piotto, L. Litti, M. Meneghetti, *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 4820–4826. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b10793
- [53] S. Yoo, D. H. Nam, T. I. Singh, G. Leem, S. Lee, *Nano Convergence* **2022**, *9*, 5. DOI: 10.1186/s40580-021-00296-1.
- [54] C. Radloff, N. J. Halas, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1323–1327. DOI: 10.1021/nl049597x.

- [55] B. Van De Broek, N. Devoogdt, A. D'Hollander, H.-L. Gijs, K. Jans, L. Lagae, S. Muyldermans, G. Maes, G. Borghs, *ACS Nano* **2011**, 5, 4319–4328. DOI: 10.1021/nn1023363.
- [56] J. You, R. Zhang, G. Zhang, M. Zhong, Y. Liu, C. S. Van Pelt, D. Liang, W. Wei, A. K. Sood, C. Li, *J. Control. Release* **2012**, 158, 319–328. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.028.
- [57] T.-H. Lin, C.-W. Lin, H.-H. Liu, J.-T. Sheu, W.-H. Hung, *Chem. Comm.* **2011**, 47, 2044–2046. DOI: 10.1039/C0CC03273E.
- [58] T. Huang, F. Meng, L. Qi, *Langmuir* **2010**, 26, 7582–7589. DOI: 10.1021/la904393n.
- [59] A. Tomar, G. Garg, *Glob. J. Pharmacol.* **2013**, 7, 34–38. DOI: 10.5829/idosi.gjp.2013.7.1.66173.
- [60] R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1289–1306. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.013.
- [61] X. Bai, Y. Wang, Z. Song, Y. Feng, Y. Chen, D. Zhang, L. Feng, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 2480. DOI: 10.3390/ijms21072480.
- [62] X.-Y. Liu, J.-Q. Wang, C. R. Jr. Ashby, L. Zeng, Y.-F. Fan, Z.-S. Chen, *Drug Discov. Today* **2021**, 26, 1284–1292. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.01.030.
- [63] N. Sarfraz, I. Khan, *Chem. Asian J.* **2021**, 16, 720–742. DOI: 10.1002/asia.202001202.
- [64] L. A. Dykman, N. G. Khlebtsov, *Chem. Sci.* **2017**, 8, 1719–1735. DOI: 10.1039/c6sc03631g.
- [65] H. Duman, E. Akdaşçi, F. Eker, M. Bechelany, S. Karav, *Nanomaterials* **2024**, 14, 1805. DOI: 10.3390/nano14221805.
- [66] M. T. Samani, S. M. Hashemianzadeh, *J. Mol. Graph. Model.* **2020**, 101, 107749. DOI: 10.1016/j.jmgm.2020.107749.
- [67] N. Kapil, F. Cardinale, T. Weissenberger, P. Trogadas, T. A. Nijhuis, M. M. Nigra, M.-O. Coppens, *Chem. Commun.* **2021**, 57, 10775–10778. DOI: 10.1039/d1cc04165g.
- [68] H. Mitomo, K. Ijio, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2021**, 94, 1300–1310. DOI: 10.1246/bcsj.20210031.
- [69] B. C. Lohman, J. A. Powell, S. Cingarapu, C. B. Aakeroy, A. Chakrabarti, K. J. Klabunde, B. M. Law, C. M. Sorensen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 6509–6513. DOI: 10.1039/C2CP40645D.
- [70] M. N. Martin, J. I. Basham, P. Chando, S.-K. Eah, *Langmuir* **2010**, 26, 7410–7417. DOI: 10.1021/la100591h.
- [71] Z.-J. Zhu, H. Wang, B. Yan, H. Zheng, Y. Jiang, O. R. Miranda, V. M. Rotello, B. Xing, R. W. Vachet, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46, 12391–12398. DOI: 10.1021/es301977w.
- [72] N. M. Schaeublin, L. K. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. M. Miller, J. Hutchison, J. J. Schlager, S. M. Hussain, *Nanoscale* **2011**, 3, 410–420. DOI: 10.1039/C0NR00478B.

- [73] R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 581. DOI: 10.1021/ed045p581.
- [74] F. Raji, Y. Peng, *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2025**, *345*, 103644. DOI: 10.1016/j.cis.2025.103644.
- [75] G. Moreno-Alcántar, P. Picchetti, A. Casini, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202218000. DOI: 10.1002/anie.202218000.
- [76] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1578–1586. DOI: 10.1021/ar7002804.
- [77] J. Xie, S. Lee, X. Chen, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 1064–1079. DOI: 10.1016/j.addr.2010.07.009.
- [78] M. I. Anik, N. Mahmud, A. Al Masud, M. Hasan, *Nano Select* **2021**, *3*, 792–828. DOI: 10.1002/nano.202100255.
- [79] P. Gierlich, A. I. Mata, C. Donohoe, R. M. M. Brito, M. O. Senge, L. C. Gomes-Da-Silva, *Molecules* **2020**, *25*, 5317. DOI: 10.3390/molecules25225317.
- [80] N. Kaur, P. Popli, N. Tiwary, R. Swami, *J. Control. Release* **2023**, *355*, 417–433. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.01.032.
- [81] P. Chowdhury, S. Chaki, A. Sen, S. Dasgupta, *J. Phys. Chem. B* **2025**, *129*, 1934–1945. DOI: 10.1021/acs.jpcc.4c07076.
- [82] M. M. Ghobashy, S. A. Alkhursani, H. A. Alqahtani, T. K. El-damhougy, M. Madani, *Mater. Sci. Eng. B* **2024**, *301*, 117191. DOI: 10.1016/j.mseb.2024.117191.
- [83] K. Kozics, M. Sramkova, K. Kopecka, P. Begerova, A. Manova, Z. Krivosikova, Z. Sevcikova, A. Liskova, E. Rollerova, T. Dubaj, V. Puntos, L. Wsolova, P. Simon, J. Tulinska, A. Gabelova, *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1702. DOI: 10.3390/nano11071702.
- [84] J. Su, H. Sun, Q. Meng, Q. Yin, S. Tang, P. Zhang, Y. Chen, Z. Zhang, H. Yu, Y. Li, *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 1243–1252. DOI: 10.1002/adfm.201504780.
- [85] H. Zhao, Z. Y. Lin, L. Yildirim, A. Dhinakar, X. Zhao, J. Wu, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 4060–4071. DOI: 10.1039/c6tb00308g.
- [86] S. Varma, S. Dey, D. Palanisamy, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2021**, *23*, 679–706. DOI: 10.2174/1389201022666210714145356.
- [87] H. Zhang, L. Zhou, Z. Zhu, C. Yang, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 9886–9900. DOI: 10.1002/chem.201503543.
- [88] A. C. Dudley, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006536. DOI: 10.1101/cshperspect.a006536.
- [89] P. F. Jiao, H. Y. Zhou, L. X. Chen, B. Yan, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2086–2102. DOI: 10.2174/092986711795656199.
- [90] Y. Yang, X. Zheng, L. Chen, X. Gong, H. Yang, X. Duan, Y. Zhu, *Int. J. Nanomedicine* **2022**, *17*, 2041–2067. DOI: 10.2147/IJN.S355142.

- [91] R. Bazak, M. Hour, S. El Achy, S. Kamel, T. Refaat, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2015**, *141*, 769–784. DOI: 10.1007/s00432-014-1767-3.
- [92] C. H. J. Choi, C. A. Alabi, P. Webster, M. E. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2010**, *107*, 1235–1240. DOI: 10.1073/pnas.0914140107.
- [93] D. P. O’Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne, J. L. West, *Cancer Lett.* **2004**, *209*, 171–176. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.02.004.
- [94] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *J. Control. Release* **2010**, *145*, 182–195. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.036.
- [95] I. Canton, G. Battaglia, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2718–2739. DOI: 10.1039/C2CS15309B.
- [96] M. Kus-liśkiewicz, P. Fickers, I. Ben Tahar, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10952. DOI: 10.3390/ijms222010952.
- [97] Y. Yu, T. Yang, T. Sun, *Nanomedicine (Lond).* **2020**, *15*, 1127–1145. DOI: 10.2217/nnm-2019-0395.
- [98] Y.-S. Chen, Y.-C. Hung, I. Liao, G. S. Huang, *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 858–864. DOI: 10.1007/s11671-009-9334-6.
- [99] B. Xu, X. Xiang, L. Ding, Z. Luo, J. Zhao, J. Huang, H. Li, X. Jiang, *IEEE Sens. J.* **2023**, *23*, 6832–6839. DOI: 10.1109/JSEN.2022.3225086.
- [100] Y. Li, J. Wang, Y. Li, Z. Luo, T. Peng, T. Zou, *Regen. Biomat.* **2024**, *11*. DOI: 10.1093/rb/rbae126.
- [101] Y. Chen, S. Liu, Y. Liao, H. Yang, Z. Chen, Y. Hu, S. Fu, J. Wu, *Int. J. Nanomedicine* **2023**, *18*, 1949–1964. DOI: 10.2147/IJN.S398254.
- [102] N. Zhang, G. Xiong, Z. Liu, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, rbae126. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1001572.
- [103] S. Siddique, J. C. L. Chow, *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 3824. DOI: 10.3390/app10113824.
- [104] S. Zhu, X. Jiang, M. D. Boudreau, G. Feng, Y. Miao, S. Dong, H. Wu, M. Zeng, J.-J. Yin, *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 86. DOI: 10.1186/s12951-018-0415-5.
- [105] M. Bednarski, M. Dudek, J. Knutelska, L. Nowiński, J. Sapa, M. Zygmunt, G. Nowak, M. Luty-Błocho, M. Wojnicki, K. Fitzner, M. Tęsiorowski, *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 405–409. DOI: 10.1016/j.pharep.2014.10.019.
- [106] P. Talarska, M. Boruczkowski, J. Żurawski, *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2454. DOI: 10.3390/nano11092454.
- [107] K. P. Steckiewicz, E. Barcinska, A. Malankowska, A. Zauszkiewicz-Pawlak, G. Nowaczyk, A. Zaleska-Medynska, I. Inkielewicz-Stepniak, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, 22. DOI: 10.1007/s10856-019-6221-2.

- [108] E. N. Zare, X. Zheng, P. Makvandi, H. Gheybi, R. Sartorius, C. K. Y. Yiu, M. Adeli, A. Wu, A. Zarrabi, R. S. Varma, F. R. Tay, *Small* **2021**, *17*, 2007073. DOI: 10.1002/sml.202007073.
- [109] J. A. Zamora-Justo, P. Abrica-González, G. R. Vázquez-Martínez, A. Muñoz-Diosdado, J. A. Balderas-López, M. Ibáñez-Hernández, *J. Nanomater.* **2019**, *2019*, 982047. DOI: 10.1155/2019/5982047.
- [110] Z. X. Chong, S. K. Yeap, W. Y. Ho, *PeerJ.* **2021**, e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- [111] X. Zhang, X. Guo, X. Kang, H. Yang, W. Guo, L. Guan, H. Wu, L. Du, *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33*, 1195–1205. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00368.
- [112] P. Chandran, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere, *Nanotoxicology* **2017**, *11*, 507–519. DOI: 10.1080/17435390.2017.1314036.
- [113] C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 897–900. DOI: 10.1021/bc049951i.
- [114] A. Roshanzadeh, S. Park, S. E. Ganjbakhsh, J. Park, D.-H. Lee, S. Lee, E.-S. Kim, *Nano Lett.* **2020**, *20*, 7168–7176. DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c02463.
- [115] C. Carnovale, G. Bryant, R. Shukla, V. Bansal, *ACS Omega* **2019**, *4*, 242–256. DOI: 10.1021/acsomega.8b03227.
- [116] M. Hosny, A. S. Eltaweil, M. Mostafa, Y. A. El-Badry, E. E. Hussein, A. M. Omer, M. Fawzy, *ACS Omega* **2022**, *7*, 3121–3133. DOI: 10.1021/acsomega.1c06714.
- [117] S. Srijampa, S. Buddhisa, S. Ngernpimai, C. Leelayuwat, S. Proungvitaya, A. Chompoosor, P. Tippayawat, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 1133–1143. DOI: 10.1021/acs.bioconjugchem.9b00847.
- [118] Y. Iqbal, S. Asghar, R. Hanif, F. Amin, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2025**, *721*, 137170. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2025.137170.
- [119] C. E. A. Botteon, L. B. Silva, G. V. Ccana-Ccapatinta, T. S. Silva, S. R. Ambrosio, R. C. S. Veneziani, J. K. Bastos, P. D. Marcato, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1974. DOI: 10.1038/s41598-021-81281-w.
- [120] M. M. Garrigós, F. A. de Oliveira, C. J. S. Costa, L. R. Rodrigues, M. P. Nucci, A. de H. Alves, J. B. Mamani, G. N. de A. Rego, J. M. Munoz, L. F. Gamarra, *Einstein (Sao Paulo)* **2024**, *22*, eAO0764. DOI: 10.31744/einstein_journal/2024AO0764.
- [121] M. Enea, E. Pereira, M. P. de Almeida, A. M. Araújo, M. de L. Bastos, H. Carmo, *Nanomaterials* **2020**, *10*, 995. DOI: 10.3390/nano10050995.
- [122] Y. Ding, Z. Sun, Z. Tong, S. Zhang, J. Min, Q. Xu, L. Zhou, Z. Mao, H. Xia, W. Wang, *Theranostics* **2020**, *10*, 5195–5208. DOI: 10.7150/thno.45017.
- [123] A.-L. Bailly, F. Correard, A. Popov, G. Tselikov, F. Chaspoul, R. Appay, A. Al-Kattan, A. V. Kabashin, D. Braguer, M.-A. Esteve, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12890. DOI: 10.1038/s41598-019-48748-3.

- [124] C. B. Jha, C. Singh, J. K. Randhawa, A. Kaul, R. Varshney, S. Singh, A. Kaushik, K. Manna, R. Mathur, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2024**, *241*, 114050. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2024.114050.
- [125] V. C. Thipe, A. R. Karikachery, P. Çakıl kaya, U. Farooq, H. H. Genedy, N. Kaeokhamloed, D. H. Phan, R. Rezwan, G. Tezcan, E. Roger, K. V. Katti, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *70*, 103256. DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103256.
- [126] X. Ma, H. Xiong, J. Guo, Z. Liu, Y. Han, M. Liu, Y. Guo, M. Wang, H. Zhong, Z. Guo, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **2023**, *16*, 1–13. DOI: 10.1142/S1793545822440011.
- [127] H. Xiong, Z. Guo, H. Zhong, Y. Ji, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **2016**, *9*, 1650026. DOI: 10.1142/S1793545816500267.
- [128] P. Famta, M. Famta, J. Kaur, R. Khursheed, A. Kaur, G. L. Khatik, D. M. Pawde, S. N. R. Rahman, T. Shunmugaperumal, *AAPD PharmSciTech.* **2020**, *21*, 95. DOI: 10.1208/s12249-020-1636-0.
- [129] S. Nooranian, A. Mohammadinejad, T. Mohajeri, G. Aleyaghoob, R. K. Oskuee, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2022**, *69*, 1517–1534. DOI: 10.1002/bab.2224.
- [130] M. S. de Almeida, E. Susnik, B. Drasler, P. Taladriz-Blanco, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5397–5434. DOI: 10.1039/d0cs01127d.
- [131] V. T. Cong, J. L. Houng, M. Kavallaris, X. Chen, R. D. Tilley, J. J. Gooding, *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 7531–7559. DOI: 10.1039/d1cs00707f.
- [132] J. P. M. Almeida, A. L. Chen, A. Foster, R. Drezek, *Nanomedicine (Lond).* **2011**, *6*, 815–835. DOI: 10.2217/nnm.11.79.
- [133] T. Sun, Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, Y. Xia, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12520–12568. DOI: 10.1002/ange.201403036.
- [134] T. Liu, C. Guo, S. Xu, G. Hu, L. Wang, *Adv. Healthc. Mater.* **2023**, *12*, e2300883. DOI: 10.1002/adhm.202300883.
- [135] W. Li, Z. Cao, R. Liu, L. Liu, H. Li, X. Li, Y. Chen, C. Lu, Y. Liu, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 4222–4233. DOI: 10.1080/21691401.2019.1687501.
- [136] J. B. Vines, J.-H. Yoon, N.-E. Ryu, D.-J. Lim, H. Park, *Front. Chem.* **2019**, *7*, 167. DOI: 10.3389/fchem.2019.00167.
- [137] N. L. Oleinick, R. L. Morris, I. Belichenko, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 1–21. DOI: 10.1039/b108586g.
- [138] S. Bhattacharyya, R. A. Kudgus, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 237–259. DOI: 10.1007/s11095-010-0318-0.
- [139] Y. Cheng, A. C. Samia, J. Li, M. E. Kenney, A. Resnick, C. Burda, *Langmuir* **2010**, *26*, 2248–2255. DOI: 10.1021/la902390d.
- [140] K. Mortezaee, A. Narmani, M. Salehi, H. Bagheri, B. Farhood, H. Haghi-Aminjan, M. Najafi, *Life Sci.* **2021**, *269*, 119020. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119020

- [141] J. K. Kang, J. C. Kim, Y. Shin, S. M. Han, W. R. Won, J. Her, J. Y. Park, K. T. Oh, *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 46–57. DOI: 10.1007/s12272-020-01206-5.
- [142] P. E. Costantini, M. Di Giosia, L. Ulfo, A. Petrosino, R. Saporetti, C. Fimognari, P. P. Pompa, A. Danielli, E. Turrini, L. Boselli, M. Calvaresi, *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1608. DOI: 10.3390/nano11061608.
- [143] X. Sun, L. Xing, C. Clifton Ling, G. C. Li, *Int. J. Hyperthermia* **2010**, *26*, 224–231. DOI: 10.3109/02656730903479855.
- [144] S. C. Freitas, D. Sanderson, S. Caspani, R. Magalhães, B. Cortés-Llanos, A. Granja, S. Reis, J. H. Belo, J. Azevedo, M. V. Gómez-Gavero, C. T. de Sousa, *Cancers* **2023**, *15*, 383. DOI: 10.3390/cancers15020383.
- [145] M. A. Sirotkina, V. V. Elagin, M. V. Shirmanova, M. L. Bugrova, L. B. Snopova, V. A. Kamensky, V. A. Nadtochenko, N. N. Denisov, E. V. Zagaynova, *J. Biophotonics* **2010**, *3*, 718–727. DOI: 10.1002/jbio.201000061.
- [146] J. Kadkhoda, A. Aghanejad, B. Safari, J. Barar, S. H. Rasta, S. Davaran, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *67*, 102954. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102954.
- [147] N. Gupta, R. Malviya, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2021**, *1875*, 188532. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188532.
- [148] S. N. Turkmen Koc, S. Rezaei Benam, I. P. Aral, R. Shahbazi, K. Ulubayram, *Int. J. Pharm.* **2024**, *655*, 124057. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.124057.
- [149] S. K. Mishra, A. C. Dhadve, A. Mal, B. P. K. Reddy, A. Hole, M. K. Chilakapati, P. Ray, R. Srivastava, A. De, *Biomater. Adv.* **2022**, *143*, 213153. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.213153.
- [150] J.-Y. Kim, W. Il Choi, M. Kim, G. Tae, *J. Control. Release* **2013**, *171*, 113–121. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.07.006.
- [151] Q. Chen, S. He, F. Zhang, F. Cui, J. Liu, M. Wang, D. Wang, Z. Jin, C. Li, *Sci. China Mater.* **2021**, *64*, 510–530. DOI: 10.1007/s40843-020-1431-5.
- [152] M. Ma, X. Liu, L. Tan, Z. Cui, X. Yang, Y. Liang, Z. Li, Y. Zheng, K. W. K. Yeung, S. Wu, *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 1437–1447. DOI: 10.1039/C8BM01539B.
- [153] M. Overchuk, R. A. Weersink, B. C. Wilson, G. Zheng, *ACS Nano* **2023**, *17*, 7979–8003. DOI: 10.1021/acsnano.3c00891.
- [154] B. Du, C. Ma, G. Ding, X. Han, D. Li, E. Wang, J. Wang, *Small* **2017**, *13*, 1603275. DOI: 10.1002/smll.201603275.
- [155] N. Yusoff, A. Pandikumar, R. Ramaraj, H. N. Lim, N. M. Huang, *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 2091–2114. DOI: 10.1007/s00604-015-1609-2.
- [156] A. Rai, S. Seena, T. Gagliardi, P. J. Palma, *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2023**, *318*, 102951. DOI: 10.1016/j.cis.2023.102951.
- [157] J. Sun, Y. Lu, L. He, J. Pang, F. Yang, Y. Liu, *Trends Anal. Chem.* **2020**, *122*, 115754. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115754.

- [158] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Nanomedicine (Lond)*. **2007**, 2, 681–693. DOI: 10.2217/17435889.2.5.681.
- [159] P. M. Tiwari, K. Vig, V. A. Dennis, S. R. Singh, *Nanomaterials* **2011**, 1, 31–63. DOI: 10.3390/nano1010031.
- [160] J. Tai, S. Fan, S. Ding, L. Ren, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, 10, 877193. DOI: 10.3389/fbioe.2022.877193.
- [161] F. Wang, Y. Duan, Y. Zhang, Y. Du, Y. Zheng, J. Shi, X. Tong, W. Peng, C. Zhou, *Microchem. J.* **2024**, 204, 111131. DOI: 10.1016/j.microc.2024.111131.
- [162] C. Ran, J.-L. Zhang, X. He, C. Luo, Q. Zhang, Y. Shen, L. Yin, *Talanta* **2025**, 282, 126936. DOI: 10.1016/j.talanta.2024.126936.
- [163] Q. Gao, J. Zhang, J. Gao, Z. Zhang, H. Zhu, D. Wang, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, 13, 647905. DOI: 10.3389/fbioe.2021.647905.
- [164] P.-O. Frappart, T. G. Hofmann, *Cancers (Basel)* **2020**, 12, 2750. DOI: 10.3390/cancers12102750.
- [165] E. Espinet, L. Klein, E. Puré, S. K. Singh, *Trends Cancer* **2022**, 8, 1060–1071. DOI: 10.1016/j.trecan.2022.08.005.
- [166] P. Michl, M. Löhr, J. P. Neoptolemos, G. Capurso, V. Rebours, N. Malats, M. Ollivier, L. Ricciardiello, *United Eu. Gastroenterol J.* **2021**, 9, 860–871. DOI: 10.1002/ueg2.12123.
- [167] Y. Li, Z. Zhao, C.-Y. Lin, Y. Liu, K. F. Staveley-OCarroll, G. Li, K. Cheng, *Theranostics* **2021**, 11, 2182–2200. DOI: 10.7150/thno.53102.
- [168] M. D. Amatangelo, D. E. Bassi, A. J. Klein-Szanto, E. Cukierman, *Am. J. Pathol.* **2005**, 167, 475–488. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62991-4.
- [169] L. Galluzzi, L. Zitvogel, G. Kroemer, *Cancer Immunol. Res.* **2016**, 4, 895–902. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0197.
- [170] M. S. Ahluwalia, J. de Groot, W. M. Liu, C. L. Gladson, *Cancer Lett.* **2010**, 298, 139–149. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.08.014.
- [171] C. Cirotti, C. Contadini, D. Barilà, *Cancers (Basel)* **2020**, 12, 1558. DOI: 10.3390/cancers12061558.
- [172] S. Ruan, W. Xiao, C. Hu, H. Zhang, J. Rao, S. Wang, X. Wang, Q. He, H. Gao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 20348–20360. DOI: 10.1021/acsami.7b02303.
- [173] H. S. Kim, M. Seo, T.-E. Park, D. Y. Lee, *J. Nanobiotechnol.* **2022**, 20, 14. DOI: 10.1186/s12951-021-01220-9.
- [174] K. Panchal, R. K. Sahoo, U. Gupta, A. Chaurasiya, *Int. Immunopharmacol.* **2021**, 95, 107508. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107508.
- [175] M. S. Ahluwalia, J. de Groot, W. M. Liu, C. L. Gladson, *Cancer Lett.* **2010**, 298, 139–149. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.08.014.

- [176] E. Eskilsson, G. V. Rosland, K. M. Talasila, S. Knappskog, O. Keunen, A. Sottoriva, S. Foerster, G. Solecki, T. Taxt, R. Jirik, S. Fritah, P. N. Harter, K. Valk, J. Al Hossain, J. V. Joseph, R. Jahedi, H. S. Saed, S. G. Piccirillo, I. Spiteri, P. Euskirchen, G. Graziani, T. Daubon, M. Lund-Johansen, P.  . Enger, F. Winkler, C. A. Ritter, S. P. Niclou, C. Watts, R. Bjerkvig, H. Miletic, *Neuro-Oncol.* **2016**, *18*, 1644–1655. DOI: 10.1093/neuonc/now113.
- [177] S. Parrasia, M. Zoratti, I. Szab , L. Biasutto, *Cell. Physiol. Biochem.* **2020**, *55*, 61–90. DOI: 10.33594/000000326.
- [178] Z. Nozhat, S. Heydarzadeh, M. Shahriari-Khalaji, S. Wang, M. Z. Iqbal, X. Kong, *Biomater. Sci.* **2023**, *11*, 4049–4131. DOI: 10.1039/d2bm01996e.
- [179] A. R. Poh, M. Ernst, *Oncogene* **2023**, *42*, 1786–1801. DOI: 10.1038/s41388-023-02701-x.
- [180] S. Alcal , V. Mayoral-Varo, L. Ruiz-Ca as, J. C. López-Gil, C. Heeschen, J. Martín-Pérez, Jr. B. Sainz, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–22. DOI: 10.3390/ijms21207437.
- [181] J. F. Creeden, K. Alganem, A. S. Imami, F. C. Brunicardi, S.-H. Liu, R. Shukla, T. Tomar, F. Naji, R. E. McCullumsmith, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–39. DOI: 10.3390/ijms21228679
- [182] F. Torrisi, L. Minafra, F. P. Cammarata, G. Savoca, M. Calvaruso, N. Vicario, L. Maccari, E. A. Pérès, H.  z elik, M. Bernaudin, L. Botta, G. Russo, R. Parenti, S. Valable, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3917. DOI: 10.3390/ijms21113917.
- [183] G. Kim, Y. T. Ko, *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 385–394. DOI: 10.1007/s12272-020-01232-3.
- [184] Z. Du, C. M. Lovly, *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 58. DOI: 10.1186/s12943-018-0782-4.
- [185] E. Ingley, *Cell Commun. Sig.* **2012**, *10*, 21. DOI: 10.1186/1478-811X-10-21.
- [186] V. Smidova, P. Michalek, Z. Goliasova, T. Eckschlager, P. Hodek, V. Adam, Z. Heger, *Theranostics* **2021**, *11*, 1546–1567. DOI: 10.7150/thno.48662.
- [187] C. Tomuleasa, A.-B. Tigu, R. Munteanu, C.-S. Moldovan, D. Kegyes, A. Onaciu, D. Gulei, G. Ghiaur, H. Einsele, C. M. Croce, *Sig. Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 201. DOI: 10.1038/s41392-024-01899-w.
- [188] J. Esteban-Villarrubia, J. J. Soto-Castillo, J. Pozas, M. S. Román-Gil, I. Orejana-Martín, J. Torres-Jiménez, A. Carrato, T. Alonso-Gordoa, J. Molina-Cerrillo, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–48. DOI: 10.3390/ijms21228529.
- [189] K. K. Bhanumathy, A. Balagopal, F. S. Vizeacoumar, F. J. Vizeacoumar, A. Freywald, V. Giambra, *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 1–21. DOI: 10.3390/cancers13020184.
- [190] D. Busse, F. M. Yakes, A. E. G. Lenferink, C. L. Arteaga, *Semin. Oncol.* **2001**, *28*, 47–55. DOI: 10.1016/s0093-7754(01)90282-9.
- [191] P. Saraon, S. Pathmanathan, J. Snider, A. Lyakisheva, V. Wong, I. Stagliar, *Oncogene* **2021**, *40*, 4079–4093. DOI: 10.1038/s41388-021-01841-2.
- [192] J. Bouitbir, M. V. Panajatovic, T. Frechard, N. J. Roos, S. Kr henb hl, *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1106. DOI: 10.3389/fphar.2020.01106.

- [193] M. Breccia, A. Salaroli, M. Molica, G. Alimena, *OncoTargets Ther.* **2013**, 6, 257–265. DOI: 10.2147/OTT.S35360.
- [194] S. M. Usama, Z. Jiang, K. Pflug, R. Sitcheran, K. Burgess, *ChemMedChem* **2019**, 14, 1575–1579. DOI: 10.1002/cmdc.201900356.
- [195] M. Al-Asmakh, H. Bawadi, M. Hamdan, I. Gupta, H. Kheraldine, A. Jabeen, B. Rizeq, A.-E. Al Moustafa, *Biomed. Pharmacother.* **2021**, 134, 111134. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111134.
- [196] J. Zhang, Y. Chen, Q. He, *Oncol Lett.* **2020**, 20, 145–154. DOI: 10.3892/ol.2020.11556.
- [197] C. Dong, B. Li, Z. Li, S. Shetty, J. Fu, *Oncotarget* **2016**, 7, 49699–49709. DOI: 10.18632/oncotarget.10435.
- [198] G. M. Keating, *Drugs* **2017**, 77, 85–96. DOI: 10.1007/s40265-016-0677-x.
- [199] C. Arib, A. Griveau, J. Eyer, J. Spadavecchia, *Nanoscale Adv.* **2022**, 4, 3010–3022. DOI: 10.1039/D2NA00096B.
- [200] K. Pal, F. Al-Suraih, R. Gonzalez-Rodriguez, S. K. Dutta, E. Wang, H. S. Kwak, T. R. Caulfield, J. L. Coffey, S. Bhattacharya, *Nanoscale* **2017**, 9, 15622–15634. DOI: 10.1039/C7NR03172F.
- [201] A. Alhussan, N. Palmerley, J. Smazynski, J. Karasinska, D. J. Renouf, D. F. Schaeffer, W. Beckham, A. S. Alexander, D. B. Chithrani, *Cancers (Basel)* **2022**, 14, 3586. DOI: 10.3390/cancers14153586.
- [202] L. Digiacomo, D. Caputo, R. Coppola, C. Cascone, F. Giulimondi, S. Palchetti, D. Pozzi, G. Caracciolo, *Biointerphases* **2021**, 16, 011010. DOI: 10.1116/6.0000540.
- [203] B. Smolarz, A. Durczyński, H. Romanowicz, K. Szyłło, P. Hogendorf, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 2805. DOI: 10.3390/ijms23052805.
- [204] S. A. Jensen, E. S. Day, C. H. Ko, L. A. Hurley, J. P. Luciano, F. M. Kouri, T. J. Merkel, A. J. Luthi, P. C. Patel, J. I. Cutler, W. L. Daniel, A. W. Scott, M. W. Rotz, T. J. Meade, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, A. H. Stegh, *Sci. Transl. Med.* **2013**, 30, 209ra152. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006839.
- [205] N. Grafals-Ruiz, C. I. Rios-Vicil, E. L. Lozada-Delgado, B. I. Quiñones-Díaz, R. A. Noriega-Rivera, G. Martínez-Zayas, Y. Santana-Rivera, G. S. Santiago-Sánchez, F. Valiyeva, P. E. Vivas-Mejía, *Int. J. Nanomedicine* **2020**, 15, 2809–2828. DOI: 10.2147/IJN.S241055.
- [206] L. Peng, Y. Liang, X. Zhong, Z. Liang, Y. Tian, S. Li, J. Liang, R. Wang, Y. Zhong, Y. Shi, X. Zhang, *Int. J. Nanomedicine* **2020**, 15, 1363–1372. DOI: 10.2147/IJN.S238206.