

Charakterisierung proteinbasierter Nanopartikel zum Transport von Oligonukleotiden für eine Rezeptor-vermittelte Zellaufnahme

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
Frankfurt am Main

von
Sabine Balthasar
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main, 2005

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHER TEIL	3
2.1. Virale Erkrankungen	3
2.2. Antisense-Therapie	6
2.2.1. Antisense-Oligonukleotide	7
2.2.1.1. Wirkmechanismus	7
2.2.1.2. Sequenzauswahl	9
2.2.1.3. Strukturmodifikationen	11
2.2.1.4. Klinische Studien	14
2.3. Trägersysteme	16
2.3.1. Nanopartikel	16
2.3.1.1. Definition	16
2.3.1.2. Oberflächeneigenschaften und Körperverteilung	17
2.3.2. Nanopartikel auf Proteinbasis	19
2.3.2.1. Humanes Serumalbumin (HSA)	20
2.3.2.2. Gelatine	21
2.3.3. Herstellungsmethoden für proteinbasierte Nanopartikel	22
2.3.4. Drug-Targeting-Strategien	22
2.3.5. Anti-CD3 Antikörper	27
3. MATERIAL UND METHODEN	35
3.1. Material	35
3.1.1. Laborgeräte	35
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	36
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien	36
3.1.3.1. Nanopartikelherstellung und Modifikationen	37
3.1.3.2. SH-Oligonukleotide (SH-ODN) und Phosphorothioate (PTO)	38
3.1.3.3. Herstellung eines löslichen Konjugats (HSA-SS-ODN)	39
3.1.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	39

3.1.4.	Zellkultur	40
3.1.4.1.	Zelllinien	40
3.1.4.2.	Reagenzien der Zellkultur	41
3.1.5.	Puffer und Lösungen	42
3.1.5.1.	Nanopartikelmodifikationen	42
3.1.5.2.	High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)-Fließmittel	43
3.1.5.3.	Gelpermeationschromatographie (GPC)-Fließmittel	44
3.1.5.4.	Quantifizierung der Antikörperbindung	44
3.1.5.4.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	44
3.1.5.4.2.	Fluoreszenzspektroskopie	46
3.2.	Herstellung der Nanopartikel	47
3.2.1.	Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA-NP)	47
3.2.2.	Inkorporative Wirkstoffbindung von Phosphorothioaten (HSA-PTO-NP)	47
3.2.3.	Lösliches Konjugat aus HSA und modifizierten Oligonukleotiden (HSA SS-ODN)	48
3.2.3.1.	Proteinaktivierung mit hetero-bifunktionalem Crosslinker	48
3.2.3.2.	Quantifizierung des gebundenen Crosslinkers (Sulfo-LC-SPDP)	49
3.2.3.3.	Reduktive Spaltung des SH-ODN	49
3.2.3.4.	Konjugation von SH-ODN an aktiviertes HSA	50
3.2.3.5.	Nanopartikelherstellung aus löslichem Konjugat (HSA-SS-ODN-NP)	50
3.2.4.	Nanopartikel aus Gelatine A (Gel-NP)	51
3.2.4.1.	Einfluss auf die Molekulargewichtsverteilung	51
3.2.4.2.	Einfluss des Desolvatationsmittels auf die Ausbeute	52
3.2.4.3.	Einfluss der Quervernetzung auf die Stabilität	53
3.3.	Charakterisierung der Nanopartikel	53
3.3.1.	Gehaltsbestimmung	53
3.3.2.	Partikeldurchmesser	53
3.3.3.	Zetapotential	54
3.3.4.	Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM)	55
3.3.5.	Quantifizierung der gebundenen Oligonukleotidmenge	56
3.3.5.1.	Bestimmung des ungebundenen Wirkstoffs im Überstand	56
3.3.5.2.	Bestimmung des inkorporierten Wirkstoffs durch Partikelverdau	56
3.3.5.2.1.	Adsorptive Einbindung in die HSA-Matrix	56

3.3.5.2.2.	Kovalente Bindung an aktiviertes HSA über Disulfidbrücken-----	57
3.3.6.	Quantitative Bestimmung von Aminogruppen-----	57
3.3.7.	Bestimmung von gelöstem Protein mit BCA-Reagenz-----	58
3.4.	Oberflächenmodifikationen-----	58
3.4.1.	Einführung von Sulfhydrylgruppen mit 2-Iminothiolan (Trauts Reagenz)	58
3.4.1.1.	Thiolierung von Humanen Serumalbumin-Nanopartikeln (HSA-NP) -----	58
3.4.1.2.	Thiolierung von Gelatine A-Nanopartikeln (Gel-NP)-----	59
3.4.1.3.	Thiolierung von Avidin (Av)-----	59
3.4.2.	Bestimmung reaktiver Sulfhydrylgruppen an der Oberfläche-----	60
3.4.3.	Proteinaktivierung mit hetero-bifunktionalen Crosslinkern (Sulfo-MBS)-	60
3.4.3.1.	Aktivierung von Avidin / NeutrAvidin TM -----	60
3.4.3.2.	Aktivierung von HSA-Nanopartikel-----	61
3.4.4.	Kopplung der aktivierten Proteinkomponente-----	61
3.4.4.1.	Avidin / NeutrAvidin TM an thiolierte Nanopartikel (SH-HSA-NP oder SH-Gel-NP)-----	61
3.4.4.2.	HSA-Nanopartikel an thioliertes Avidin (SH-Av)-----	62
3.4.5.	Funktionalitätsbestimmung des gekoppelten Avidins / NeutrAvidins TM --	62
3.4.6.	Bindung biotinylierter Liganden über Avidin-----	63
3.4.6.1.	anti-CD3-Antikörperbindung an überflächenmodifizierte Gelatine Nanopartikel (Gel-NAv-FITC-NP)-----	63
3.4.6.2.	Bindung eines anti-Her2-neu Antikörper an Gelatine-Nanopartikel (Trast-Gel-NAv-FITC-NP)-----	64
3.4.6.2.1.	Bindung biotinylierter Phosphorothioate an HSA-Nanopartikel (PTO-HSA-Av-NP)-----	65
3.4.7.	Quantifizierung biotinylierter Liganden-----	65
3.4.7.1.	Ermittlung der Antikörperbeladung-----	65
3.4.7.1.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)-----	65
3.4.7.1.2.	Fluorimetrie-----	67
3.4.7.2.	Ermittlung der Beladungsrate von Phosphorothioaten an HSA Nanopartikel (HSA-PTO-NP)-----	68
3.5.	Zellkultur-----	68
3.5.1.	Kultivierung der verschiedenen Zelllinien-----	68

3.5.1.1.	HeLa-Zellen-----	68
3.5.1.2.	Lymphozytäre Zellen -----	69
3.5.1.3.	Brustkrebszellen-----	69
3.5.2.	Zellzahlbestimmung -----	69
3.5.3.	Zytotoxizitäts-Test (MTT-Test)-----	70
3.5.4.	Antikörper-beladene Gel-Nanopartikel-----	71
3.5.4.1.	Inkubation mit lymphozytären Zellen -----	71
3.5.4.2.	Inkubation mit Brustkrebszellen-----	71
3.5.5.	Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie (FACS) -----	72
3.5.6.	Zellaufnahme mittels Konfokalem Laserscanning Mikroskop (CLSM) ---	72
3.5.6.1.	Lymphozytäre Zellen -----	72
3.5.6.2.	Brustkrebszellen (SK-BR-3)-----	73
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION-----	75
4.1.	Herstellungsmethoden proteinbasierter Nanopartikel -----	75
4.1.1.	Nanopartikel aus Albumin (HSA-NP)-----	75
4.1.2.	HSA-Nanopartikeln beladen mit Phosphorothioaten (HSA-PTO-NP)-----	79
4.1.3.	Lösliches Konjugat aus Albumin und modifizierten Oligonukleotiden (HSA-SS-ODN) -----	80
4.1.4.	Umsetzung des löslichen Konjugats zu Nanopartikeln durch Desolvatation (HSA-SS-ODN-NP) -----	87
4.1.5.	Nanopartikel aus Gelatine A (Gel-NP) -----	89
4.2.	Charakterisierung der HSA-Nanopartikel-----	97
4.2.1.	Einfluss des Desolvatationsmittels auf die Partikeldurchmesser-----	97
4.2.2.	Darstellung der Oberflächenstruktur mittels Rasterkraftmikroskopie-----	98
4.2.3.	Quantitative Bestimmung von adsorptiv inkorporierten PTOs-----	100
4.2.4.	Quantitative Bestimmung von Aminogruppen auf der Oberfläche -----	102
4.3.	Oberflächenmodifikationen -----	103
4.3.1.	Einführung von SH-Gruppen -----	103
4.3.2.	Kopplung von aktiviertem Avidin und NeutrAvidin TM -----	106
4.3.2.1.	Beladung von HSA-Nanopartikeln mit Avidin (HSA-Av-NP)-----	108
4.3.2.2.	Beladung von Gel-Nanopartikeln mit NeutrAvidin TM (Gel-NAv-NP) -----	109

4.3.2.3.	Thiolierung von Avidin zur Bindung an aktivierte HSA-NP (aHSA-NP)-----	111
4.3.3.	Bestimmung der Funktionalität von Avidin und NeutrAvidin™ -----	113
4.3.4.	Bindung biotinylierter Liganden über Avidin -----	116
4.3.4.1.	Anti-CD3-Antikörper an Gel-Nanopartikel (CD3-Gel-NAv-FITC-NP)-----	116
4.3.4.1.1.	Quantifizierung über SDS-Page-----	117
4.3.4.1.2.	Quantifizierung mittels Fluoreszenzspektroskopie -----	119
4.3.4.2.	Trastuzumab an Gel-Nanopartikel (Trast-Gel-NAv-FITC-NP)-----	120
4.3.4.3.	Phosphorothioate an HSA-Nanopartikel (PTO-HSA-Av-NP) -----	123
4.4.	Zellkulturexperimente -----	125
4.4.1.	Zytotoxizität (MTT-Test) -----	125
4.4.2.	Stabilität im Zellkulturmedium-----	126
4.4.3.	Zellaufnahme von Antikörper-beladenen Gel-Nanopartikeln -----	132
4.4.3.1.	T-Lymphozyten mit CD3-Gel-NAv-FITC-NP -----	132
4.4.3.1.1.	Quantifizierung der CD3-Expression-----	132
4.4.3.1.2.	Quantifizierung der Partikelbindung mittels FACS -----	133
4.4.3.1.3.	Bestimmung der Internalisation mittels CLSM -----	135
4.4.3.1.4.	Zellaufnahme nach Competitionsexperiment -----	137
4.4.3.1.5.	Quantifizierung der Zellaufnahme mittels FACS -----	137
4.4.3.1.6.	Bestimmung der Internalisation mit CLSM -----	139
4.4.3.2.	Zellaufnahme in Brustkrebszellen mit Trastuzumab-beladenen Gel-Nanopartikeln (Trast-Gel-NAv-FITC-NP) -----	141
4.4.3.2.1.	Quantifizierung der Partikelbindung mittels FACS -----	141
4.4.3.2.2.	Bestimmung der Internalisation mittels CLSM -----	143
4.5.	Schlussfolgerung -----	144
5.	ZUSAMMENFASSUNG -----	145
6.	LITERATUR -----	151
7.	LEBENS LAUF -----	161

Verwendete Abkürzungen

AK	Antikörper
anti-CD3 AK	anti-CD3 Antikörper
Av	Avidin
BCA	Bicinchoninsäure
B4F	Biotin-4-Fluorescein
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fötale Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
MQ	Milli Q-Wasser
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NAv	NeutrAvidin TM
NAv-FITC	NeutrAvidin TM Fluoresceinisothiocyanat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NP	Nanopartikel
ODN	Oligonukleotid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie
PNA	Peptid-Nukleinsäureanaloge
PTO	Phosphorothioat
RT	Raumtemperatur
Sulfo-LC-SPDP	Sulfosuccinimidyl 6-[3'-(2 pyridyldithio)-propionamido] hexanoat
Sulfo-MBS	Sulfo-m-maleinimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester

Trast	Trastuzumab (Herceptin®)
TBS	Tris Buffered Saline
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
Üb	Überstand
UZ	Ultrazentrifuge
WB	Western-Blot

1. Einleitung

Die Entwicklung neuartiger Arzneistoffträgersysteme wird zum einen angetrieben von dem Bestreben die Möglichkeiten bzw. Potentiale zugelassener Wirkstoffe auszuschöpfen und um aktuelle Therapiekonzepte zu optimieren. Auf der anderen Seite steht als treibende Kraft der technische Fortschritt auf dem Gebiet der Wirkstoffsynthese, weil Kombinatorik und „high-throughput-screening“ zu Wirkstoffen mit ungünstigen chemischen Eigenschaften führen. Diese beiden Entwicklungen stellen neue Anforderungen an die Arzneiformen und erfordern innovative Lösungsansätze. Wirksubstanzen müssen auf ihrem Weg zum Zielort zahlreiche physiologische Barrieren überwinden, die sie häufig eigenständig nicht passieren können. Dem Transport von Arzneistoffen zum Wirkort, der Verteilung und Freisetzung kommt eine entscheidende Bedeutung zu, weil diese Parameter durch die Wahl des Applikationssystems stark beeinflusst werden. Als „Drug-Targeting“, auf dem seit vielen Jahren ein Schwerpunkt der Arzneistoffträgerentwicklung liegt, wird das gezielte Heranbringen eines Wirkstoffs an den Wirkort bezeichnet. Auf diesem Weg soll zum einen die Verfügbarkeit von Arzneistoffen und zum anderen die Dosisanpassung und damit das Nebenwirkungsprofil verbessert werden; dieses gilt im besonderen für die Substanzklasse der Zytostatika.

Aus den genannten Gründen haben lösliche Konjugate und kolloidale Trägersysteme, zu denen Liposomen, virale Hüllkapside, Mikro- und Nanoemulsionen, Mikro- und Nanopartikel sowie Nanokapseln zu zählen sind, in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Als Ausgangsmaterialien dienen eine Vielzahl synthetischer und natürlicher Monomere bzw. Polymere. Der Einsatz natürlicher Polymere, die durch Dispersionstechniken zu partikulären Strukturen geformt werden, vereinigt diverse Vorteile. Sie sind gut biodegradierbar, haben keine merklichen immunogenen Eigenschaften, sind untoxisch und ermöglichen Oberflächenmodifikationen an den freien funktionellen Gruppen.

Die Arzneistoffbindung erfolgt häufig durch Adsorption an das Ausgangsmaterial oder an die Oberfläche eines bestehenden Trägers. Die Zellkulturergebnisse zeigen jedoch, dass diese Bindungstechnik oft nicht zum gewünschten Erfolg führt, da die Wirkstoff- oder Targetmoleküle durch Zellkulturkomponenten wie Serumproteine wieder von der Oberfläche verdrängt werden.

Von der Herstellung eines Trägersystems, welches auf kovalenten Bindungen basiert, verspricht man sich eine größere Effektivität, da es stabiler und besser steuerbar ist.

Eine viel versprechende neue Wirkstoffklasse stellen Nukleinsäurederivate und Peptide dar, die jedoch in physiologischen Medien nur über eine unzureichende Stabilität verfügen und biologische Membranen nicht passieren können. Dazu zählen außer den aktiven Nukleinsäuren (Gene), peptidische Nukleinsäuren (PNA) und inaktive Nukleinsäuren (Oligonukleotide), die als Antisense-Wirkstoffe fungieren. Die seit den 80-iger Jahren zur Antisense-Therapie durchgeführten Untersuchungen verfolgen die gezielte Hemmung der Proteinsynthese. Für virale Erkrankungen, Regulation der Hypertonie oder die Tumorbehandlung stellen diese Wirkstoffe attraktive Behandlungsansätze dar. Hierbei werden die für das Fortschreiten der Erkrankung essentiellen, zum Teil überexprimierten Proteine herunterreguliert. Einen vielversprechenden Ansatz stellt in diesem Zusammenhang die Bindung von Oligonukleotiden an Nanopartikel dar, weil sie diese vor einem enzymatischen Abbau schützen und zielgerichtet zum Wirkort transportieren können.

2. Theoretischer Teil

2.1. Virale Erkrankungen

Die kausale Behandlung von Viruserkrankungen ist schwierig, weil Viren über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen. Oftmals kommt es zu einem selbständigen Ausheilen, so dass nur eine symptomatische Therapie erfolgt. Anders verhält es sich bei schwerwiegenden oder lebensbedrohlichen Viruserkrankungen, zu denen zum Beispiel Herpes zoster / simplex und das humane Immundefizienz-Virus (HIV) zählen, die eine direkte Bekämpfung der Virusvermehrung erfordern. Es gibt im Rahmen einer effizienten Arzneistofftherapie verschiedenste Möglichkeiten, um in den Replikationszyklus eines Virus einzugreifen:

- Unterbinden der Anhaftung an die Zellmembran
- Verhindern des Eindringens in die Wirtszelle durch Membranfusion und Entfernung der Eiweißhülle („Uncoating“)
- Verhindern der Einlagerung von Virusnukleinsäure in die Wirts-DNA und Blockierung der Replikation
- Störung der Virusproteinsynthese (Transkription / Translation)
- Verhinderung der Viruszusammensetzung („Self assembly“)

Das HI-Virus gehört in die Klasse der Retroviren, für die ein diploides Genom (5-10 kb) charakteristisch ist, das in Form zweier RNA-Einzelstränge vorliegt. Zur Replikation wird das RNA-Genom durch die reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Allgemein verfügen Retroviren alle über die reverse Transkriptase und werden in drei Unterfamilien eingeteilt: Onko-, Spuma- und Lentiviren. In die zuletzt genannte Gruppe gehört das HIV, das im Gegensatz zu den Onkoviren sehr effizient auch nicht teilende Zellen infiltriert. Die HIV-Infektion führt nach einer über einige Jahre andauernden Latenzzeit zu einem massiven Defekt des Immunsystems. Nach dem Eintritt über die Schleimhäute werden die Viren, vermutlich über dendritische Zellen, in das nahegelegene lymphatische Gewebe transportiert. Diese zählen zu den antigenpräsentierenden Zellen und es kommt zum Befall lymphozytärer T-Helfer-Zellen (CD4-Zellen). Im Rahmen einer opportunistischen Infektion vollzieht sich nun

die Integration des proviralen, zuvor in DNA umgeschriebenen Erbmateriale in das Wirtsgenom, so dass die CD4-Zellen durch die Aktivierung zum Virusproduzenten werden. In der Initialphase kommt es vorübergehend zu einer Reduktion der virusbefallenen Zellen durch das Immunsystem. Eine vollständige Elimination aus dem Körper gelingt allerdings nicht, weil im lymphatischen Gewebe zurückbleibende Viren in den T-Zellen verharren und ein permanentes Reservoir darstellen.

Einen weiteren Rückzugsort bilden die Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems (MPS); dazu zählen primär Makrophagen, die durch ihre längere Lebensdauer wesentlich zur Virusausbreitung im ganzen Körper beitragen. Eine Schlüsselposition hinsichtlich einer erfolgreichen Eradikation stellen persistierende Viren im Zentralnervensystem in infizierten Makrophagen dar, weil antivirale Substanzen nur eine schlechte bis gar keine Blut-Hirnschranken-Gängigkeit aufweisen.

Die Krankheitsprogression und die Überlebensprognose HIV infizierter Patienten haben sich durch die antivirale Kombinationstherapie deutlich verbessert, wobei eine Viruseradikation mit den zur Verfügung stehenden Medikamenten bisher nicht erzielt werden kann, weil das Virus nicht nur in verschiedenen Blutzellen und im lymphatischen Gewebe persistiert, sondern sich auch durch ständige Genmutationen der Therapie entzieht. Diskutiert wird weiterhin die Möglichkeit, dass das Immunsystem durch die lang anhaltende Virusreplikation nach einer gewissen Zeitspanne einen „point of no return“ überschreitet. Das Vollbild des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (AIDS) zeichnet sich durch eine hohe Anfälligkeit gegenüber opportunistischen, durch Mikroorganismen verursachte Infektionen, malignen Tumoren und neurologischen Erkrankungen aus.

Es gibt drei pharmakologische Substanzgruppen, die entweder in die Inhibition des Umschreibungsvorgangs der Erbinformation von RNA in DNA oder in die Enzyminhibition der sogenannten Protease involviert sind. Bei der Stoffklasse der Reversen-Transkriptase-Inhibitoren (RTI) unterscheidet man die Nukleosid-(NRTI) und die Nichtnukleosidanaloga (NNRTI), die sich in ihrem Wirkmechanismus voneinander abgrenzen. Die NRTI werden nach der Zellaufnahme dreifach phosphoryliert und danach an die DNA-Kette angeknüpft, wodurch es zu

einem vorzeitigen Kettenabbruch kommt. Bei den NNRTI kommt es zu einer nicht-kompetitiven Hemmung der reversen Transkriptase.

Beide Wirkstoffklassen halten die Replikation zunächst effektiv auf und senken die Viruslast teilweise bis unter die Nachweisgrenze, bevor sie wegen Resistenzbildung an Wirkung verlieren.

In der Spätphase der Virusvermehrung ist die Protease, vor oder während der Ausknospung, für die Ansammlung und Freisetzung von Viruspartikeln verantwortlich. Die Substanzgruppe der Proteaseinhibitoren führt zur Ausbildung unreifer, defekter und nichtinfektiöser HI-Virushüllen. In der HIV-Therapie haben diese Wirkstoffe eine Wende eingeleitet, weil sie im Gegensatz zu den RTI / NNRTI den Reifungsprozess auch in bereits infizierten Zellen unterdrücken.

Es gibt in der Theorie verschiedene Möglichkeiten, die Therapieeffizienz zu verbessern bzw. eine Eradikation des Virus zu erreichen. Das häufig schnelle Auftreten von Resistenzen gegenüber den eingesetzten antiviralen Substanzen und die Ausbreitung von resistenten Stämmen führen zu immer neuen und komplexeren Wirkstoffkombinationen. Der Bedarf an neuen Substanzklassen, die gegen andere Strukturen gerichtet sind und somit andere Replikations-schritte unterbrechen, ist noch immer groß. Makrophagen als Virusreservoir stehen hier als Zielzellen im Vordergrund. Ihre Aufgabe ist es, körperfremdes Material durch Phagozytose zu eliminieren, daher sind sie als Target für die Aufnahme von Nanopartikel gut geeignet. Bei den klassischen, in der HIV-Therapie eingesetzten Arzneistoffen muss man zwischen den nukleosidischen Wirkstoffen, die wie natürliche Nukleoside eine gute Zellmembrangängigkeit besitzen und den schwer bioverfügbaren Proteaseinhibitoren unterscheiden. Für die zweite Wirkstoffgruppe wurde Saquinavir in Polyhexylcyanoacrylat-Nanopartikel eingebunden, wodurch eine deutliche Virusreduktion in chronisch infizierten Monozyten / Makrophagen erreicht werden konnte [Bender et al., 1996].

2.2. Antisense-Therapie

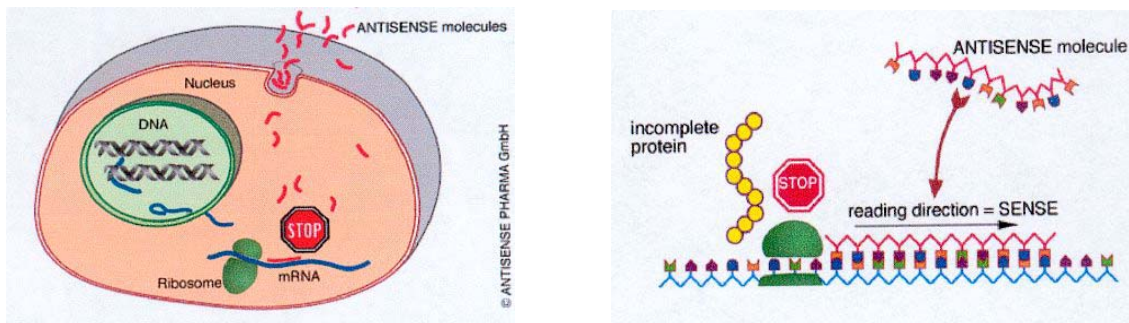
Im Zusammenhang mit der Genomsequenzierung werden immer schneller Informationen über Gene generiert, die an der Entstehung der verschiedensten Erkrankungen beteiligt sind. Sind die für bestimmte Proteine kodierenden Genabschnitte bekannt, hat man die Möglichkeit kurze Nukleinsäuresequenzen zu konstruieren, die an die korrespondierende mRNA binden und die Proteinbildung auf Ebene der Translation inhibieren oder vermindern. Die Antisense-Strategie beruht auf der Entwicklung von Nukleinsäuresequenzen, die gezielt zur Expressionshemmung von Proteinen eingesetzt werden. Sie ist abzugrenzen von der Gentherapie, bei der eine DNA-Sequenz eingeschleust und direkt in das Wirtsgenom integriert wird. Im Jahr 1978 wurde zum ersten Mal die erfolgreiche Unterdrückung einer Genexpression durch den Einsatz von Oligonukleotiden publiziert [Zamecnik and Stephenson, 1978]. Automatisierung und kommerzielle Herstellung bilden die Basis für den breiten Substanzeinsatz in der Forschung.

Im Rahmen einer Therapie sind die fehlende Stabilität gegenüber Nukleasen in physiologischen Flüssigkeiten, die schlechte Zellmembrangängigkeit und das Erreichen therapeutisch ausreichender Wirkstoffspiegel, die ausschlaggebenden, limitierenden Faktoren. Oligonukleotide werden eingesetzt zur Erforschung von Genen und deren Funktionen in der Zelle, als Alternative zum Gen „knockout“ und zur Entwicklung neuer Angriffspunkte für Wirkstoffe. Man hofft auf diesem Weg neue Ansätze für eine rationale und kausale Medikamententherapie, verbunden mit einer Verringerung der Nebenwirkungen, zu finden. Deshalb ist es notwendig Erkenntnisse auf dem Gebiet der Zellaufnahme, Organverteilung und pharmakologischen Wirkung zu gewinnen. Da es sich um einen natürlichen von Bakterien genutzten Mechanismus handelt, hoffte man in kurzer Zeit das Ziel zu erreichen. Die Etablierung einer Antisense-Oligonukleotidtherapie ist jedoch nicht so schnell und einfach zu erreichen wie am Anfang gehofft.

2.2.1. Antisense-Oligonukleotide

Bei der Antisense-Therapie werden Oligonukleotide mit einer Länge von 15 - 25 Nucleobasen eingesetzt. Es sind potentielle Wirkstoffe, um die Genexpression auf mRNA-Ebene oder DNA-Ebene zu unterbrechen. Sie binden sequenzspezifisch durch Hybridisierung über Wasserstoffbrückenbindungen (Watson-Crick-Basenpaarung) an den Sense-Strang und werden zusätzlich noch über hydrophobe Wechselwirkungen („Base stacking“) stabilisiert. Auf verschiedenen Wegen wird so die Proteinbildung verhindert.

Abbildung 2-1: Allgemeiner Wirkmechanismus von Antisense-Oligonukleotiden



aus: Schliengensiepen, Antisense-From technology to therapy, Lab manual and textbook, Blackwell Science

2.2.1.1. Wirkmechanismus

Die biochemischen Grundlagen über den die Antisensemoleküle ihren Effekt auslösen ist noch nicht genau bekannt, diskutiert werden vier verschiedene Angriffspunkte und zwei Inhibitionsmechanismen [Schliengensiepen R.W., 1997].

- Antigenstrategie

Die genetische Information ist im Kern als helikaler DNA-Doppelstrang fixiert. Mit tripelhelixbildenden Oligonukleotiden besteht über Wasserstoffbrücken zwischen Pyridinbasen die Möglichkeit einer spezifischen Genregulation durch Bindung an die Doppelhelix. In Abhängigkeit vom Bindungsbereich kann die Polymerase und die nachfolgende Elongation oder der Transkriptionsbeginn gestört werden.

- *Hemmung des Spleißens*

Oligonukleotide als Polyanionen sind, einmal im Zytoplasma angekommen, in der Lage Kernporen zu durchwandern, die im Gegensatz zur Plasmamembran oder Membran von Organellen kein Hindernis für die Substanzen darstellen. Durch Interaktion mit der pre-mRNA kann das Herausschneiden von Introns oder ihr Übertritt ins Zytosol verhindert werden.
- *Translationsarrest*

Bei diesem häufig auftretenden Mechanismus binden Oligonukleotide (ODN) über Wasserstoffbrücken komplementär an die mRNA. Die Elongation an den Ribosomen kommt durch eine sterische Blockade zum Stillstand. Die ODN-Bindung an irgendeiner beliebigen Stelle kann zu einer Konformationsänderung führen.
- *Translationshemmung*

Häufig werden Sequenzen verwendet, die gegen die Initiationsstelle der Translation gerichtet sind. In diesem Bereich liegt die mRNA als Einzelstrang vor und kann gut mit dem Oligonukleotid hybridisieren, so dass der Start des Ablesevorgangs effektiv verhindert wird.
- *RNase H-Aktivität*

Die Bedeutung der ubiquitär vorkommenden RNase H, für die Vermittlung des Antisense-Effektes ist noch nicht völlig aufgeklärt. Für die meisten Zelltypen wird *in vivo* eine hohe Enzymaktivität als wichtiges Kriterium für einen Antisense-Effekt angesehen. Es kommt bei der Aktivierung lediglich zu einer Spaltung der mRNA, während die Oligonukleotide intakt bleiben. In der Arbeit von Walder und Walder wurde der Mechanismus und der Einfluss von RNase H auf die Unterbrechung der Translation, ausgelöst durch den Zusatz von Antisense-Oligonukleotiden untersucht [Walder and Walder, 1988]. Der Versuch mit frisch aufgearbeitetem Retikulozytenlysat von Kaninchen enthielt eine ausreichende Menge an RNase H, um in Gegenwart eines ODNs die gesamte, komplementäre Menge an mRNA innerhalb einer Stunde aufzuspalten. Ein kompetitiver RNase H-Inhibitor (Poly (rA)-oligo (dT), der selbst keine signifikante Translationshemmung bewirkt,

wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob alleine die Hybridisierung von mRNA mit ODN für eine Inhibition ausreichend ist. Die gegen das Initiationscodon oder gegen die Kodierungsregion gerichteten ODNs führten zu keiner Proteininhibition. Sie konnten die Spaltung durch RNase H als Hauptweg für den durch ODNs ausgelösten Hybridisierungsstopp ausmachen. Sie belegten einen gewissen Sensitivitätsunterschied in Abhängigkeit vom mRNA Sequenzabschnitt gegenüber RNase H.

2.2.1.2. Sequenzauswahl

Welche enorme Bedeutung der Sequenzauswahl zukommt, zeigt die Arbeit von Crooke, der mit dem Austausch nur eines einzigen Nukleotids eine um das 500-fache reduzierte Affinität zur Targetsequenz beobachten konnte [Crooke, 1992].

Durch Schätzung der im menschlichem Genom vorkommenden Basenpaare wurde rechnerisch eine minimale Sequenzlänge von 12 Basen, die für einen spezifischen Antisense-Effekt benötigt wird, ermittelt. Als Obergrenze für eine erfolgreiche Hybridisierung wurde in der Zellkultur eine Basenanzahl von 30 beobachtet, weil sich darüber hinaus die Spezifität bei zusätzlich erhöhter Toxizität verringert. Das toxische Potential macht sich als antiviraler Effekt, durch eine auf genetischer Ebene ausgelöste Kaskade, bemerkbar. In Abhängigkeit von den chemischen Modifikationen wird bei einer Basenanzahl von 14 - 25 eine optimale Hybridisierung erreicht.

Einen weiteren wichtigen Punkt für eine erfolgreiche Antisense-Therapie stellt neben der Sequenzlänge die Auswahl der Targetregion dar. Für verschiedene Gene wurde bereits belegt, dass die Hemmung im Bereich der Translation-initiations- und der Promotorregion einfach und effektiv erfolgt. Dieser Ansatz birgt zwei Gefahrenpunkte, die zum einen durch die Homologie vieler Initiationsstellen und zum anderen durch die geringe Basenlänge verursacht werden. Das Vorkommen homologer Sequenzen verschiedener Targetbereiche ist ein sehr häufiges Problem und führt zu Fehlinterpretationen. In vielen Fällen wurde gezeigt, dass die gegen eine Region gerichteten Oligonukleotide genauso effektiv gegen eine andere agierten. Die Frage des am besten geeigneten Targets ist nicht abschließend geklärt.

Effekte, die unabhängig von ihrer Sequenzabfolge also nicht über Watson-Crick-Basenpaarung, sondern durch direkte Interaktion von nur 3 - 6 Basen zu einer Proteininhibition führen, müssen durch Kontrollversuche herausgearbeitet werden. Nachgewiesen ist ein solcher vorgetäuschter Antisense-Effekt zum Beispiel für die Basenfolge AACGTT (Palindrom), die einen potenten Interferon γ -Inhibitor darstellt. Weiterhin weisen vier aufeinander folgende Guanosinbasen (G4 Quartett) unabhängig von der restlichen Basenfolge nicht spezifische antiproliferative Effekte auf [Agrawal et al., 1997].

Ein weiteres Phänomen stellt der Einsatz unmethylierter CpG-Motive in Phosphorothioaten dar. Dieses CG-Dinukleotidmotiv kommt im menschlichen Genom nur sehr selten vor und wenn, dann liegt das Cytosin in methylierter Form vor. Genau umgekehrt verhält es sich bei Bakterien, so dass es beim Menschen zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt. Die CpG-Abfolge lässt sich also nicht im Sinne einer spezifischen Genregulation, sondern zum Beispiel als Adjuvans bei der Vakzinierung einsetzen [Weiner, 2000]. Eingepackt in Mikropartikel wurden die Auswirkungen eines CpG-Motivs auf immunkompetente Zellen als Adjuvans untersucht [Singh et al., 1998]. Ziel ist es systemische Nebenwirkungen zu minimieren, die Möglichkeiten einer prophylaktische Immunisierung bei chronischen Erkrankungen zu erforschen bzw. zu einer mucoversalen Applikationsform zu gelangen.

In Folge stehende Cytosin- und Guanosinbasen oder auch an diesen Basen reiche Sequenzen, die abwechselnd oder sich wiederholend stehen, bewirken einen inhibitorischen Effekt. Durch mononukleosidische Abbauprodukte kann es zu zytotoxischen Effekten kommen, die ebenfalls irrtümlich als Antisense-Effekt interpretiert wurden [Vaerman et al., 1997].

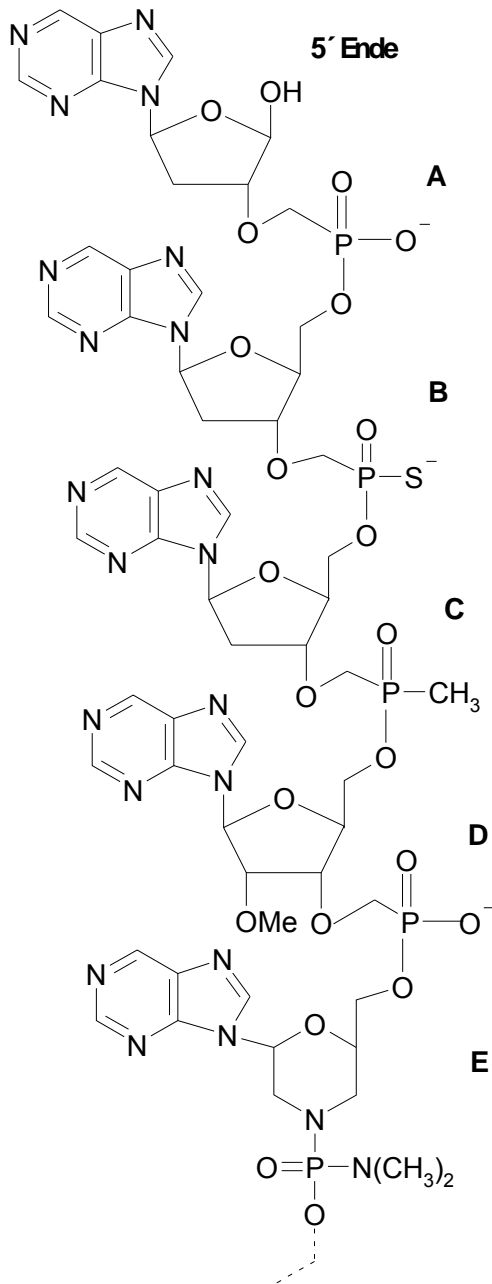
Alle diese Hindernisse müssen umgangen werden und in einem ausgewogenen Verhältnis zu anderen Einflussfaktoren stehen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit von Kontrollen, die im Idealfall natürlich keine Wirkung haben, um einen spezifischen Antisense-Effekt heraus zu arbeiten. Dazu gehören neben „scrambled“ Sequenzen, bei denen die Basenabfolge umgedreht oder durcheinander gewürfelt sein kann, auch Sequenzen, die gegen ein homologes Gen mit einer anderen Funktion gerichtet sind.

2.2.1.3. Strukturmodifikationen

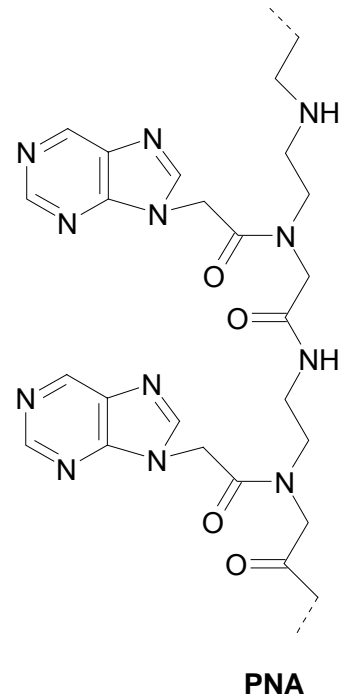
Strukturmodifikationen wurden intensiv untersucht und bieten viel Spielraum für Experimente. Das Resultat der Syntheseaktivitäten ist eine Erniedrigung der ursprünglich negativen Molekülladung, die zu einer verbesserten Zellaufnahme und einer besseren Stabilität gegenüber Nukleasen führt. Dieser Fortschritt geht allerdings unglücklicherweise mit einer abnehmenden Spezifität und einer Verringerung des Antisense-Effekts einher.

In der Abbildung 2-2 sind einige mögliche Oligonukleotidmodifikationen (ODN) und vollsynthetische peptidische Nukleinsäuren (PNA) dargestellt:

Abbildung 2-2: Oligonukleotide



Peptid-Nukleinsäuren



Ring A: unmodifiziertes ODN, Ring B: S gegen O ausgetauscht, Phosphorothioat, Ring C: Methylierung des Phosphats, Methylphosphonat, Ring D: Methylierung des Zuckers, Ring E: Phosphoramidat-Morpholin

Zu Beginn der Entwicklung wurde mit unmodifizierten Oligonukleotiden (siehe Abbildung 2-2, Ring A) gearbeitet, die aufgrund des negativ geladenen, achiralen Rückgrates eine gute Wasserlöslichkeit und Hybridisierungsfähigkeit mitbringen. Sie sind jedoch sehr anfällig gegenüber dem Verdau durch Exo-

und Endonukleasen und weisen in fötalem Kälberserum (FCS) lediglich eine Halbwertszeit von einigen Minuten auf [Shaw et al., 1991].

In der Folge wurde ein nicht bindendes Sauerstoffatom gegen einen Schwefel ausgetauscht (siehe Abbildung 2-2, Ring B) und die Halbwertszeit in FCS auf 24 - 48 Stunden verlängert. Diese Modifikation führte verglichen mit den unmodifizierten Oligonukleotiden nicht zu einer nennenswerten Beeinflussung anderer chemischer Parameter. Obwohl es sich noch immer um geladene Makromoleküle handelt, werden sie von den Zellen etwas besser aufgenommen, gelangen ins Zytoplasma und zeigen neben einer guten RNase H-Aktivierung spezifische Antisense-Effekte. Sie fanden daher als erste Antisense-Wirkstoffe Eingang in klinische Studien. Allerdings weisen sie wegen der sehr hohen Proteinadsorption an Albumin und α -Macroglobulinen eine verringerte Bioverfügbarkeit auf. Die Proteinbindung führt auf der anderen Seite zu anhaltend hohen und konstanten Plasmaspiegeln und zu einer langsamen Clearance. Durch eine Reduktion der Basen auf eine Zahl kleiner als 20 wird die starke Proteinbindung abgeschwächt. Die verbesserte Zellaufnahme kann begründet sein in einer erhöhten Bindung an Oberflächenproteine der Zellmembran.

Bei der chemischen Synthese wurde nur eines der beiden Sauerstoffatome durch einen Schwefel ersetzt. Dadurch entstehen zwei Diastereomere mit einer unterschiedlichen Bindungsaffinität. Sie können durch die bei der thermischen Doppelstrangtrennung freiwerdende Schmelzwärme differenziert werden.

Eine weitere Modifikation stellt der Austausch eines Sauerstoffatoms gegen eine neutrale Methylgruppe dar (siehe Abbildung 2-2, Ring C). Dabei bleiben wie bei den Phosphorothioaten die hohe Nukleaseresistenz und die Stabilität in FCS-haltigem Medium erhalten. Die erhöhte Lipophilie bedingt eine schlechtere Wasserlöslichkeit und die Zellaufnahme erfolgt entweder durch passive Diffusion oder durch Pinozytose. Die Bindung an die mRNA ist wegen einer möglichen sterischen Behinderung durch die Methylgruppe schwächer ausgeprägt. Im Vergleich zu den Phosphorothioaten ist zur Erzielung eines inhibitorischen Effekts wegen fehlender RNase H-Aktivität und der schwachen Hybridisierungsneigung eine um das 20 – 100-fach höhere Konzentration notwendig. Ähnlich verhält es sich mit Phosphoroamidat-Morpholin-Derivaten [McKeon et al., 2001].

Es gibt noch unzählige weitere Modifikationen, die hier nicht weiter im Detail aufgeführt werden sollen. Zum Teil werden auch sogenannte „gefensterte“ Oligonukleotide eingesetzt, die nur am Anfang und am Ende einige modifizierte Nukleotide aufweisen. Man versucht auf dem Weg eine geringere unspezifische Proteinbindung und die starke Hybridisierungsneigung der Oligonukleotide mit der besseren Nukleaseresistenz der Phosphorothioate zu kombinieren. Es gibt zahlreiche Ansätze, immer dem perfekten Oligonukleotid auf der Spur, welches alle Vorteile der einzelnen Modifikationen in sich vereinigt [Schmajuk et al., 1999].

Eine Besonderheit stellen die peptidischen Nukleinsäuren (siehe Abbildung 2-2) dar, die sich durch eine besonders hohe Nukleasebeständigkeit und eine sehr starke Duplexausbildung auszeichnen [Nielsen et al., 1991]. Das heterozyklische Basenrückgrat wurde durch „Molecular-Modelling“ anstatt mit Desoxyribosephosphat mit einem achiralen, pseudo-peptidischen N-(2-Aminoethyl) glycin verknüpft. Daher werden sie auch als Polyamid-Nukleinsäureanaloge bezeichnet. Diese chemische Veränderung geht wieder einher mit einer schlechten Wasserlöslichkeit und einer fehlenden Membranpermeabilität. Sie binden sequenzspezifisch an komplementäre DNA- und RNA-Stränge. Nach Anlagerung eines PNA-Strangs durch Hoogsteen-Basenpaarung an die DNA kommt es durch ein zweites Molekül über Watson-Crick-Basenpaarung zu einer Stranginvasion, so dass sich eine Triplexstruktur ausbildet [Kuhn et al., 1999]. Mit der mRNA kommt es zur Ausbildung eines sehr stabilen Heteroduplex und zu einer Translationsinhibition ohne die für viele Oligonukleotide typische Auslösung der RNase H-Aktivität.

2.2.1.4. Klinische Studien

Es befinden sich viele Oligonukleotide, insbesondere Phosphorothioate, in den verschiedenen Phasen klinischer Studien.

Das erste Oligonukleotid (Phosphorothioat) wurde 1999 für die von Cytomegalieviren (CMV) induzierte Retinitis in den Markt eingeführt. Um einen ausreichenden Wirkspiegel zu erreichen, musste die Substanz zu Beginn dreimal wöchentlich und später alle zwei Wochen intravitreal appliziert werden, so dass Novartis aus kommerziellen Gründen im Sommer 2002 auf die weitere Vermarktung verzichtete. Dies hat jedoch nicht zum Abbruch der Forschung

geführt, denn in den nächsten sechs Monaten rechnet man in den USA mit der Zulassung eines weiteren Phosphorothioats (Genasense™, Oblimersen Natrium). Es ist gegen bcl-2 gerichtet und wird in Kombination mit Dacarbazin zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms eingesetzt. In einer Arbeit von Jahrsdorfer et al. wird dieser Antisensemechanismus allerdings in Frage gestellt. Ein innerhalb der Sequenz vorkommendes CpG-Motiv ruft in den Versuchen eine CpG-typische Immunstimulation hervor [Jahrsdorfer et al., 2002]. Es verdeutlicht, welches großes therapeutisches Potential in den CpG-Motiven für die Tumorthherapie steckt, aber es zeigt auch die Schwierigkeit auf, einen einwandfreien Antisense-Mechanismus herauszuarbeiten.

Die nachfolgende, aus der Literatur zusammengestellte Tabelle über Antisense-Oligonukleotide, die sich zur Zeit in der klinischen Erprobung befinden, zeigt das große Interesse an dieser Wirkstoffklasse besonders auf dem Onkologie-sektor auf.

Tabelle 2-1: Antisense-Oligonukleotide in der klinischen Prüfung

PTO:Phosphorothioat, AC: Advanced Chemistry Oligonucleotides, NSCLC: non small cell lung cancer, CLL: chronische lymphatische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie [Jansen and Zangemeister-Wittke, 2002, Dean and Bennett, 2003]

Oligonukleotid	mRNA Target	Chemie	Indikation	Entwicklungsstand
Fomivirsen	antiviral	PTO	CMV Retinitis	Zulassung zurückgenommen
Oblimersen	BCL-2	PTO, 18-mer	Melanom, CLL, NSCLC	Zulassung beantragt
Affinitac (ISIS 3521)	PKC α	PTO, 20-mer	NSCLC, Solide Tumore	Klinische Phase III
Alicaforsen (ISIS 2302)	ICAM 1	PTO	Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa	Klinische Phase III Klinische Phase II
ISIS 14803	antiviral		Hepatitis C	Klinische Phase II
ISIS 2503	Ha-RAS	PTO, 20-mer	Solide Tumoren	Klinische Phase II
ISIS 5132	c-RAF	PTO, 20-mer	Solide Tumoren	Klinische Phase I / II
OGX-011 (ISIS 112989)	Clusterin	AC, 21-mer	Prostatakrebs, NSCLC	Klinische Phase I / II
GEM 231	PKA-R1- α	AC, 18-mer	Solide Tumoren	Klinische Phase II
LR / INX-3001	c-MYB	PTO, 24-mer	CML	Klinische Phase I / II

GTI-2040	Ribonukleotid reduktase	PTO, 21-mer	Solide Tumoren	Klinische Phase II
MG-98	DNA-methyl transferase	AC, 20-mer	Solide Tumoren	Klinische Phase II
OL (1) p53	p53	PTO, 20-mer	AML	Klinische Phase I
BCR-ABL AS	BCR-ABL	PTO, 26-mer	CML	Klinische Phase I
LErafAON	c-RAF-Kinase	PTO	Radiodiagnostika	Klinische Phase I / II
AP 12009	TGF-B2	PTO	Glioblastom	Klinische Phase III
Oncomyc-NG	c-myc	Morpholin	Krebs	Klinische Phase I / II
Angiozyme	VEGF	siRNA	Krebs	Klinische Phase I / II
ISIS 104838	TNF- α	AC	Rheumatoide Arthritis, Psoriasis	Klinische Phase II
ISIS 13312	antiviral	AC	CMV Retinitis	Klinische Phase I / II
GTI 2501		AC	Krebs	Klinische Phase I / II
GEM 92	gag	AC	HIV	Klinische Phase I / II
ISIS 113715	PTP-1B	AC	Diabetis	Klinische Phase I
ISIS 13650	c-RAF	AC	Diab. Retinopathie	Klinische Phase I
ISIS 107248	VLA-4	AC	Multiple Sklerose	Klinische Phase I
ISIS 23722	Survivin	AC	Krebs	Präklinik

2.3. Trägersysteme

2.3.1. Nanopartikel

2.3.1.1. Definition

Nanopartikel sind feste, kolloidale Teilchen, die in einem Größenbereich von 1 - 1000 nm liegen. In Abhängigkeit von der Art des eingeschlossenen Wirkstoffes, der in gelöster oder dispergierter Form vorliegen kann, unterscheidet man verschiedene Trägersysteme. Prinzipiell kann der aktive Stoff adsorptiv oder kovalent an die Trägerstoffe gebunden werden. Man spricht von Nanopellets, wenn der Wirkstoff in der Matrix eingeschlossen vorliegt. Befindet er sich im Kern und wird von einer Hülle umschlossen spricht man von Nanokapseln. Die Art des Ausgangsstoffes - verwendet werden natürliche (Proteine,

Polysaccharide u. a.) oder synthetische Makromoleküle (Polyacrylsäure und Derivate, Polymilchsäure und Kondensate) - bestimmt die Herstellungsmethode, wobei Polymerisationsverfahren oder Dispersionstechniken eingesetzt werden.

2.3.1.2. Oberflächeneigenschaften und Körperverteilung

Die ersten Nanopartikel wurden durch radikalische Emulsionspolymerisation aus Acrylamid hergestellt [Birrenbach and Speiser, 1976]. Seit ihrer Entwicklung in den 70-iger Jahren haben diese Trägersysteme zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sie gegenüber herkömmlichen Arzneiformen einige Vorteile haben [Kramer, 1974, Kreuter and Speiser, 1976]. Im Vordergrund stehen ihre kleine Größe, die maßgeblich die Körperverteilung beeinflusst, der Schutz vor Wirkstoffabbau, eine zielgerichtete („site specific drug delivery“) kontrollierte Arzneistofffreisetzung, Akkumulation am Zielort sowie die Verbesserung der Bioverfügbarkeit. Sie lassen sich oral, lokal an Auge und Nase applizieren, aber am häufigsten werden sie parenteral angewendet. Daneben sollte ein ideales Trägersystem lagerstabil, einfach und kostengünstig herzustellen sein, eine hohe Arzneistoffbeladung verschiedenartiger Wirkstoffe ermöglichen, untoxisch, nicht allergisierend oder immunisierend und biodegradierbar sein.

Nach intravenöser Gabe zeigt sich in anschließenden Körperverteilungsstudien, dass die im Blut zirkulierenden Partikel sehr schnell von den phagozytierenden Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) erkannt, aufgenommen und abgebaut werden. Es kommt zu einer Anreicherung vor allem in der Leber (60 – 90%), aber auch in Milz (2 - 10%), Lunge (3-10%), dem Knochenmark (5%) und den Nieren. Die Nanopartikelaufnahme in die Zellen wird erleichtert durch die Anlagerung von Blutbestandteilen. Hierbei spielen vor allem Opsonine, Fibrin und Fibrinogen eine Rolle [Kreuter, 1983, Furumoto et al., 2002]. Das Ausmaß der Zellinvasion wird sowohl von der Partikeldurchmesser als auch von den Oberflächeneigenschaften wie Ladung und Hydrophilie beeinflusst. Es zeigt sich, dass Nanopartikel mit einem negativen oder neutralen Zetapotential deutlich schwächer phagozytiert werden als positiv geladene [Gupta and Hung, 1989, Lin et al., 1999]. Das oberflächliche Überziehen von Nanopartikeln mit Emulgatoren bewirkt eine Abschirmung der Ladung und eine Erhöhung der Hydrophilie. Unerwünschte Interaktionen mit negativ geladenen Erythrozyten,

die zu einer Agglomeration, Ausbildung von Thromben und im schlimmsten Fall zu einer Embolie führen, können so vermieden werden.

Bei Polystyrolpartikeln wurde durch einen nichtionischen Emulgatorüberzug (Poloxamer) eine verminderte Phagozytose beobachtet [Illum and Davis, 1984, Kreuter, 1991]. Auch eine vorhergehende adsorptive Absättigung mit Albumin, dem Hauptbestandteil des Blutes, oder mit Glykoproteinen führte zu einer um 50% verringerten Aufnahme in die Leberzellen [Kreuter, 1983].

In einer weiterführenden Arbeit wurde der Einfluss der Größe von Polystyrolpartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen Poloxamer 407 überzogen waren untersucht [Stolnik et al., 2001a]. Erfasst wurde die prozentuale, oberflächliche Bedeckung, deren Filmdicke und die Konformation, die die Polyethylenglykolketten des Emulgators einnehmen. Die Interaktionen der Nanopartikel mit Serumkomponenten und ihr Schicksal im biologischen System wurde in Körperverteilungsstudien in Ratten untersucht. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Steigerung der Emulgatorfilmdicke verursacht durch steigende Polyethylenglykolumenge in der adsorbierten Schicht, zu einer engeren Packung auf der Oberfläche führt. Die dichter belegte Oberfläche vermindert deutlich die Interaktion mit Serumproteinen, wobei es nicht nur zu einer quantitativen sondern auch zu einer qualitativen Verschiebung kommt. Bei einer zu 25% mit Poloxamer 407 belegten Oberfläche adsorbieren keine hochmolekularen Proteine mehr an die Polystyrolpartikel. Der Effekt ist bei den kleinsten Nanopartikeln (40 nm) am stärksten ausgeprägt, weil sie im Verhältnis zu den größeren (70 und 137 nm) die größte spezifische Oberfläche besitzen.

In der Arbeit von Gessner et al. wurde durch 2D-Gelelektrophorese gezeigt, dass auch das Proteinadsorptionsmuster auf Latexpartikeln sich quantitativ und qualitativ mit einer abnehmend hydrophoberen Oberfläche verschiebt [Gessner et al., 2000]. Die Anlagerung von Albumin, IgG, Fibrinogen und Apolipoprotein A-IV wird deutlich vermindert. Vermutlich bewirkt auch die Art der funktionellen Gruppe und ihre sterische Größe einen Unterschied in der Proteinbesetzung.

Für Polystyrolpartikel wurde der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit und der Nanopartikeldurchmesser (93 - 1010 nm) auf die Zellaufnahme in verschiedenen Zelllinien untersucht. Es wurden für die verschiedenen Größenbereiche Unterschiede in der Zellaufnahme festgestellt. Im Hinblick auf einen

optimalen Partikeldurchmesser ergaben sich verschiedene Grenzwerte bei den einzelnen Zelltypen. Die Internalisierungskapazität war in starkem Ausmaß von dem Zustand der Zellkultur (Zelldichte und Wachstumsbedingungen) abhängig. Konfluente Zellrasen nahmen deutlich weniger Partikel auf bzw. verloren die Fähigkeit zum Teil ganz, große Partikel aufzunehmen [Zauner et al., 2001]. Die in verschiedenen Publikationen gemachten unterschiedlichen Aussagen bezüglich des Einflusses auf den Partikeldurchmesser auf die Zellaufnahme, können durch abweichende Zelltypen und Zellkulturbedingungen bedingt sein. Bisher gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, welche Partikeldurchmesser als optimal für Aufnahme und Verteilung anzusehen ist.

Bioabbaubare pegylierte Polymilchsäure-Copolymere wurden zusätzlich zur Körperverteilung in Ratten auf die Freisetzungskinetik von inkorporiertem bovinem Serumalbumin (BSA) hin untersucht. Die Halbwertszeit der BSA-Freisetzung wurde um das 20-fache auf 4,5 Stunden erhöht und die Organverteilung wurde zu deutlich höheren Blutplasmawerten hin verschoben, während der Transport in Leber und Milz merklich absank [Li et al., 2001].

Viele weitere Arbeiten, in denen die unterschiedlichsten Trägersysteme getestet wurden, beschäftigen sich mit der Veränderung der Körperverteilung und der Erhöhung der Verweildauer im Organismus. Durch kovalente oder adsorptive Bindung von Polyethylenglykolen in die Matrix oder an die Oberfläche wird die Elimination stark verlangsamt, die Erfolge hinsichtlich einer veränderten Distribution fallen leider weniger deutlich aus.

2.3.2. Nanopartikel auf Proteinbasis

Zu Beginn der partikulären Trägersystementwicklung wurde der Focus auf die synthetischen Ausgangsmaterialien gelegt. Die hierbei eingesetzten Monomere wurden durch Polymerisation zu längeren Molekülketten umgesetzt, die zurückbleibenden reaktiven Monomere und Lösungsmittel wurden wegen ihrer eventuellen toxischen Eigenschaften sorgfältig abgetrennt. Nachteilig ist die häufig sehr langsame Degradation, damit verbunden ist eine langsame Elimination, die zur Akkumulation im Körper führt. Eine Ausnahme bilden hier die Polybutylcyanoacrylatpartikel [Vezin and Florence, 1980]. Im biologischen System stellt die zumeist nur adsorptive Arzneistoffbeladung ein weiteres Problem dar,

weil diese oberflächliche Bindung leicht durch Blutbestandteile oder Verschiebung des Gleichgewichtes nach dem Massenwirkungsgesetz zerstört werden kann [Illum et al., 1984, Arnedo et al., 2002].

Als Alternative wurden Verfahren zur Trägersystemherstellungen aus natürlichen Makromolekülen entwickelt. Die hier vorgestellten Nanopartikel auf Proteinbasis sind untoxisch, werden gut durch körpereigene Enzyme abgebaut und sind auch nicht, wie anfänglich vermutet, immunogen [Morimoto and Fujimoto, 1985]. Wegen der peptidischen Zusammensetzung können zurückbleibende, freie funktionelle Gruppen kovalent mit Arzneistoffen oder anderen Stoffen verknüpft werden.

Hauptsächlich kommen bovines oder humanes Serumalbumin und Gelatine zum Einsatz, Casein und Chitosan spielen bisher nur eine untergeordnete Rolle [Allemann et al., 1993, Kreuter, 1994, Cheung et al., 2001].

2.3.2.1. Humanes Serumalbumin (HSA)

Albumin stellt mit 40 - 50 mg/mL die Hauptkomponente des Blutes dar und ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und des pH-Wertes beteiligt. Neben der starken Bindungsaffinität zu vielen Arzneistoffen sind Fettsäuren, Bilirubin, Stickstoffmonoxid und SH-aktive Verbindungen wie Cystein oder Glutathion u. a. natürliche Liganden.

Es handelt sich um ein Protein mit bekannter Aminosäuresequenz und definierter räumlicher Struktur, bestehend aus 585 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 65.000 g/mol. Es weist einen hohen Anteil an geladenen, und mit 35 Cysteinen auch an SH-haltigen Aminosäuren auf, die jedoch bis auf eine alle als Disulfidbrücken im Molekül vorliegen.

Serumalbumin hat einen isoelektrischen Punkt von 5,3 und ist daher in neutraler Lösung stark negativ geladen. Bei pH-Wertwechseln treten Konformationsänderungen auf. Bei pH 4 kommt es zu einer merklichen Abnahme der Löslichkeit und einer starken Viskositätserhöhung der Lösung durch Proteinfaltung, die mit einem gravierenden Verlust an helikalen Strukturanteilen einhergeht.

Die ersten Mikrosphären aus Albumin wurden erstmals 1969 beschrieben [Pasqualini et al., 1969]; noch im selben Jahr wurde ihre Verteilung in der Lunge untersucht [Rhodes et al., 1969].

Neben einer Wirkstoffbeladung über kovalente Strukturen kann auch der hohe Anteil an geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin) für eine elektrostatische Bindung von negativ oder positiv geladenen Molekülen ausgenutzt werden. Die Bindung an vorgeformte Nanopartikel führt im biologischen System häufig zu einer raschen Freisetzung, erfolgt die Adsorption jedoch vor der Partikelherstellung an das noch gelöste Ausgangsmaterial, ist vermutlich eine Inkorporation des Arzneistoffes zu erreichen.

2.3.2.2. Gelatine

Gelatine wird aus tierischem Ausgangsmaterial (Häuten, Knochen, Bindegewebe, Knorpel und Schwarte) durch saure oder alkalische Spaltung gewonnen. Je nach verwendetem Hydrolyseverfahren wird aus dem Kollagen Gelatine vom Typ A (acid), die einen isoelektrischen Punkt zwischen pH 7 und 8,5 aufweist, oder Gelatine vom Typ B (base), die einen isoelektrischen Punkt im Bereich zwischen pH 4,5 und 5,0 hat.

Durch das heterogene Ausgangsmaterial variiert Gelatine in der Aminosäurezusammensetzung und dadurch auch stark in ihrem nicht näher definierten Molekulargewicht. Sie besteht zu 95% aus Aminosäuren. Den größten Anteil hat Glycin mit ca. 33%, Prolin und Hydroxyprolin mit 20%, saure Aminosäuren mit 12 – 19% und auffallend ist der hohe Anteil an basischen Aminosäuren 7,5 – 15% [Bauer K., 1999]. Ein wichtiges pharmazeutisches Qualitätsmerkmal ist die Gelbildungseigenschaft, angegeben in Bloom, die vom Gelatinetyp, der Temperatur und Ionenstärke abhängt. Gelatine A weist im allgemeinen höhere Bloomzahlen auf als Typ B, wobei die Lösung vom Typ A bei gleichen Bloomwerten eine geringere Viskosität aufgrund kürzerer Ketten hat. Das Geliervermögen kann mit der Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt werden [Thomas et al., 1992].

Kollagen setzt sich aus mehreren Ketten zusammen, die im tierischen Organismus in größeren Vorstufen synthetisiert werden. Die sogenannten Vorläuferketten sind am Amino- und am Carboxylende mit zusätzlichen Peptiden verknüpft und werden als Propeptide bezeichnet. Untereinander sind sie über Disulfidbrücken verbunden, so dass die Zusammenlagerung von jeweils drei Ketten zu einer Tripelhelix erleichtert ist. Man spricht von Tropokollagen, wenn die Propeptide von Proteasen außerhalb der Zelle abgespalten

wurden. Die Kollagenfasern sind durch eine 40 nm große Lücke voneinander getrennt und die benachbarten Reihen sind um 68 nm gegeneinander versetzt. Im letzten Schritt wird das Tropokollagen durch kovalente, intermolekulare Verknüpfungen stabilisiert, und es entsteht ein Faserbündel. Weitere intramolekulare Verbindungen bilden sich durch Reaktion eines Hydroxylysinrests mit einem Lysin zum Hydroxypyridinium aus.

2.3.3. Herstellungsmethoden für proteinbasierte Nanopartikel

Man unterscheidet prinzipiell zwei Herstellungsverfahren, die zur Bildung von Mikro- oder Nanopartikeln führen:

- Zweiphasensystem

Das Protein wird hierfür in Wasser gelöst und in einem lipophilen Lösungsmittel (Baumwollsamöl oder organisches Lösungsmittel) unter Ausbildung einer W / O Emulsion dispergiert [Longo et al., 1982, Gallo et al., 1984, Longo and Goldberg, 1985, Kreuter, 1991, Roser and Kissel, 1993, Kreuter, 1994]. Die Nanopartikel können durch Zusatz einer Aldehydlösung (Form- oder Glutaraldehyd) oder durch Hitzeeinwirkung denaturiert und quervernetzt werden.

- Solvent Deposition

Das Protein wird aus einer wässrigen Lösung durch Entzug der solvatbildenden Lösungsmoleküle durch Zusatz eines Nichtlösungsmittels, pH-Wertverschiebung, Ladungsveränderungen oder durch Salzzugabe ausgefällt. Der Desolvationsprozess kann durch ein kurzfristiges Abnehmen und späteres Zunehmen des Trübungsgrades überwacht werden. Stabilisiert werden die Systeme entweder durch Zusatz einer Aldehydlösung oder durch Hitzedenaturierung [Marty et al., 1978, C. Q. Chen et al., 1994].

2.3.4. Drug-Targeting-Strategien

Als Drug-Targeting bezeichnet man das gezielte Heranbringen eines Wirkstoffs an seinen Zielort. Auf dem Weg dorthin müssen verschiedene biologische

Barrieren (Organe, Gewebe und intrazelluläre Kompartimenten) umgangen werden. Es soll zu einer Arzneistoffanreicherung in einer bestimmten Region kommen, so dass die Dosis und die Nebenwirkungen verringert werden.

Schon vor 100 Jahren hatte Paul Ehrlich als Erster die Vision von Zauberkugeln („magic bullets“), die einen bestimmten Ort im Körper finden sollten.

Im Laufe der Zeit wurden viele verschiedene Träger für Arzneistoffe wie lösliche Polymere, Mikrokapseln, Nanopartikel, Zellen, Lipoproteine, Liposomen und Mizellen getestet. Sie werden eingesetzt zu diagnostischen Zwecken sowie zur Behandlung von Krankheiten. Körperverteilungsstudien nach intravenöser Applikation haben gezeigt, dass kolloidale Träger vorrangig in den Organen des retikuloendothelialen Systems (RES) und damit in den Organen Leber, Milz, Lunge, Knochenmark und Nieren akkumulieren. Diese Gewebe verfügen über eine große Zahl an phagozytierenden Zellen, die zu einer schnellen Elimination der Trägersysteme führen. Für eine gezielte Anreicherung in anderen Geweben oder Zellen des Körpers müssen die Nanopartikel modifiziert werden. Die Affinität zu ausgesuchten Zielzellen soll erhöht, gleichzeitig die Interaktion mit Nicht-Zielzellen vermindert, die Akkumulation in der Leber reduziert und die Clearance erniedrigt werden.

Die Anreicherung im RES kann jedoch auch von Vorteil sein, zum Beispiel bei der HIV-Erkrankung. Makrophagen stellen hier ein Rückzugsareal für das Virus dar und entziehen sich so den antiviralen Wirkstoffen erfolgreich [Bender et al., 1996, C. Coester et al., 2000].

Man kann prinzipiell vier verschiedene Targetingstrategien unterscheiden [Torchilin, 2000]:

- Einbringen des Systems durch *direkte Applikation* [Williams et al., 1996]
- *Passive Akkumulation* in Geweben, die über ein durchlässiges Gefäßendothel verfügen (Entzündungen, Tumoren), können selbst von relativ großen Trägern wie Liposomen und Mizellen (10 - 500 nm) überwunden werden. Die Gefäßpermeabilität ist abhängig vom Grad der Schädigung und zusätzlich kommt es durch einen verminderten Lymphabfluss zur Ansammlung von Trägersystemen im Gewebe. Dieser Effekt wird als „enhanced permeability and retention effect“ (EPR-Effekt) bezeichnet [Maeda et al., 2000]. Die

Zirkulationszeit von Liposomen, Nanopartikeln und Mizellen im Blut kann durch das Einarbeiten oder Überziehen mit Polyethylenglykolketten verlängert werden [Maruyama et al., 1995, Weissig et al., 1998, Dosio et al., 2001, Li et al., 2001, Kaul and Amiji, 2002].

- Auf *physikalischem* Weg durch veränderte physiologische pH-Werte oder Temperaturunterschiede, wie sie in tumoralem oder entzündeten Gewebe auftreten. Methotrexat wurde in temperaturempfindliche Liposomen verpackt und intravenös in Mäuse, die einen okulären Tumor tragen, appliziert. Der Wirkstoff wurde unter Erwärmen der betroffenen Region wesentlich schneller freigesetzt [Weinstein et al., 1979]. Ähnliche Effekte wurden auch mit pH-sensitiven Liposomen beobachtet [Mizoue et al., 2002]. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung ferromagnetischer Träger dar, die in einem äußerlich angelegten magnetischen Feld ausgerichtet werden. Der Blutfluss und die Stärke des magnetischen Feldes bestimmen den Erfolg. In einem Gefäß mit kleinem Durchmesser und einem langsamen Fluss kommt es zu einer stärkeren Akkumulation [Widder and Senyei, 1983].
- *Vektormoleküle*, gekoppelt an einen Träger, stellen einen physiologischen und universalen Ansatz dar, da sie über eine hohe Spezifität zum Zielort verfügen. Eingesetzt werden können Antikörper und deren Fragmente, Lektine, Proteine, Lipoproteine, Hormone, geladene Moleküle, Mono-, Oligo- oder Polysaccharide und diverse andere Liganden [Reilly et al., 1995, Pagnan et al., 1999]. Ausgesucht werden Liganden, die selektiv für einen bestimmten Zelltypen sind. Sie sollen von Rezeptoren, die in überexprimierter Form vorliegen erkannt, stabil gebunden und als Gesamtkomplex internalisiert werden. Am weitesten verbreitet sind Antikörper, die in einer sehr großen Vielzahl vorkommen und gekennzeichnet sind durch eine hohe Spezifität und Affinität zur Bindungsstelle. Als Träger hingegen werden die unterschiedlichsten Systeme aus den verschiedensten Materialien eingesetzt.

Am Beginn der Entwicklung stand die direkte Kopplung von Antikörpern an Immunotoxine. Nachteilig ist hierbei die geringe Beladungskapazität, weil pro

Targeting-Ligand immer nur ein Toxin transportiert werden kann. Davon abgesehen spricht die generell von solchen Konjugaten ausgehende immunologische Gefahr gegen ihren Einsatz [Vitetta et al., 1983, Tazzari et al., 2001]. Ihre antitumoralen Effekte waren *in vitro* ganz Erfolgsversprechend, aber im Tiermodell lieferten sie nur enttäuschende Ergebnisse. Einen alternativen Ansatz stellt die Entwicklung bispezifischer, monoklonaler Antikörpern dar, die in der Lage sind, ein Toxin und ein tumorassoziertes Antigen gleichzeitig zu erkennen [Glennie et al., 1988, Wickham et al., 1997].

Einen wesentlich erfolgreicherem Lösungsansatz bieten die vielen löslichen und partikulären Transporter aus verschiedenen synthetischen und natürlichen Polymeren, da sie aufgrund ihrer größeren Oberfläche mehrere Targeting-Liganden und Wirkstoffmoleküle binden können [O'Neill et al., 2001, Lee et al., 2002]. Zur Gruppe der partikulären Träger zählen Mikro-kapseln oder –sphären [Stolnik et al., 2001a, Stolnik et al., 2001b], Nanopartikel [Marty et al., 1978, A. Rolland et al., 1987, A. Rolland et al., 1987, Truong-Le et al., 1999], Liposomen [H. H. Huang, 1980, A. Huang et al., 1982, Shen et al., 1982, Trubetskaya et al., 1988, Crosasso et al., 1997], Mizellen, nichtvirale Vektoren [Truong-Le et al., 1999, Deas et al., 2002] und zelluläre Vehikel. Sie bieten die Möglichkeit, Oberflächeneigenschaften und Teilchengröße zu variieren und sie den unterschiedlichen physiologischen Gegebenheiten anzupassen [Stayton et al., 2000]. Die Trägersysteme werden über einen endozytotischen Mechanismus in das Zellinnere aufgenommen und gelangen zuerst in endosomale Kompartimente. Bisher scheitern viele Vehikel an dem sogenannten „endosomal escape“, d.h. einem Entkommen aus den Endosomen, bevor sie dort abgebaut werden. Für die Oligonukleotide ist jedoch der Übertritt ins Zytoplasma, an den Wirkort essentiell für einen Antisense-Effekt.

Es gibt verschiedene Strategien zur Lösung des Problems. Für die Herstellung nichtviraler Vektoren wird häufig lineares oder verzweigtes kationisches Polyethylenimin (PEI), welches über endosomolytische Eigenschaften verfügt, mit negativ geladener DNA kondensiert [Rhaese et al., 2003]. Unter physiologischen Bedingungen liegen die PEI-Aminogruppen zum Teil protoniert vor und besitzen dadurch eine beachtliche Pufferkapazität. Nach Verschmelzen eines Endosoms mit einem Lysosom zum sogenannten Endolysosom kommt es zur Ansäuerung des Kompartiments und das Polymer fungiert als

„Protonenschwamm“. Man vermutet, dass es zu einem osmotisch bedingten Anschwellen des Endolysosoms und zu einer Freisetzung des Inhaltes durch Membranruptur kommt [Boussif et al., 1995, Dokka et al., 1997, Kircheis et al., 1997]. Ein solcher Effekt ist auch bei Zusatz der schwachen Base Chloroquin zu beobachten [Fischer et al., 2001]. Verwendung finden auch Konjugate mit pH-sensitiven Crosslinkern und pH-empfindliche, liposomale Zubereitungen [Tachibana et al., 1998, Cheung et al., 2001, Lackey et al., 2002, Mizoue et al., 2002, Turner et al., 2002]. Kombiniert werden Liposomen und nichtvirale Vektoren weiterhin mit fusogenen Peptiden, die selbst auch pH-abhängige Komponenten darstellen können [Deshpande et al., 1996, Hughes et al., 1996]. Bei fusogenen Peptiden handelt es sich um Aminosäuresequenzen, die zuerst bei Viren entdeckt wurden. Mit ihrer Hilfe kann man nicht nur in Zellen eindringen, sondern sie ermöglichen auch das Entkommen aus dem Endosom bzw. Lysosom. Sie wandern ein ins Zytoplasma und können von dort in den Zellkern vordringen, da sie gleichzeitig zumeist auch eine Kernlokalisationssequenz (NLS) enthalten.

Nachdem man verschiedene Aminosäuresequenzen viraler fusogener Peptide untersucht hat, konstruierte man mit dieser Erkenntnis synthetische Vertreter.

HIV verfügt mit dem tat-Protein über eine solche Verbindung. Gemein ist ihnen die große Anzahl basischer Aminosäuren [Fawell et al., 1994, Vives et al., 1997, Mastrobattista et al., 2002]. Die Reihenfolge spielt wie bei der Antennapedia-Sequenz (Antp) aus der Drosophila Fliege [Derossi et al., 1996, Derossi et al., 1998] teilweise keine Rolle. Für die Wirkung reichen 8 - 16 Aminosäuren des ursprünglichen Peptids aus [Wagner, 1999].

Eine Verknüpfung aus PNA und Antp wurde schon erfolgreich zur Aufnahme in Knochenmarkszellen eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein erfolgreiches Antisense-Konstrukt, da es zur Inhibition von Galaninrezeptoren auf der Membranoberfläche und einer verminderten Galaninbindung führt. Bei den untersuchten Ratten macht sich der Effekt durch die Inhibition der C-Fasern, die zu einer Unterbrechung der Schmerzweiterleitung führt, bemerkbar [Pooga et al., 1998].

Auch für HSA sind fusogene Eigenschaften bei unphysiologischen pH-Werten von 4 in Gegenwart von Liposomen beschrieben [Sato et al., 1999].

2.3.5. Anti-CD3 Antikörper

Wie im vorangegangenen Kapitel 2.3.4. beschrieben wird in dieser Arbeit, entsprechend den physiologischen Gegebenheiten, eine stabile Antikörper-komplexbindung an die Oberfläche von proteinbasierten Nanopartikeln als Ziel angestrebt. Durch Variationen in der Wahl des Antikörpers erhält man immer wieder ein sehr zellspezifisches, selektives und maßgeschneidertes Trägersystem, welches universell eingesetzt werden kann. Als Zielstruktur soll ein Rezeptor ausgewählt werden, der internalisiert wird, so dass das Trägersystem über eine rezeptorvermittelte Endozytose das Zytosol erreichen kann. Der Startschuss für diese Entwicklung wurde gelegt, seit man mit Hilfe von Hybridomen gegen nahezu jede Substanz und in unbegrenzter Menge monoklonale Antikörper bekannter Spezifität und homologer Struktur herstellen kann. Dadurch haben Antikörper, nicht nur in die Forschungslabore, wo sie zur Isolierung, Reinigung und Detektion eingesetzt werden, sehr schnell Eingang gefunden, sondern auch in den Bereich der Diagnostik und in zunehmendem Maße auch in die Arzneimitteltherapie [Kohler and Milstein, 1975].

Bei dem ersten als Arzneimittel zugelassenen Antikörper handelt es sich um den murinen OKT3-Antikörper Orthoclone[®] (Muromonab-CD3, Cilag), der zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation eingesetzt wird. Es ist ein biochemisch gereinigtes IgG_{2A}-Immunglobulin, bestehend aus zwei schweren Ketten von ~50 kDa und zwei leichten Ketten von ~25 kDa. OKT3 richtet sich gegen die CD3 ϵ -Kette, blockiert so die T-Zellaktivierung und die Signaltransduktion. Die Zellproliferation wird inhibiert durch Hemmung der individualspezifischen Histokompatibilitätsantigene (MHC, Major Histocompatibility Complex) der Klasse I und II. Die T-Lymphozyten werden teilweise durch OKT3 opsonisiert und durch das retikuloendotheliale System entfernt. So kommt es innerhalb weniger Minuten zur Elimination zirkulierender CD3⁺-Zellen aus dem Organismus, die jedoch nach Absetzen des Medikamentes schnell wieder nachgebildet werden. Da 40 - 50% der Patienten gegen den therapeutischen Antikörper eine Immunreaktion aufzeigen, werden heute nur noch vollständig humanisierte Antikörper zugelassen. Die Abwehrreaktion wird ausgelöst durch anti-Antikörper, die entweder gegen die konstante Region (anti-Maus-Isotyp Antikörper) oder gegen die variable Region (anti-Idiotyp Antikörper) gerichtet sind. Im ersten Fall ist die Antigenbindungsstelle noch

funktionstüchtig und die Wirkung des OKT3 wird nicht reduziert. Im zweiten Fall hingegen wird die anti-Antikörperbindung von OKT3 an den CD3-Komplex des T-Zellrezeptors (TZR) auf der Oberfläche von Lymphozyten verhindert, so dass die Wirksamkeit neutralisiert wird.

Schon seit längerem verfolgt man über Antikörperbindung an partikulärer Trägersysteme eine spezifische Zellaufnahme. [Leserman et al., 1980a, Leserman et al., 1980b, Leserman et al., 1980c, Illum and Davis, 1984, Illum et al., 1984, A. Rolland et al., 1987, Akasaka et al., 1988]. Die Affinität für wirkstoffbeladene Trägersysteme zur Zielregionen soll durch rezeptorvermittelte Endozytose erhöht werden, so dass das Trägersystem mit dem Wirkstoff ins Zytosol gelangt, wo dieser freigesetzt wird und akkumulieren kann.

Säugetierzellen haben im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Internalisierungsprozessen entwickelt, um die verschiedensten Stoffe aufnehmen zu können. Hinter dem Oberbegriff der Endozytose verbergen sich die Phagozytose, Pinozytose und die rezeptorvermittelte Endozytose, die in Abhängigkeit einer Vesikelbildung („clathrin coated pits“) oder auch ohne erfolgt. Sie spielt eine bedeutende Rolle u.a. bei der Aufnahme von Nährstoffen, Regulation der Rezeptorexpression und der Antigenpräsentation, aber auch bei einigen Erkrankungen wie Atherosklerose und Diabetes. Dieser Mechanismus wird ebenso von Viren, Toxinen und Bakterien als Eintrittspforte zum Befall von Zellen genutzt. Die durch Phagozytose in Makrophagen aufgenommenen Partikel und die rezeptorvermittelte Endozytose über „clathrin coated pits“, gehören zu den am Besten charakterisierten Mechanismen. Nach der Internalisierung werden viele eingeschleuste Moleküle abgebaut oder wieder an die Zelloberfläche befördert. Manche von ihnen entgehen diesem Schicksal, indem sie sich durch den Dschungel der verschiedenen Zellorganellen durchkämpfen und bis ins Zytoplasma vordringen; ausschlaggebend sind die physikalischen und chemischen Merkmale des internalisierten Stoffes (Aminosäuresequenz, pH-Optimum, Rezeptordissoziation).

Die „clathrin coated pits“ wurden erstmals von Roth und Porter in Moskitooocyten entdeckt [Roth and Porter, 1964]. Proteine, die über diesen Weg in die Zelle gelangen, werden durch den starken Konzentrationsanstieg in den Vesikeln schnell von der Membranoberfläche entfernt. Die Zellrezeptorinteraktion wird gesteuert durch intrazelluläre Proteine, die Zytoplasmamotive

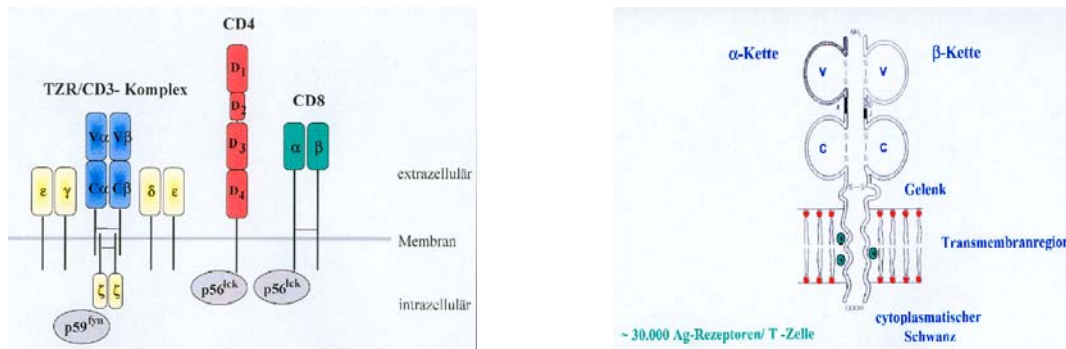
erkennen, die selbst Bestandteil der „clathrin coated pits“ sein können. Für den CD3-Komplex scheint das Dileucinmotiv der CD3 γ -Kette für die T-Zellrezeptoraufnahme und die spätere Aufnahme in Lysosomen verantwortlich zu sein [Letourneur and Klausner, 1992b, a]. Es interagiert direkt mit dem Adaptinkomplex (AP2), der entscheidend an der Ausbildung von „clathrin coated pits“ beteiligt ist und erst bei der Rezeptoraggregation ausgebildet wird. Manchmal können auch im Vorfeld schon Vesikel vorhanden sein, die dann die Fracht aufnehmen [Mukherjee et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde als Modells substanz ein monoklonaler anti-CD3 Antikörper (anti-CD3 AK) ausgewählt, der das CD3-Antigen des T-Zellrezeptorkomplexes auf T-Lymphozyten erkennt. Im Unterschied zu Makrophagen zählen Lymphozyten nicht zu den phagozytierenden Zellen und können kolloidale Trägersysteme daher lediglich über eine rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen. Durch die Internalisierung des Rezeptorkomplexes soll der Nanopartikel in das Zellinnere transportiert werden.

T-Lymphozyten bilden zusammen mit den B-Lymphozyten die zweitgrößte Gruppe der Leukozytenpopulation und sind für die spezifische zelluläre Immunantwort im Organismus verantwortlich. Durch ihre Oberflächenrezeptoren sind sie auf die Erkennung von fremden Antigenen spezialisiert. Man unterteilt die T-Lymphozyten in zwei Hauptklassen, die zytotoxischen T-Zellen, die auf direktem Wege die von Viren oder Mikroorganismen befallenen Zellen abtöten, und die Helfer-T-Zellen, die durch die Freisetzung von Lymphokinen, Interleukinen oder Zytokinen in die Immunreaktion von Makrophagen und B-Zellen eingreifen. Aktiviert werden die T-Lymphozyten nur über direkten Zell-Zell-Kontakt, so dass der sogenannte T-Zellrezeptor (TZR), der mit den invarianten Proteinen des CD3-Komplexes assoziiert ist, nur membranständig vorkommt. Auf einer T-Zelloberfläche kommen etwa 20.000 solcher Rezeptoren vor.

Der Rezeptorkomplex besteht insgesamt aus acht Polypeptidketten, wobei immer zwei Ketten über Disulfidbrücken zu einem Heterodimer, der Antigenerkennungsstelle (TZR α/β), miteinander verbunden sind. Jede dieser α/β -Ketten setzt sich aus etwa 280 Aminosäuren zusammen, die eine Ig-ähnliche Struktur aufweisen und aminoterminal eine variable (V) und carboxyterminal eine konstante (C) Domäne aufweisen (Abbildung 2-3).

Abbildung 2-3: T-Zellrezeptor und Corezeptoren Struktur der Antigenbindungsstelle



Publiziert in Elsevier Science / Garland Publishing 1999

Eine kleine Minderheit der Rezeptoren, die sich in Haut- und Darmepithelzellen befindet, bildet einen anderen Typ aus. Da die beiden Ketten des Heterodimers selbst über keine größere Zytoplasmadomäne verfügen, die nach der Bindung an eine Antigen-präsentierende Zelle (APZ) die Signalübertragung in der Zelle auslösen könnte, übernimmt der assoziierte, transmembranäre CD3-Komplex, der sich aus den drei Proteinketten CD3 γ (25 kDa), CD3 δ (20 kDa), CD3 ϵ (20 kDa) zusammensetzt, diese Aufgabe. Es fügen sich jeweils zwei nicht kovalente Dimere zu der Einheit CD3 $\gamma\epsilon$ und CD3 $\delta\epsilon$ zusammen. Kodiert werden sie von gekoppelten Genen.

Des weiteren ist noch eine CD3 ζ -Proteinfamilie (16 kDa), die über Disulfidbrücken verbundene Homo- oder Heterodimere ausbildet, assoziiert. Diese reichen mit ihrem größten Molekülteil weit in das Zytoplasma hinein [Klausner et al., 1990]. Die Zytoplasmadomänen der CD3-Proteine verfügen alle wenigstens über ein doppeltes Tyrosin- und Dileucinmotiv (CD3 γ , δ , ϵ Ketten) oder wie CD3 ζ , welche sie in dreifacher Kopie besitzt. Die Aminosäure Tyrosin ist Bestandteil der verschiedenen, sogenannten ITAM (Immunreceptor Tyrosine based Activation Motif), die nach der Rezeptorstimulation zuerst durch Tyrosinkinasen (Fyn-Protein) phosphoryliert werden. Die im Zytosol vorkommende Phospholipase C führt zu einer Aktivierung der Inositol-Phospholipid-Signalkaskade [Letourneur and Klausner, 1992b, a, Jose and Alarcon, 1999]. Sie ähneln in ihrer Struktur dem Bindungsmotiv des Adaptinproteins (AP-2), das bei der Rezeptorinternalisierung mit „clathrin coated pits“ interagiert. Weiter regulieren die Polypeptidketten des CD3-Komplexes den Zusammenbau und das

Erscheinen des TZR auf der Zelloberfläche, wobei die CD3 γ / δ Verbindung eine besondere Rolle übernimmt [Luton et al., 1997, Jose and Alarcon, 1999].

Weist nur eine dieser drei Ketten einen durch einen Expressionsfehler verursachten Defekt auf, kommen weniger TZR auf der Zelloberfläche vor und die Patienten leiden an einer Immunschwäche. Ähnliches lässt sich für Zellmutanten beobachten, denen die Proteinkette ζ fehlt.

Der CD3-Komplex steht mit dem TZR über die sauren, negativ geladenen Aminosäuren der CD3-Proteinketten und die basischen, positiv geladenen Aminosäuren der transmembranären Domäne, über eine Salzbrücke in Verbindung.

Die T-Zellen erkennen Antigene nur, wenn sie ihnen abgebaut als Peptidfragment angeboten werden. Die Fragmente müssen, um an die Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zellen gelangen zu können, an MHC-Moleküle gebunden werden. Die Affinität des TZR gegenüber dem MHC-Komplex ist für eine funktionstüchtige Wechselwirkung allein zu niedrig. Akzessorische Rezeptoren, die selbst keine Antigenbindung eingehen, aber zu einer intrazellulären Signalübertragung fähig sind, werden als Co-Rezeptoren bezeichnet. Zu den wichtigsten und am Besten untersuchten zählen der CD4- (Helfer-T-Zellen) und der CD8-Co-Rezeptor (zytotoxische T-Zellen). Sie besitzen eine einzige membranverankernde Sequenz und eine immunglobulinähnliche Domäne, die in den extrazellulären Raum hineinragt (Abbildung 2-3). Ihre Aufgabe ist es, die T-Zellen zu den MHC-Molekülen zu lenken, indem sie an invariante Teile der APZ binden. Ihr Zytoplasmaschwanz ist verbunden mit einer Tyrosinspezifischen Proteinkinase, dem sogenannten Lck-Protein, welches verschiedene zelluläre Proteine phosphoryliert. Außer zur Verstärkung der Zell-Zelladhäsion sind sie auch an der Entwicklung der T-Lymphozyten beteiligt.

Die Hauptaufgabe, die Erkennung von Antigenen, führt zu einer Aktivierung des Immunsystems. Bei der anschließenden Internalisierung ist eine Rezeptorabnahme, die sowohl durch Antigene als auch durch anti-CD3 AK induziert sein kann, zu beobachten. Nach Inkubation mit einem monoklonalen-anti-CD3 AK wurde eine gesteigerte endozytotische Aktivität durch eine Verkürzung des Endozytose- / Recyclingprozesses beobachtet [Krangel, 1987]. In einer der ersten Arbeiten wurde der Verbleib des Rezeptorkomplexes, nach Stimulation mit anti-CD3- und anti-TZR AK in Jurkat-Zellen untersucht. Die Zellen befanden

sich im Zustand der herunterregulierten Rezeptorphase. Es wurde gezeigt, dass beide AK mit einer ähnlichen Kinetik internalisiert und in einem sauren Kompartiment abgebaut werden [Schaffar et al., 1988]. Die Bindung des Antikörpers führt zu einer verringerten Rezeptordichte, so dass die Bindungskapazität und die Stimulationssensitivität während des 60 - 90 Minuten andauernden Endozytoseprozesses herabgesetzt ist.

Die Abnahme der Rezeptordichte ist ein Phänomen, das auch bei anderen membranständigen Rezeptoren, die über eine intrinsische oder assoziierte Tyrosinkinase verfügen, zu beobachten ist. Der Internalisierungsprozess könnte ähnlich wie bei B-Zellrezeptoren auch durch die Tyrosinreste der CD3-Untereinheiten ausgelöst werden, weil es ein klassisches Endozytosesignal darstellt. Als Kandidaten kommen auch die Dileucinmotive der CD3 γ und CD3 δ -Kette, die eine Induktion der Proteinkinase C (PKC) auslösen, in Frage. Es wurde belegt, dass CD3 ζ Ketten keine Rolle bei der lysosomalen Aufnahme spielen [Letourneur and Klausner, 1992b, a], sondern die Endozytose zumindest mit einer CD3 γ -Phosphorylierung einhergeht [Niedergang et al., 1997a, Niedergang et al., 1997b].

Weitere Untersuchungen manifestieren den Abbau des TZR-Heterodimers in Lysosomen, da der Abbau in Gegenwart von Cloroquin verhindert wird [Jose and Alarcon, 1999]. Es zeigt sich ein auf den ersten Blick unvereinbarer Widerspruch, weil die stöchiometrische Zusammensetzung des TZR / CD3-Komplexes, bei gleichzeitiger Abnahme des TZR-Heterodimers und stabil erscheinender Anzahl an CD3-Komplexen, konstant bleibt. Die Versuchsergebnisse lassen auf die Erneuerung der TZR-Heterodimere durch Neusynthese schließen, die wesentlich schneller abläuft als der Ersatz der CD3-Polypeptidketten. Verantwortlich für die Rezeptorregulation und den lysosomalen Abbau scheint die Tyrosinkinase vom Typ Lck zu sein. Die Datenlage lässt zu diesem Zeitpunkt, je nach Stimulationszustand und nach Antigenart, unterschiedliche Routen des Rezeptorkomplexes in der Zelle erkennen. Von Jose und Alarcon wird folgendes Modell postuliert [Jose and Alarcon, 1999]:

Nach der Internalisierung scheint es zur Dissoziation des TZR / CD3-Komplexes zu kommen. Der TZR wird nun in den Lysosomen abgebaut und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) neu synthetisiert. Der CD3-Komplex nimmt wahrscheinlich einen anderen endozytotischen Weg über die Endosomen. Mit

dem TZR kommt er entweder im Endosom, eventuell im ER oder erst an der Zelloberfläche wieder in Kontakt. Die Assoziation im ER entspräche der einfacheren Variante, da der Rücktransport von Peptiden, die über ein Tyrosin-signal verfügen, ähnlich den ITAMs der CD3-Untereinheiten vom Golgiapparat zum ER für andere Peptide schon gezeigt wurde.

Man hat festgestellt, dass die Dauer der Rezeptorabnahme von der Art des Stimulus beeinflusst wird. Anti-CD3- und auch einige anti-TZR AK induzieren bedingt durch die Endozytose über „clathrin coated pits“ eine langanhaltende Veränderung des Rezeptorstatus.

In neuen Experimenten versuchte man den vielfältigen Aufgaben der einzelnen CD3-Untereinheiten weiter auf die Spur zu kommen. Bei Untersuchungen mit zytotoxischen T-Lymphozyten, deren CD3 γ / δ -Ketten um die Zytoplasmadomäne verkürzt wurden, zeigte sich keine TZR-Internalisierung nach Antikörperbehandlung. Ergänzte man die beiden Zytoplasmadomänen wieder, wobei eine von beiden auch verkürzt sein kann, trat die Rezeptorabnahme wieder auf. Sie verläuft außerdem PKC abhängig, wie der Zusatz spezifischer Inhibitoren bewies [Luton et al., 1997].

In einer weiterführenden Arbeit wurde belegt, dass die durch APZ verursachte Rezeptorreduktion unbeeinflusst von dem Vorhandensein der Zytoplasmadomänen der CD3 γ / δ -Ketten und der PKC-Induktion erhalten bleibt [Legendre et al., 1999]. Sie sind also lediglich nach anti-CD3 Antikörperstimulation für die Internalisierung und das lysosomale Targeting des TZR verantwortlich.

Lauritsen et al. [Lauritsen et al., 1998] haben herausgefunden, dass das Herunterregulieren durch einen spezifischen Liganden (APZ) oder die Aktivierung von PKC über zwei unabhängig voneinander ablaufenden Mechanismen passiert. Die ligandeninduzierte Regulation läuft im Zusammenspiel mit Proteintyrosinkinase p56(lck) und p59(fyn) aber unabhängig von PKC und CD3 γ -Dileucinmotiven ab. Genau umgekehrt verhält es sich bei der PKC induzierten Rezeptorabnahme durch anti-CD3 AK. In verschiedenen anderen Studien wurde bei Zellen, die nicht über das CD3 γ -Dileucinmotiv verfügen und in welchen die PKC auch ohne Tyrosinkinase aktiv ist, ebenfalls eine Verringerung der TZR-Anzahl beobachtet [Luton et al., 1997, Legendre et al., 1999]. Diese Annahme der geteilten Wege gibt Rätsel auf.

Dieses beschriebene These wurde nicht nur in Frage gestellt, sondern später auch widerlegt. Nach Bindung an den TZR konnte sowohl die Tyrosinphosphorylierung als auch der PKC-CD3 γ -Dileucinmotive abhängige Weg aktiviert werden [v Essen et al., 2002].

Dass die vielbeschworene Rezeptorabnahme überhaupt auf Ligandenbindung (APZ) beruht, wird in der Arbeit von Liu et al., im Gegensatz zu vielen anderen widerlegt [Liu et al., 2000]. Die Internalisierung kann ihrer Meinung nach primär nicht durch die Ligandenbindung verursacht werden, da sie viel zu schnell eintritt. Sie vermuten stattdessen, dass es zu einer veränderten Rezeptorkomplexzusammensetzung kommt. Da die Rezeptorabnahme mit und ohne Ligandenbindung gleich stark ausgeprägt ist, sehen sie in diesem Vorgang keine Voraussetzung für die T-Zellaktivierung; außerdem ist der zeitliche Abstand zwischen Tyrosinphosphorylierung und Rezeptorabnahme zu groß. Dies würde die zuvor von Jose und Alarcon gemachte widersprüchliche Beobachtung einer TZR-Abnahme bei konstant bleibender CD3-Komplexzahl bei gleichbleibender stöchiometrischer Zusammensetzung erklären. Die Zelle wird durch die TZR-Abnahme lediglich vor einer Überstimulation und der Organismus so eventuell vor einem extensiven antigeninduzierten Zelltod geschützt. Die hohe Internalisierungsrate erleichtert vielleicht lediglich die Ablösung des MHC-Peptidkomplexes vom TZR. Weiter schließen sie nicht aus, dass die CD3-tragenden Tyrosinketten eine Doppelfunktion erfüllen, indem sie sowohl das Recyceln als auch die Signaltransduktion vermitteln. Das schnelle Recyceln der Tyrosinmotive ist essentiell, damit sie wieder dem Prozess der Phosphorylierung zugeführt werden können.

Abschließend kann man resümieren, dass zum jetzigen Zeitpunkt trotz vieler Bemühungen, weder die TZR-Dynamik noch das Zusammenspiel mit dem CD3-Komplex vollständig aufgeklärt sind. Es existieren viele ungeklärte Fragen welche Aufgaben den einzelnen Polypeptidketten bei der komplexen Rezeptoraktivierung zukommen.

Der T-Zellrezeptor steht, auch in Abwesenheit von Liganden, in einem beständigen Gleichgewicht zwischen Synthese, Sekretion, Internalisierung, Recycling und Abbau von Polypeptidbestandteilen. Die einzelnen Untergruppen unterscheiden sich in der intrazellulären Dynamik.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage Supermicro S4	Sartorius
Brutschrank Cytoperm	Heraeus
CLSM:	
Leica DM IRBE	Leica
Bildbearbeitungssoftware Lucia Version 3.0	Laboratory Imaging
FACSCalibur	Becton-Dickinson
CellQuestPro	Becton-Dickinson
FluoStar Galaxy	BMG Labtechnologies
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300	Nikon
GPC-Anlage:	
Pumpe W600 E	Waters
Autosampler AS100	Thermoseparation Products
UV-Detektor W486	Waters
Integrationssystem Maxima 825	Waters
TSKgel G 3000 SWXL, 7,8 mm x 30 cm Säule	Toso Haas
HPLC-Anlage	
Pumpe L6220	Merck Hitachi
Autosampler AS2000 A	Merck Hitachi
Diode Array Detector L4500	Merck Hitachi
Interface D6000 A	Merck Hitachi
Degasser ERC3315	Merck Hitachi
Mixer	Hitachi
DNA Pac PA-100, 4 x 250 mm Säule	Dionex
Lichtmikroskop	Nikon

Mini-Protean-II-Apparatur	Bio-RAD
Minizentrifuge Galaxy	VWR
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Spektralphotometer U-3000	Hitachi
Trockenschrank	Ehert
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät	Bandelin Sonorex
Ultrazentrifuge L-70	Beckman
Vortex Genie 2	Scientific Industrie
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5417	Eppendorf
Zetasizer 3000 HSA	Malvern

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

3MM Filterpapier 3-lagig	Fa. Whatman
Adhäsionsobjektträger, Poly-Prep Slides	Sigma
D-Salt™ Dextran Desalting Column	Pierce
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll
96-well Mikrotiterplatten	Greiner / Nunc
Mikrovial (100 µL Probenvolumen)	Merck
Protran® BA85, Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll
Sigma Screen™ Streptavidin HC coated micro plate	Sigma
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette (MWCO 3500)	Pierce
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schüll
UVette® 220 – 1600 nm	Eppendorf
Zählkammer (Kova®)	Hycor Biomedicals

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Sofern keine anderen Angaben gemacht sind, wurden Chemikalien in p. a. Qualität eingesetzt und alle Lösungen wurden mit Milli Q-Wasser hergestellt.

Aceton	Merck
Dimethylsulfoxid 99,9% (DMSO)	Merck
Ethanol reinst	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Caelo
γ -Globulin (156 kDa)	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumperchlorat	Merck
Ovalbumin (43 kDa)	Sigma
p-Aminobenzoessäure (137 Da)	Sigma
Proteinase K	Merck
Ribonuklease A (13,7 kDa)	Sigma
Thyreoglobulin (660 kDa)	Sigma
Tween [®] 20	Roth

3.1.3.1. Nanopartikelherstellung und Modifikationen

Avidin (Av)	Molecular Probes
Alexa [™] Fluor546 goat anti-mouse IgG AK	Molecular Probes
Bicinchoninic acid protein kit (BCA-Reagenz)	Pierce
Biotin	Fluka
Biotin-4-Fluorescein (B4F)	Molecular Probes
L-Cystein x HCl	Sigma
Dithiotreitol (DTT)	Fluka
5,5`-Dithio-bis-(2-nitrobenzoessäure), Ellmans-Reagenz	Pierce
Gelatine A (porcine skin, 175 bloom)	Sigma
Glutaraldehyd 25%	Fluka
Humanes Serumalbumin (HSA), Fraktion V	Sigma
4-Hydroxyazobenzon-2-carboxylsäure (HABA)	Sigma
2-Iminothiolan x HCl (Trauts Reagenz)	Pierce
Sulfo-m-maleinimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-MBS)	Pierce
MicroBCA protein kit	Uptima Interchim
Mouse anti-human CD3 AK, biotinyliert	Calbiochem
Mouse IgG ₁ AK, biotinyliert	Calbiochem
NeutrAvidin [™] (NAv)	Pierce

NeutrAvidin™ Fluorescein (NAv-FITC)	Pierce
N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS-Biotin)	Pierce
SH-Oligonukleotide / Phosphorothioate (SH-ODN / PTO)	Qiagen / MWG-Biotech
Trastuzumab (Herceptin®)	Roche Diagnostic
2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)	Sigma

3.1.3.2. SH-Oligonukleotide (SH-ODN) und Phosphorothioate (PTO)

Die thiolierten Oligonukleotide (SH-ODN) und PTO wurden HPLC gereinigt und lyophilisiert bezogen. Die Substanzen wurden mittels HPLC, nach Auflösen in Milli Q-Wasser, auf ihre Qualität und photometrisch (260 nm) auf den Gehalt hin überprüft. Die Lösungen wiesen eine Konzentration von 2000 - 3000 µg/mL auf, die sich auf folgender Berechnungsgrundlage ergab:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs.} \times 33 \times \text{Gesamtvolumen } \mu\text{L} / \text{Volumen ODN } \mu\text{L}$$

Die Stammlösungen wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Bei der Darstellung der Sequenz (siehe Tabelle 3-1) entsprechen große Buchstaben unmodifizierten ODN und kleine Buchstaben PTO-Modifikationen. Zur Kontrolle wurde eine Sequenz mit willkürlich festgelegter Sequenzabfolge (scrambled = sc) eingesetzt.

Die Antisensesequenz ist komplementär zu der mRNA des Transaktivatorproteins (trans activator of viral transcription, Tat) und hybridisiert im Bereich des Translationsinitiationskodons am 5'Ende des HIV-1. Im Verlauf der Arbeit wurde die Sequenz um 5 Basen verlängert, um die Spezifität zu erhöhen.

Tabelle 3-1: Für Bindungsversuche eingesetzte Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')	Modifikation	Hersteller
anti tat	cta gga tct act ggc tcc at	PTO (20 mer)	MWG-Biotech
anti tat sc	tca cgt cgt agc tgt cat ac	PTO (20 mer)	MWG-Biotech
anti tat biotin	Bio-cta gga tct act ggc tcc at	PTO (20 mer) 5' Biotin	MWG-Biotech Qiagen
anti tat sc biotin	Bio-tca cgt cgt agc tgt cat ac	PTO (20 mer) 5' Biotin	MWG-Biotech Qiagen
AS tat	SH-ATC TAC TGG CTC CAT	ODN (15 mer) 5' Thiol-Modifier C6	MWG-Biotech Qiagen
sc tat	SH-ACG TAG CTT ACT CTC	ODN (15 mer) 5' Thiol-Modifier C6	MWG-Biotech Qiagen

3.1.3.3. Herstellung eines löslichen Konjugats (HSA-SS-ODN)

Pyridin-2-thion, 2-Mercatopyridin Sigma
 Sulfosuccinimidyl 6-[3'-(2 pyridyldithio)-propionamido] hexanoat
 (Sulfo-LC-SPDP) Pierce

3.1.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Acrylamid / Bisacrylamid 40% (29 / 1) Sigma
 Ammoniumpersulfat (APS) Sigma
 Anti-mouse IgG AK (goat) alkalische Phosphatase Calbiochem
 Bovines Serumalbumin (BSA) PAA-Laboratories
 5-Brom-4-chlor-3-indolyphosphat (BCIP) AppliChem
 Bromphenolblau AppliChem
 Coomassie Brilliant Blue R250 AppliChem
 N,N-Dimethylformamid (DMF) Sigma
 Dimethylsulfoxid 99,9% (DMSO) Fluka
 Glycerin 86% Roth
 Glycin (für Elektrophorese) Merck
 Magnesiumchlorid Wasserfuhr
 Molekulargewichtsmarker (6,5-175 kDa) BioLab

Natriumdodecylsulfat (für Elektrophorese, SDS)	AppliChem
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (NaEDTA)	Roth
Nitroblue Tetrazolium (NBT)	AppliChem
Ponceau S	AppliChem
Tetramethyldiamin (TEMED)	AppliChem
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Ultrapur 99,9%, TRIS)	AppliChem

3.1.4. Zellkultur

3.1.4.1. Zelllinien

Zelllinie HeLa (Grey et al, Cancer Res. 12: 264 (1952))

Die Zellen wurden 1951 einer 31 Jahre alten Patientin aus einem Cervixkarzinom (Epithelgewebe) entnommen. Sie stellen die erste aneuploide, kontinuierlich kultivierte humane Zelllinie dar.

Zelllinie CEM: [Foley et al., 1965]

Humane lymphozytäre Leukämiezelllinie, die aus dem peripheren Blut eines an akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) erkrankten drei Jahre alten kaukasischen Mädchens 1964 isoliert wurden. Es handelt sich um die erste kultivierte humane lymphozytäre Zelllinie.

Zelllinie Jurkat: [Schneider et al., 1977]

Humane lymphozytäre Leukämiezelllinie, die 1976 aus dem peripheren Blut eines an akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) erkrankten 14 Jahre alten Jungen entnommen wurden.

Zelllinie MCF-7: [Soule et al., 1973]

Humane Adenokarzinomzelllinie, die 1970 einer 69 Jahre alten Frau mit einem metastasierenden Mammakarzinom, nach einer Hormon und Strahlentherapie aus dem Pleuralraum entnommen wurden. Sie verfügen über einen zytoplasmatischen Östrogenrezeptor.

3.1.4.2. Reagenzien der Zellkultur

Zytotoxizitäts-Test (MTT)

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (1x 4,5 mg / L Gluc., Na-pyruvat, o. Glutamin)	Gibco
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA-Laboratories
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Mikrozid®	Schleicher & Schüll
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Penicillin / Streptomycin (100X)	PAA-Laboratories
Triton-X 100	Sigma
Trypsin / EDTA (10x)	Gibco

Antikörper-vermittelte Zellaufnahme

Lymphozytäre Zelllinien

RPMI 1640 (w/o Glutamin)-Medium	Gibco
L-Glutamin	Gibco
MEM Natriumpyruvat	Gibco
Penicillin / Streptomycin	Gibco
Trypsin / EDTA	Gibco

Alle eingesetzten Einmalartikel wurden von der Firma Nunc bezogen.

Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM)

Concanavalin A Alexa® Fluor594 Konjugat	Molecular Probes
1,4-Diazabicyclo [2,2,2] octan (DABCO)	Fluka
Glycerol 25%	Merck
Mowiol® 488	Sigma
Vectashield® Medium	Vector Laboratories

3.1.5. Puffer und Lösungen

3.1.5.1. Nanopartikelmodifikationen

<i>Tris-Puffer pH 8,5</i>	<i>Tris</i>	<i>6,056 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>8,768 g</i>
	<i>NaEDTA</i>	<i>0,372 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

Aktivierung von Av / NAv

<i>PBS-Puffer pH 7,0</i>	<i>Natriumdihydrogenphosphat x H₂O</i>	<i>1,069 g</i>
	<i>di-Natriumhydrogenphosphat x 2H₂O</i>	<i>2,158 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>8,766 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

Aktivierung von HSA

<i>PBS-Puffer pH 7,0</i>	<i>Natriumdihydrogenphosphat x H₂O</i>	<i>1,069 g</i>
	<i>di-Natriumhydrogenphosphat x 2H₂O</i>	<i>2,158 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>8,766 g</i>
	<i>NaEDTA</i>	<i>3,72 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

<i>PBS-Puffer pH 7,5</i>	<i>Natriumdihydrogenphosphat x H₂O</i>	<i>2,3 g</i>
	<i>di-Natriumhydrogenphosphat x 2H₂O</i>	<i>16,8 g</i>
	<i>NaEDTA</i>	<i>3,72 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

<i>PBS-Puffer pH 8,0</i>	<i>Natriumdihydrogenphosphat x 2H₂O</i>	<i>0,2 g</i>
	<i>di-Natriumhydrogenphosphat x 2H₂O</i>	<i>3,53 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

<i>TEA-Puffer pH 8,0</i>	<i>Triethanolamin</i>	<i>7,46 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>8,766 g</i>
	<i>NaEDTA</i>	<i>0,372 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>
<i>B4F-Puffer pH 7,5</i>	<i>Natriumdihydrogenphosphat x H₂O</i>	<i>6,89 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>5,844 g</i>
	<i>NaEDTA</i>	<i>0,372 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

3.1.5.2. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)-Fließmittel

PTO-Trennung

Milli Q-Wasser (A)

<i>NaOH 250 mM (B)</i>	<i>Natriumhydroxid 2 M</i>	<i>125 mL</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

<i>NaClO₄ 1 M (C)</i>	<i>Natriumperchlortat x H₂O</i>	<i>122,46 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>

Tabelle 3-2: Gradientenprofil für ODN / PTO

Zeit	Fließmittel A	Fließmittel B	Fließmittel C
0	90	10	0
1	90	10	0
15	45	10	45
19	0	10	90
20	90	10	0
30	90	10	0

HPLC-Untersuchungen für SH-ODN erfolgen mit dem gleichen Fließmittelgemisch wie unter 3.1.5.2. für die PTO-Trennung beschrieben.

Tabelle 3-3: Gradientenprofil für SH-ODN

Zeit	Fließmittel A	Fließmittel B	Fließmittel C
0	90	10	0
1	90	10	0
15	42	10	48
20	10	10	80
25	10	10	80
30	90	10	0

3.1.5.3. Gelpermeationschromatographie (GPC)-Fließmittel

<i>Natriumdihydrogenphosphat x H₂O</i>	5,116 g
<i>di-Natriumhydrogenphosphat x 2H₂O</i>	11,479 g
<i>Natriumsulfat</i>	14,204 g
<i>Milli Q-Wasser</i>	ad 1000 mL

3.1.5.4. Quantifizierung der Antikörperbindung

3.1.5.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

<i>4x Lower Gel-Puffer pH 8,8</i>	<i>Tris (1,5 M)</i>	90,9 g
	<i>SDS (0,4%)</i>	2,0 g
	<i>Milli Q-Wasser</i>	ad 500 mL

<i>Lower Gel 7,5%</i>	<i>4x Lower Gel Puffer pH 8,8</i>	0,875 mL
	<i>Acrylamid Lösung</i>	3,5 mL
	<i>Milli Q-Wasser</i>	9,575 mL
	<i>TEMED</i>	5 µL
	<i>APS (50 mg in 500 µL MQ)</i>	50 µL

<i>4x Upper Gel-Puffer pH 6,8</i>	<i>Tris (0,5 M)</i>	15,14 g
	<i>SDS (0,4%)</i>	2,0 g
	<i>Milli Q-Wasser</i>	ad 250 mL

<i>Upper Gel</i>	<i>4x Upper Gel Puffer pH 6,8</i>	<i>313 µL</i>
	<i>Acrylamid Lösung</i>	<i>500 µL</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>4,138 mL</i>
	<i>TEMED</i>	<i>5 µL</i>
	<i>APS (50 mg in 500 µL MQ)</i>	<i>16 µL</i>
<i>10x SDS-Laufpuffer pH 8,8</i>	<i>Glycin (1,9 M)</i>	<i>144 g</i>
	<i>Tris (0,25 M)</i>	<i>30,3 g</i>
	<i>SDS (1%)</i>	<i>10 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>
<i>4x Probenpuffer</i>	<i>4x Upper Gel Puffer pH 6,8</i>	<i>1,2 mL</i>
	<i>Glycerin 86%</i>	<i>3,0 mL</i>
	<i>SDS 10%</i>	<i>1,98 mL</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>2,6 mL</i>
	<i>Bromphenolblau 1%</i>	<i>1,0mL</i>
<i>Transferpuffer pH 8,3</i>	<i>Tris (25 mM)</i>	<i>3,03</i>
	<i>Glycin (192 M)</i>	<i>14,4 g</i>
	<i>Methanol 20%</i>	<i>200 mL</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>
<i>Coomassie Färbelösung</i>	<i>Coomassie® Brillant Blue</i>	<i>0,1 mg</i>
	<i>Eisessig</i>	<i>10 mL</i>
	<i>Methanol</i>	<i>10 mL</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 100 mL</i>
<i>Entfärberlösung</i>	<i>Eisessig</i>	<i>10 mL</i>
	<i>Methanol</i>	<i>10 mL</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 100 mL</i>

Material und Methoden

<i>10x TBS-Puffer</i>	<i>Tris (100 mM)</i>	<i>12,12 g</i>
	<i>SDS (1,5 M)</i>	<i>87,66 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>
<i>TTBS-Puffer</i>	<i>10x TBS-Puffer</i>	<i>100 mL</i>
	<i>Tween[®] 20</i>	<i>0,5 mL</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>
<i>Detektionspuffer pH 9,5</i>	<i>Tris</i>	<i>7,88 g</i>
	<i>Natriumchlorid</i>	<i>2,92 g</i>
	<i>Magnesiumchlorid</i>	<i>0,238 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 500 mL</i>
<i>Substratpuffer</i>	<i>NBT (50 mg/mL in DMF 70%)</i>	<i>330 µl</i>
	<i>BCIP (50 mg/mL in DMF)</i>	<i>170 µl</i>
	<i>Detektionspuffer pH 9,5</i>	<i>50 mL</i>
<i>Stopp-Puffer</i>	<i>1x TBS-Puffer</i>	<i>250 mL</i>
	<i>NaEDTA (0,5 M)</i>	<i>1,0 mL</i>
 3.1.5.4.2. Fluoreszenzspektroskopie		
<i>PBS-Puffer pH 7,4</i>	<i>Natriumdihydrogenphosphat x 2H₂O</i>	<i>1,36 g</i>
	<i>di-Natriumhydrogenphosphat x 2H₂O</i>	<i>36,18 g</i>
	<i>Milli Q-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>
<i>Waschpuffer</i>	<i>Tween[®] 20</i>	<i>0,2 mL</i>
	<i>PBS-Puffer pH 7,4</i>	<i>ad 100 mL</i>

3.2. Herstellung der Nanopartikel

3.2.1. Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA-NP)

Herstellung der Nanopartikelmatrix

Die Herstellung unbeladener Nanopartikel (NP) basiert auf der von Weber et al. [C. Weber et al., 2000b] entworfenen modifizierten Desolvationsvorschrift, die in Anlehnung an die von Marty et al. entwickelt wurde [Marty et al., 1978].

Dazu wurden 200 mg Humanes Serumalbumin (HSA) in 2 mL Milli Q-Wasser (MQ) gelöst. Die 10%ige Lösung wurde unter permanentem Rühren auf einer Magnetrührplatte (400 - 500 U/min) tropfenweise mit 6,0 mL Ethanol 96% versetzt. Die erhaltenen NP wurden anschließend durch die Zugabe von 235 µL Glutaraldehydlösung 8% (entspricht 200% bezogen auf die 60 Aminogruppen pro HSA-Molekül) quervernetzt und der Suspension wurde 6 - 12 Stunden Zeit gegeben sich zu stabilisieren.

Die Aufreinigung der NP erfolgte durch 5-faches Zentrifugieren (16.000 g / 8 min) der zuvor in 2 mL Ansätze aliquotierten Suspension. Anschließend wurde der Überstand (Üb) abgenommen und das Pellet durch Behandlung im Ultraschallbad in dem gleichen Volumen MQ wieder resuspendiert. Die gewaschenen Ansätze wurden wieder vereinigt und bezüglich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.), des Zetapotentials (siehe 3.3.3.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.2.2. Inkorporative Wirkstoffbindung von Phosphorothioaten (HSA-PTO-NP)

Antisense-Oligonukleotide sind kurze einzelstrangige DNA- oder RNA-Fragmente, die aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste an neutrale HSA-Moleküle gebunden wurden.

Für die Herstellung wurden 330 µL einer 2%-igen wässrigen HSA-Lösung (20 mg/mL) mit 0,05 N HCl auf einen pH von 5,5 – 6,0 eingestellt und mit 100 µg PTO versetzt. Die Lösung wurde unter Rühren bei 300 U/min 20 min auf einer Rührplatte stehen gelassen, bevor sie durch sehr langsame und tropfenweise Zugabe von 900 µL Ethanol 96% desolvatisiert wurde.

In Anlehnung an die Herstellungsvorschrift für unbeladene HSA-NP wurden die sich bildenden HSA-PTO-NP mit Glutaraldehydlösung 2% zu 200, 100 oder

40%, bezogen auf die 60 Aminogruppen pro HSA-Molekül, quervernetzt. Bei der gewählten Ansatzgröße entsprach dies einem Volumen von 31 μL , 15,5 μL oder 6,2 μL Aldehydlösung.

Der Suspension wurde 6 - 12 Stunden Zeit gegeben sich zu stabilisieren. Die Aufreinigung der NP erfolgte durch 3faches Zentrifugieren (16.000 g / 6 min). Anschließend wurde der Üb abgenommen und der ungebundene und der inkorporierte Wirkstoffanteil mittels HPLC erfasst (siehe 3.3.5.). Das Pellet wurde durch Behandlung im Ultraschallbad in 1 mL MQ resuspendiert.

Der gewaschene Ansatz wurde bezüglich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.), des Zetapotentials (siehe 3.3.3.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.2.3. Lösliches Konjugat aus HSA und modifizierten Oligonukleotiden (HSA-SS-ODN)

Durch den Einsatz eines wasserlöslichen, hetero-bifunktionalen Crosslinkers wurden über eine Disulfidbrücke thiolmodifizierte ODNs an HSA gebunden.

3.2.3.1. Proteinaktivierung mit hetero-bifunktionalem Crosslinker

Für die Umsetzung wurden 50 mg HSA in 600 μL PBS (10 mM NaEDTA) pH 7,0 gelöst und 6,8 mg Crosslinker Sulfo-LC-SPDP in 450 μL des Puffers gelöst. Von der Crosslinkerlösung wurden 400 μL abgenommen, was einem 15-fachen molaren Überschuss entspricht, und der HSA-Lösung zugefügt. Die Proteinlösung wurde 1 h / 20°C und bei 400 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach der Umsetzung wurde die überschüssige Menge an Crosslinker durch Größenausschlusschromatographie mit einer 10 mL D-SaltTM Dextransäule abgetrennt. Das gesamte Probenvolumen von 1 mL wurde auf die mit PBS-Puffer konditionierte Säule aufgetragen und mit Aliquoten von 1 mL Puffer eluiert. Aufgefangen wurden die Fraktionen 1 – 8, die photometrisch bei 220 nm auf ihren Proteingehalt hin untersucht wurden. Die Fraktionen 5 und 6, in welchen das aufgereinigte Protein auftauchte, wurden vereinigt und der Gehalt wurde gravimetrisch unter Berücksichtigung der Puffersalze bestimmt (siehe 3.3.1.).

3.2.3.2. Quantifizierung des gebundenen Crosslinkers (Sulfo-LC-SPDP)

Durch Umsetzung mit Dithiotreitol (DTT) wurde das photometrisch bei 343 nm detektierbare Pyridin-2-thion des Crosslinkers Sulfo-LC-SPDP abgespalten, somit wurde die an HSA gebundene Molekülanzahl bestimmbar.

50 μL der aktivierten Proteinprobe (aHSA) wurden mit 20 μL DTT-Lösung 0,2 M, unter Zusatz von 130 μL PBS-Puffer pH 7,5, über 1 h / 20°C und bei 400 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Nach der Umsetzung wurde die Probe in einer UVette[®] photometrisch vermessen und der Gehalt an freiem Pyridin-2-thion berechnet. Als Bezugspunkt wurde eine Verdünnungsreihe von Pyridin-2-thion im Bereich von 0-0,2 mM eingesetzt. Als Kontrollen dienten außerdem eine DTT-Lösung und eine HSA-Lösung (5%), die genauso umgesetzt wurden wie die Vollprobe und zur Korrektur von den Messwerten herangezogen wurden.

3.2.3.3. Reduktive Spaltung des SH-ODN

Die zur Qualitätskontrolle des SH-ODNs durchgeführte HPLC-Untersuchung zeigte, dass das Lyophilisat zum großen Teil schon direkt nach dem Lösen als Dimer vorlag. Aus diesem Grund wurde der Kopplungsreaktion eine reduktive Spaltung mit DTT vorangestellt. Eingesetzt wurden 1000 μg SH-ODN ($1,596 \times 10^{-7}$ mol), die mit einem 500 bis 650-fachen molaren Überschuss einer 0,3 M wässrigen DTT-Lösung, 1 h / 15°C im Thermomixer umgesetzt wurden.

Um das überschüssige DTT-Reagenz zu entfernen, wurde die Probe durch mehrmaligen Wasserwechsel in einer Dialysekammer mit einer Ausschlussgrenze von 3.500 Da (MWCO 3.500) für 24 Stunden und im Dunkeln dialysiert.

Als Kontrollen dienten eine DTT-Lösung und eine SH-ODN-Probe ohne DTT-Zusatz, die genauso umgesetzt und aufgereinigt wurden wie die Vollprobe.

Die Umsetzungseffizienz wurde mit Ellmans Reagenz (siehe 3.4.2.) überprüft. Von der SH-ODN-Probe wurden 30 μL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit 262 μL PBS pH 7,5 versetzt und mit Ellmans Reagenz (2 mg/mL) auf 300 μL ergänzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 min wurde die Lösung photometrisch in einer UVette[®] vermessen. Als Eichgerade wurde eine frisch hergestellte L-Cystein-Stamm-lösung (0,05%) in PBS-Puffer pH 7,5 verwendet. Die höchste Standardkonzentration der zu messenden Lösung entsprach $1,009 \times 10^{-8}$ mol Cystein.

3.2.3.4. Konjugation von SH-ODN an aktiviertes HSA

Für die aktivierte Proteinlösung wurde gravimetrisch (siehe 3.3.1.) ein Gehalt im Bereich von 15 - 20 mg/mL ermittelt. Die Umsetzung wurde mit einer SH-ODN-Lösung, deren Gehalt zuvor photometrisch bestimmt wurde und im Bereich von 900-1250 µg/mL lag, in einem molaren Mengenverhältnis von SH-ODN zu aHSA 1,4 : 1 durchgeführt. Der Ansatz wurde mit PBS-Puffer (10 mM NaEDTA) pH 7,5 auf 500 µL aufgefüllt. Als Kontrollen wurden aHSA-Lösungen mit und ohne DTT-Zusatz in der selben Konzentration eingesetzt. Zur Ermittlung des adsorptiven Bindungsanteils wurde eine HSA-Lösung der selben Konzentration mit SH-ODN versetzt. Die Reaktionszeit betrug 3 h / 20°C im Thermomixer, bevor die Lösungen bei 343 nm im Photometer vermessen und die Probenwerte unter Berücksichtigung der Kontrollen ausgewertet wurden. Als Eichgerade wurde eine Pyridin-2-thion-Lösung im Bereich von 0,1 - 0,01 mM eingesetzt.

3.2.3.5. Nanopartikelherstellung aus löslichem Konjugat (HSA-SS-ODN-NP)

Da die Ausbildung von HSA-NP durch Desolvatation nur in einem fast salzfreien Medium (10 mM NaCl wird toleriert) erfolgen kann, wurden die Proben nach der Konjugation wieder 24 Stunden in einer Dialysekammer, Ausschlussgrenze 3.500 Da (MWCO 3.500), im Dunkeln, gegen Wasser dialysiert.

Die Lösung des Konjugats wurde tropfenweise mit der 3-fachen Menge Ethanol 96% unter Rühren bei 300 U/min desolvatisiert. Die sich ausbildenden NP wurden mit Glutaraldehydlösung 2% stabilisiert. Stöchiometrisch wurde, bezogen auf die 60 Aminogruppen eines jeden HSA-Moleküls, die doppelte Aldehydmenge eingesetzt.

Der Suspension wurde 6 - 12 Stunden Zeit gegeben sich zu stabilisieren. Die Aufreinigung der NP erfolgte durch 3-faches Zentrifugieren (16.000 g / 5 min). Anschließend wurde der Üb abgenommen und das Pellet durch Behandlung im Ultraschallbad in 1 mL MQ resuspendiert. Der gewaschene Ansatz wurde bezüglich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.), des Zetapotentials (siehe 3.3.3.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert

3.2.4. Nanopartikel aus Gelatine A (Gel-NP)

Die Herstellung unbeladener NP basierten auf der von Coester et al. [C. J. Coester et al., 2000] modifizierten Desolvatationsmethode, die in Anlehnung an die von Marty et al. [Marty et al., 1978] beschriebene Vorschrift weiterentwickelt wurde.

Dazu wurden 500 mg Gelatine A in 10 mL MQ suspendiert und unter Erwärmen auf dem Wasserbad, bei 50°C gelöst. Anschließend wurden in einem Schwung 10 mL Aceton zugesetzt und die zugedeckte Lösung bei RT stehen gelassen, bis sie sich auf 23 - 25°C abgekühlt hatte. Das sich ausbildende Sediment wurde durch Dekantieren vom Üb abgetrennt und erneut in 10 mL MQ durch Erwärmen auf 50°C gelöst. Die Proteinlösung wurde mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt. Die etwa 5%-ige Lösung wurde unter permanentem Rühren auf einer Magnetrührplatte (400 - 500 U/min) tropfenweise mit 40 mL Aceton versetzt. Die erhaltenen NP wurden anschließend durch die Zugabe von 200 µl Glutaraldehydlösung 25% quervernetzt und der Suspension wurde 12 Stunden Zeit gegeben sich zu stabilisieren.

Die Aufreinigung der NP erfolgte durch 5-faches Zentrifugieren (16.000 g / 8 min) der zuvor in 2 mL Ansätze aliquotierten Suspension. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet, durch Behandlung im Ultraschallbad in einem Viertel des Ausgangsvolumens in MQ wieder resuspendiert. Die gewaschenen Ansätze wurden wieder vereinigt und bezüglich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.), des Zetapotentials (siehe 3.3.3.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.2.4.1. Einfluss auf die Molekulargewichtsverteilung

Zur qualitativen Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung in dem über zwei Schritte ablaufenden Desolvatationprozess wurde eine Gelpermeationschromatographie (GPC) von den Gelatinelösungen durchgeführt. Wie in der Herstellungsvorschrift (siehe 3.2.4.) beschrieben, wurden 2500 mg Gelatine A in 50 mL MQ unter Erwärmen (50°C) gelöst und vier Aliquote a 10,0 mL entnommen.

Zur Analyse wurden bei der ersten Desolvatation jeweils 100 µl des auf 25 C abgekühlten Überstand, nach einer Acetonzugabe von 7,5, 10,0, 12,5 und

15,0 mL, entnommen und unverdünnt analysiert. Dem wieder aufgelösten Sediment wurden ebenfalls 100 µl entnommen, die durch einen Verdünnungsschritt von 1 : 40 auf eine Konzentration von etwa 1 mg/mL Gelatine eingestellt wurden.

Um die optimale Desolvatationsmenge zu evaluieren wurde der gleiche Ansatz noch einmal wiederholt, wobei im ersten Schritt 7,0, 7,5, 8,0 und 9,0 mL Aceton zugegeben wurden.

Die vorbereiteten Proben wurden vor Aufgabe auf die Größenausschluss säule steril filtriert (0,2 µm). Als Fließmittel wurde ein PBS-Puffer pH 7,5 verwendet. Die Proben wurden bei einer Flussrate von 0,8 mL/min eluiert und der Proteingehalt mit einem UV-Detektor bei 220 nm detektiert.

Das Molekulargewicht steht in einer logarithmischen Beziehung zu der Retentionszeit. Daher wurden zur Methodenkalisierung globuläre Proteine mit bekanntem Molekulargewicht eingesetzt. Als Standardsubstanzen wurden p-Aminobenzoesäure (0,01 mg/mL), Ribonukleinsäure, Ovalbumin, γ-Globulin und Thyroglobulin in einer Konzentration von 1 mg/mL verwendet.

3.2.4.2. Einfluss des Desolvatationsmittels auf die Ausbeute

Der Einfluss der Desolvatationsmenge auf die NP-Ausbeute wurde wie folgt untersucht.

Eine 5%-ige wässrige Gelatinelösung (50 mL) wurde durch Erwärmen (50°C) hergestellt und in vier Aliquote a 10,0 mL geteilt. In dem nun folgenden ersten Desolvatationsschritt wurden die Proteinlösungen mit 7,5, 10,0, 12,5 und 15,0 mL Aceton versetzt und die zugedeckte Lösung auf 23 - 25°C abgekühlt. Für eine anschließende Proteinuntersuchung mit BCA-Reagenz (siehe 3.3.7.) wurden aus jedem Ansatz 100 µl aus dem Überstand entnommen. Dem erneut in 10,0 mL und durch Erwärmen auf 50 C aufgelösten Sediment wurden ebenfalls 100 µl entnommen, die zum einen gravimetrisch (siehe 3.3.1.) und zum anderen mit BCA-Reagenz (siehe 3.3.7.) auf ihren Proteingehalt hin untersucht wurden.

Es wurde nach der Standardvorschrift (siehe 3.2.4.) weiterverfahren, bevor im zweiten Desolvatationsschritt insgesamt 40 mL Aceton in Schritten von 10 mL zugetropft wurden. Nach jedem Aliquot wurden 100 µl der NP-Suspension entnommen und mit 12,5 µL GA-Lösung 8% quervernetzt. Die Proben wurden

unter Schütteln im Thermomixer 12 h / 20°C bei 600 U/min umgesetzt und die Nanopartikel mit der UZ (105.000 g / 40 min) abgetrennt. Der Üb mit BCA-Reagenz auf den gelösten Gelatineanteil hin untersucht.

Die NP wurden hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert (siehe 3.3.2.).

3.2.4.3. Einfluss der Quervernetzung auf die Stabilität

Das Standardherstellungsprotokoll (siehe 3.2.4.) wurde zur Evaluierung der für die physikalische Stabilität benötigten Quervernetztermenge eingesetzt.

Aliquote von 1,5 mL wurden nach der zweiten Acetonzugabe von 40,0 mL entnommen und mit 49,6, 23,4, 11,7, 5,9, 2,9 und 1,5 µL GA-Lösung 8% versetzt. Die Proben wurden unter Schütteln im Thermomixer (600 U/min und 20°C) für 12 h stabilisiert. Anschließend wurden die Proben entweder vor oder nach dem Zentrifugieren in der UZ (105.000 g / 40 min) 1 : 10 mit MQ verdünnt und mit BCA-Reagenz (siehe 3.3.7.) auf den freien Gelatineanteil im Üb hin untersucht.

3.3. Charakterisierung der Nanopartikel

3.3.1. Gehaltsbestimmung

Der Gehalt der Nanopartikelsuspension wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust bestimmt.

Dazu wurden 50,0 µl der entsprechenden Präparation in ein zuvor tariertes Wägeschiffchen aus Aluminium überführt und bei 80°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Schiffchen wurden anschließend abermals auf einer Mikroanalysenwaage gewogen und die Massendifferenz ermittelt. Die Werte wurden gegebenenfalls bei Zusatz von Pufferlösungen um den Salzfaktor korrigiert. Die Ausbeute wurde in mg/mL NP angegeben.

3.3.2. Partikeldurchmesser

Die Partikeldurchmesser und deren Verteilung wurde unter Verwendung der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), die auf dem Prinzip der

dynamischen Laserlichtstreuung beruht, bestimmt. Dabei muss die suspendierte Probe so stark verdünnt werden, dass die Partikel sich ungeordnet und zufällig nur unter dem Einfluss der Brownschen Molekularbewegung befinden. Diese ist umso größer, je kleiner und beweglicher die Teilchen sind. Die Beweglichkeit ist bei einer konstanten Partikelgröße eine materialabhängiger Parameter. Das obere Größenlimit stellt für die Messtechnik wird von dem spezifischen Gewicht der Partikel bestimmt.

Weitere Voraussetzung für eine ungestörte Brownsche Molekularbewegung ist eine konstante Temperatur während der Messung, um Konvektionsströmungen zu vermeiden und die Viskosität des Lösungsmittels konstant zu halten.

Bei der Messung im festen Winkel von 90° wird die Veränderungen der Streulichtintensität innerhalb eines sehr kleinen Zeitfensters im Nano- oder Mikrosekundenbereich erfasst. Verschiedene Signalintensitäten werden miteinander korreliert, bis die Korrelationsfunktion mit zunehmender Zeit auf null absinkt. Dies zeigt sich bei den kleineren und beweglicheren Teilchen in einem steiler abfallendem Kurvenverlauf. Als Ergebnis erhält man den hydrodynamischen Durchmesser, der eine Aussage über den Teilchendurchmesser in einem bestimmten Lösungsmittel macht.

Die Proben müssen schwebstofffrei sein und wurden mit filtriertem MQ ($0,22 \mu\text{m}$) je nach dem NP-Gehalt im Bereich 1 : 200 bis 1 : 1000 verdünnt und in geeigneten Einmalküvetten bei RT und 633 nm Wellenlänge im Zetasizer untersucht. Die Empfindlichkeit wurde automatisch über die Blendenöffnung des Geräts im Bereich von 0 - 200 μm reguliert. Somit wurden Schwankungen in der Partikelkonzentration ausgeglichen.

3.3.3. Zetapotential

Das Zetapotential gibt Auskunft über die elektrischen Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und dispergierten, geladenen Teilchen. In Flüssigkeiten wird die Oberflächenladung der Partikel teilweise durch die Adsorption von Gegenionen kompensiert. Bei der Beschreibung der Ladungsverhältnisse wird zumeist von dem Sternschen Doppelschichtmodell ausgegangen. Einen entscheidenden Einfluss auf die Dicke der Doppelschicht und den damit verbundenen Potentialverlauf in der diffusen Schicht, haben sowohl die Ionen-

stärke als auch deren Wertigkeit. Das Sternsche Modell kann nur bei moderater Ionenstärke (10^{-4} - 10^{-2} mol/L) angewendet werden.

Das Zetapotential kann nur indirekt gemessen werden und wird in Form der elektroforetischen Mobilität der Partikel bestimmt. Die Wanderungsgeschwindigkeit unter Berücksichtigung der angelegten elektrischen Feldstärke stellt ein direktes Maß für die Mobilität der Teilchen dar. Sie hängt weiter von dem Partikelradius, der Viskosität und damit auch von der Temperatur des Lösungsmittels ab.

Die für die Größenbestimmung eingesetzten Proben werden noch einmal 1 : 4 mit filtriertem MQ verdünnt und bei einer angelegten Spannung von 140 Volt vermessen. Unter Berücksichtigung der von Deby-Hückel und Helmholtz-Smoulurowski aufgestellten Gleichungen werden die Messdaten vom Gerät ausgewertet.

3.3.4. Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM)

Um eine Vorstellung von der Oberflächenstruktur unbeladener und modifizierter HSA-NP zu bekommen, wurden an der Technischen Universität am Institut für Makromolekulare und Organische Chemie in Eindhoven von Prof. Dr. Ulrich S. Schubert Aufnahmen mit Rasterkraftmikroskopie (Nanoscope IIIa) gemacht.

Die Auflösungseigenschaften, die diese Technik liefert, sind vergleichbar mit der eines Elektronenmikroskops. Die Spitze, bestehend aus einer Siliziumverbindung, wird in einer Höhe von nur wenigen Nanometern über das Objekt bewegt. Aufgrund der atomaren Abstoßungskräfte zwischen den verschiedenen Elektronenhüllen von Spitzen- und Probenmaterial, erfährt die an einem Raster sich bewegende, abtastende Spitze eine Auslenkung, die mit Hilfe eines Laserstrahls registriert und an einen Detektor weiter geleitet wird.

Zur Untersuchung wurden 5 μ L der Probe (~ 15 mg/mL in MQ, 310 - 320 nm ermittelt mit PCS) eingesetzt. Durch das Anlegen eines Vakuums wurde das Lösungsmittel verdampft, und die Proben trockneten extrem schnell.

3.3.5. Quantifizierung der gebundenen Oligonukleotidmenge

Eine etablierte Methode zur Bestimmung der Beladungsrate stelle die HPLC-Analytik mittels Anionenaustauschersäulen dar. Die negativ geladenen Oligonukleotide werden von den positiv geladenen kovalent mit der Säulenmatrix verbunden, funktionellen Gruppen temporär festgehalten, bevor sie durch Anionen aus dem Fließmittel verdrängt und eluiert werden. Die Desorption kann durch eine pH-Wertverschiebung oder zunehmende Salzkonzentration erfolgen. In diesem Fall wurde die Elution mit einem linear ansteigenden Ionengradienten im stark alkalischen erreicht [Leeds et al., 1996, S. H. Chen et al., 1997].

Die Bestimmung des eingebundenen Wirkstoffanteils wurde auf indirektem Weg über die Erfassung des ungebundenen Anteils im Überstand und auf direktem Weg nach enzymatischen Verdau der Nanopartikelmatrix durchgeführt.

3.3.5.1. Bestimmung des ungebundenen Wirkstoffs im Überstand

Die bei der NP-Aufreinigung anfallenden drei Überstände wurden unverdünnt auf die Säule aufgegeben. Dazu wurde mit einer Pasteurpipette 100 µL Probe in einen Mikrovialeinsatz pipettiert, zusammen mit einer Spiralfeder in ein 2 mL Probenglas eingebracht und mit einem Schraubverschluss mit integriertem Septum verschlossen. Die Detektion der eingespritzten Probe (20 µL) wurde über 30 min mit einem UV-Detektor bei 260 nm durchgeführt. Die Peakflächen wurden integriert und die Konzentration mit Hilfe einer linearen Eichgeraden des freien Wirkstoffs (10 - 50 µg/mL) über die Fläche korreliert. Es wurden die unter 3.1.5.2. beschriebenen Lösungen und Gradienten für den zu untersuchenden Wirkstoff eingesetzt.

Mit dieser Methode wurden auftretende Abbauprodukte, wie kürzere Oligonukleotidfragmente zwar erkannt, waren aber nicht quantifizierbar.

3.3.5.2. Bestimmung des inkorporierten Wirkstoffs durch Partikelverdau

3.3.5.2.1. Adsorptive Einbindung in die HSA-Matrix

Für den enzymatischen Abbau war der Grad der Quervernetzung mit GA-Lösung von entscheidender Bedeutung. Nanopartikel, die nur zu 40% mit GA

quervernetzt wurden, konnten mit einer frisch zubereiteten Proteinase K-Lösung innerhalb von kurzer Zeit in Tris-Puffer pH 8,5 abgebaut werden. Die NP fielen nach dem 3-fachem Waschen und der gravimetrischen Bestimmung (siehe 3.3.1.) üblicherweise in einer Konzentration von 5 mg/mL an.

Es wurde 1 mg NP in 200 µL Tris-Puffer pH 8,5 suspendiert und mit 10 µL Proteinase K-Lösung (200 µg/mL) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz auf 250 µL mit Tris-Puffer ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h / 37°C im Thermomixer wurden 100 µl der farblosen und klaren Lösung in Mikrovials pipettiert und mittels HPLC (siehe 3.3.5.1.) untersucht.

Als Kontrollen wurden leere NP und Oligonukleotide in der gleichen Konzentration, die den selben Bedingungen ausgesetzt waren, mitgeführt.

3.3.5.2.2. Kovalente Bindung an aktiviertes HSA über Disulfidbrücken

Die Nanopartikel wurden zuerst wie unter 3.3.5.2.1. beschrieben über 2 Stunden mit Proteinase K inkubiert und dann eine weitere Stunde bei RT mit einer 0,2 M DTT-Lösung, zur Spaltung der Disulfidbrücken behandelt. Im weiteren wurde dann wie unter 3.3.5.2.1. beschrieben verfahren.

3.3.6. Quantitative Bestimmung von Aminogruppen

Nach der Desolvatation wurde die Anzahl der verbliebenen, freien Aminogruppen auf der Partikeloberfläche durch Umsetzen mit TNBS-Reagenz bestimmt.

100-200 µL der NP-Suspension wurden mit 400 µL MQ verdünnt, mit 400 µL einer 4%-igen NaHCO₃-Lösung pH 8,5 abgepuffert, bevor 400 µL einer 0,2%-igen TNBS-Lösung zugesetzt wurden. Der Ansatz wurde 2 h / 40°C unter Schütteln (500 U/min) im Thermomixer inkubiert.

Nicht abreagierte TNBS wurde durch Zentrifugieren (20.000 g / 25 min) von den NP abgetrennt. Anschließend wurden für die photometrische Messung 125,0 µl abgenommen und mit MQ auf 1000,0 µL verdünnt und bei 349 nm vermessen.

Um den Gehalt an nicht abreagiertem TNBS feststellen zu können, wurden unterschiedliche Verdünnungen der selben 0,2-igen TNBS-Lösung als

Referenzproben für eine lineare Eichgerade eingesetzt. Die Anzahl freier Aminogruppen wurde durch Differenzbildung zum 100% TNBS-Wert ermittelt.

3.3.7. Bestimmung von gelöstem Protein mit BCA-Reagenz

Bei der Untersuchung von NP-Überstand wurden diese erneut bei 20.000 g / 25 min zentrifugiert, um die Nanopartikel vollständig von der überstehenden Lösung abzutrennen.

Zu je 30,0 μL der Probenlösung wurden 800,0 μL des nach Gebrauchsanweisung frisch herzustellenden BCA-Arbeitsreagenzes hinzu pipettiert. Die Mischung bleibt in Abhängigkeit von der zu erwartenden Proteinkonzentration 30 min lang, entweder bei 37°C (20 - 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder bei Lösungen mit einer kleineren Proteinkonzentration (5 - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bei 60°C im Thermomixer unter Schütteln (500U/min) stehen gelassen. Die Proben wurden zum Abkühlen in einen 4°C kalten Kühlblock gesetzt und anschließend in Quarzküvetten bei 562 nm im Photometer vermessen.

Die ermittelten Werte wurden mit einer Eichgerade des zu untersuchenden Proteins im Bereich von 10 - 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ abgeglichen.

3.4. Oberflächenmodifikationen

3.4.1. Einführung von Sulfhydrylgruppen mit 2-Iminothiolan (Trauts Reagenz)

3.4.1.1. Thiolierung von Humanen Serumalbumin-Nanopartikeln (HSA-NP)

Zur Einführung von Sulfhydrylgruppen wurden die NP (20 mg/mL) mit 2-Iminothiolan weiter behandelt.

Je 2 mL der NP-Suspension wurden mit 500 μL einer 2-Iminothiolanlösung (26 mg/mL in Tris-Puffer pH 8,5) versetzt und auf 4 mL mit Tris-Puffer ergänzt. Die Probe wurde unter Rühren bei 400 - 500 U/min über Nacht im Dunkeln inkubiert.

Die Abtrennung des überschüssigen Reagenzes erfolgte wie zuvor beschrieben durch 5-faches Waschen. Das erhaltene Pellet wurden nach der Abnahme des 1. Überstand in MQ im Ultraschallbad resuspendiert.

Die Anzahl der eingeführten Sulfhydrylgruppen pro HSA-Molekül wurde wie in 3.4.2. beschrieben bestimmt.

3.4.1.2. Thiolierung von Gelatine A-Nanopartikeln (Gel-NP)

Zur Einführung von Sulfhydrylgruppen wurden die NP (20 mg/mL) mit 2-Iminoethanol weiter behandelt.

Je 1,5 mL der NP-Suspension wurden mit 1,5 mL einer 2-Iminoethanol-Lösung (30 mg/mL in Tris-Puffer pH 8,5) versetzt und auf 3500 µL ergänzt. Die Probe wurde unter Rühren bei 400 - 500 U/min über Nacht im Dunkeln inkubiert. Die Abtrennung des überschüssigen Reagenzes erfolgte wie zuvor beschrieben durch 5-faches Waschen mittels Zentrifugieren. Das erhaltene Pellet wurde nach der Abnahme des 1. Üb im Ausgangsvolumen von 1,5 mL MQ im Ultraschallbad resuspendiert.

Die Anzahl eingeführter Sulfhydrylgruppen pro mg Protein wurde wie in 3.4.2. beschrieben durchgeführt.

3.4.1.3. Thiolierung von Avidin (Av)

Zur Einführung von Sulfhydrylgruppen wurden 10 mg Avidin und 3,5 mg 2-Iminoethanol jeweils in 1,0 mL TEA-Puffer pH 8,0 gelöst und 1 h / 20°C unter Schütteln bei 500 U/min auf dem Thermomixer umgesetzt. Zur Entfernung des überschüssigen Trauts Reagenz wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer 10 mL D-Salt™ Dextran säule angeschlossen. Die zuvor mit TEA-Puffer konditionierte Säule wurde zweimal mit der halben Ansatzmenge von 1,0 mL beschickt und mit 1,0 mL Aliquoten TEA-Puffer eluiert. Die aufgefängenen Fraktionen 1 - 8 wurden photometrisch bei 280 nm auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen 5 und 6 wurden vereinigt und die Avidinkonzentration wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust, unter Berücksichtigung der Puffersalze, bestimmt. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift (siehe 3.3.1.) wurden 100 µL zur Gehaltsbestimmung entnommen.

Die Anzahl eingeführter Sulfhydrylgruppen pro mg Protein wurde wie in 3.4.2. beschrieben durchgeführt.

3.4.2. Bestimmung reaktiver Sulfhydrylgruppen an der Oberfläche

Die Erfassung von Sulfhydrylgruppen erfolgte durch die Umsetzung mit Ellmans Reagenz, welches mit freien SH-Gruppen quantitativ zu einem photometrisch, detektierbaren, gelben Produkt umgesetzt wurde.

Je nach der zu erwartenden Anzahl an Sulfhydrylgruppen wurden die Präparationen unterschiedlich behandelt. Die HSA-NP Proben und das thiolierte Avidin (15 µl ad 150 µL) wurden 1 : 10 in PBS pH 7,5 verdünnt, wohingegen die Gel-NP (150 µL) unverdünnt eingesetzt wurden. Von der Probe wurden 150,0 µL mit 1280 µL PBS pH 7,5 versetzt und mit Ellmans Reagenz (2 mg/mL werden in PBS Puffer pH 7,5 gelöst) auf 1500 µL ergänzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei RT wurden die NP (20.000 g / 25 min) abzentrifugiert und die Überstände photometrisch bei 412 nm in Quarz- oder Einmal-
küvetten gegen PBS vermessen. Als Eichgerade diente eine frisch hergestellte L-Cysteinlösung (50 mg / 25 mL), die in unterschiedlicher Verdünnungen, mit den gleichen Reagenzmengen, auf das gleiche Volumen (1500 µL) wie die Proben, gebracht wurden. Der höchste Standard entsprach $1,709 \times 10^{-7}$ mol Cystein in der zu vermessenden Lösung.

3.4.3. Proteinaktivierung mit hetero-bifunktionalen Crosslinkern (Sulfo-MBS)

Thiolmodifizierte NP wurden mit Avidin / NeutrAvidinTM gekoppelt, welche zur Bindung verschiedenster biotinylierter Liganden eingesetzt wurden. Diese Kopplung wurde mittels hetero-bifunktionaler Crosslinker durchgeführt.

3.4.3.1. Aktivierung von Avidin / NeutrAvidinTM

Für die Umsetzung wurden 2,5 mg Avidin / NeutrAvidinTM / NeutrAvidinTM-FITC in 450 µL PBS-Puffer pH 7,0 gelöst und mit 50 µL Sulfo-MBS-Lösung (16 mg/mL in PBS-Puffer pH 7,0) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min / 20°C wurde der überschüssige Crosslinker durch Größenausschlusschromatographie mit einer 5 mL D-SaltTM Dextransäule von der Proteinfraction abgetrennt. Die gesamte Ansatzmenge wurde auf eine mit PBS-Puffer pH 7,0 konditionierte Säule aufgegeben und mit 500 µL Pufferaliquoten, eluiert. Die aufgefangenen Fraktionen 1 - 8 wurden photometrisch bei 280 nm auf ihren

Proteingehalt hin untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen 5 und 6 wurden vereinigt und die Avidin-Konzentration in der Lösung wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust unter Berücksichtigung der Puffersalze bestimmt. Abweichend von der allgemeinen Gehaltsbestimmung (siehe 3.3.1.) wurden 100 μ L Lösung entnommen.

3.4.3.2. Aktivierung von HSA-Nanopartikel

Für die Umsetzung wurden 34 mg HSA-NP in PBS-Puffer pH 8,0 (20 mg/mL) suspendiert und mit 300 μ L Sulfo-MBS-Lösung (14 mg/mL in PBS-Puffer pH 8,0) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min / 20°C wurde der überschüssige Crosslinker durch 3-faches Zentrifugieren (16.000 g / 8 min) entfernt und die Nanopartikel im letztem Waschschrift auf 3,5 mL mit MQ verdünnt. Die NP wurden weiterhin bezüglich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.), des Zetapotentials (siehe 3.3.3.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.4.4. Kopplung der aktivierten Proteinkomponente

3.4.4.1. Avidin / NeutrAvidinTM an thiolierte Nanopartikel (SH-HSA-NP oder SH-Gel-NP)

Die Proteinlösung wurde zu gleichen Teilen mit der NP-Suspension (je 750 μ L) gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Die bei der Aufreinigung durch dreimaliges Zentrifugieren (16.000 g / 8 min) anfallenden Überstand wurden zur Bestimmung der Bindungsrate photometrisch bei 280 nm vermessen. Als Kontrollen dienten thiolierte NP ohne Zusatz aktivierten Proteins und aktivierte Proteinlösung (100% Wert) selbst, die beide im Verhältnis 1 : 1 mit MQ verdünnt wurden.

Zur Bestimmung des freien und ungebundenen Avidin / NeutrAvidinTM-Derivates im Üb wurden die gewonnenen Überstände vor der Messung nochmals bei 20.000 g / 25 min zentrifugiert. Von der aktivierten Proteinlösung (100% Wert) wurde eine Verdünnungsreihe, die als Kalibriergerade diente, hergestellt.

Die NP wurden weiterhin bezüglich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.), des Zetapotentials (siehe 3.3.3.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.4.4.2. HSA-Nanopartikel an thioliertes Avidin (SH-Av)

Aktiviertes HSA-NP-Suspension wurde zu gleichen Teilen mit thioliertem Avidin gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Die bei der Aufreinigung durch dreimaliges Zentrifugieren (16.000 g / 8 min) anfallenden Überstände wurden zur Bestimmung der Bindungsrate photometrisch bei 280 nm vermessen. Als Kontrollen dienten aktivierte NP ohne Proteinzusatz und thiolierte Proteinlösung (100% Wert) selbst, die beide im Verhältnis 1 : 1 mit MQ verdünnt wurden.

Zur Bestimmung des freien und ungebundenen thiolierten Avidins im ÜB wurden diese vor der Messung nochmals bei 20.000 g / 25 min zentrifugiert. Von der thiolierten Proteinlösung (100% Wert) wurde eine Verdünnungsreihe, die als Kalibriergerade diente, hergestellt.

Die NP wurden weiterhin bezüglich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.), des Zetapotentials (siehe 3.3.3.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.4.5. Funktionalitätsbestimmung des gekoppelten Avidins / NeutrAvidins™

Die Funktionalität und Zugänglichkeit des Proteins nach den verschiedenen Reaktionsschritten (Aktivierung, Kopplung an die Partikeloberfläche und Aufreinigung) wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Biotinliganden nachgewiesen. Durchgeführt wurde die Prüfung in 96-Well Mikrotiterplatten aus Polystyrol, dessen unspezifische Bindungsstellen mit 250 µl einer 0,2%igen HSA-Lösung über 5 Tage im Kühlschrank abgesättigt wurden. Im Anschluss wurde die Platte 3-fach mit PBS gespült und bei 4°C in feuchter Atmosphäre gelagert. Das Nachweisreagenz Biotin-4-Fluorescein (B4F) wurde als Stammlösung in einer Konzentration von ~400 mM in DMSO gelöst und bei -25°C im Gefrierschrank gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die Stammlösung 1 : 20 mit PBS-Puffer pH 7,5 verdünnt, so dass die tatsächliche Konzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 495 nm unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten ($68.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet wurde. Als Arbeitslösung wurde die B4F-Lösung anschließend mit PBS-Puffer pH 7,5 auf einen Gehalt von 400 nM eingestellt.

Die zu untersuchende NP-Präparation wurde auf Grund der photometrischen Messergebnisse mit PBS-Puffer pH 7,5 auf einen Gehalt von 20 nM Av / NAV

verdünnt. Für die Titration wurden 150 µL der NP-Suspension mit Aliquoten von 0 – 40 µL B4F Lösung (4 – 80 nM) versetzt und mit Puffer auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Die Platte wurde für drei Stunden im Dunkeln bei RT stehen gelassen bevor das Biotinderivat bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und das emittierte Licht bei 520 nm mit einem ELISA-Reader (Fluostar Galaxy) vermessen wurde. Die ermittelten Werte wurden mit einer Eichgerade des an die Platte gebundenen biotinylierten anti-CD3 AK Proteins im Bereich von 0,1 - 2,5 µg/mL ermittelt.

3.4.6. Bindung biotinylierter Liganden über Avidin

Die Entwicklung eines Trägersystems auf Proteinbasis eröffnet vielfältige Möglichkeiten der Oberflächenmodifikationen. Man kann auf dem Weg der kovalenten Bindung Avidin / NeutrAvidin™ an das System koppeln und sich so die sehr starke Komplexbildung zwischen dem Protein und Biotin zu nutze machen, um verschiedene biotinylierte Liganden einzuführen.

3.4.6.1. anti-CD3-Antikörperbindung an überflächenmodifizierte Gelatine-Nanopartikel (Gel-NAv-FITC-NP)

Eine Gel-NAv-FITC-NP Menge von 3 mg (entspricht ca. 200 µL) wurde mit 500 µL biotinylierter Antikörperlösung (25 µg/mL) gemischt und 90 min / 10°C und 500 U/min im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden die NP durch 3-faches Zentrifugieren (16.000 g / 6 min) und Redispergiern im Ultraschallbad aufgereinigt. Im letzten Schritt wurden die NP für die Versuche in der Zellkultur in 500 µl Ampuwa® oder in sterilem PBS-Puffer pH 7,0 versetzt mit Pen / Strep Lösung (100 Units Penicillin und 100 µg Streptomycin/mL) aufgenommen.

Als Kontrollpräparation für die Zellaufnahme in lymphozytäre Zelllinien diente eine NP-Suspension, die in der gleichen Art und Weise mit unspezifischem IgG AK beladen wurde. Die NP wurden mit PCS hinsichtlich der Partikeldurchmesser (siehe 3.3.2.) charakterisiert. Die Antikörperbeladungsrate wurde durch Western-Blot (siehe 3.4.7.) und Fluorimetrie (siehe 3.4.7.1.2.) quantifiziert.

3.4.6.2. Bindung eines anti-Her2-neu Antikörper an Gelatine-Nanopartikel (Trast-Gel-NAv-FITC-NP)

Die Biotinylierung des Antikörpers wurde nach einem modifizierten Standardprotokoll der Firma Pierce ausgeführt. Anti-Her2-neu oder der als zugelassenes Medikament auf dem Markt befindliche humanisierte, monoklonale Antikörper Trastuzumab (Quelle: gynäkologische Abteilung des Universitätsklinikums in Frankfurt a.M.) wurde in PBS pH 7,0 in einer Konzentration bis zu 1 mg/mL verdünnt. Die hohen Konzentrationen im Milligrammbereich wurden lediglich für Trastuzumab verwendet. Für den zu Forschungszwecken eingesetzt anti-Her2-neu wurde nur 1/10 der Menge umgesetzt. Das molare Verhältnis des Biotinylierungsreagenz (NHS-Biotin, 1 mg/ml in DMSO) zu AK (ca. MW = 150,000) betrug 5:1 und der Ansatz wurde bei 20°C unter Schütteln (500U/min) auf dem Thermomixer inkubiert. Das überschüssige Biotinylierungsreagenz wurde über eine Dextrsäule abgetrennt. Die AK enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration mit einem MicroBC-Assay bestimmt. Der Biotinylierungsgrad wurde mit dem HABA-Reagenz, in leichter Abwandlung der Herstellerangaben, quantifiziert.

Zu 50 µl der Leerprobe (PBS pH 7,0), 50 µl der Analysenprobe und 50 µl eines Standards (14,6 µM Biotin in PBS pH 7,0) wurden 50 µl HABA/Avidinlösung (0,3 mM HABA und 7,5 µM Avidin in PBS pH 7,0) hinzugefügt und sofort bei 500 nm photometrisch vermessen. Diese kolorimetrische Methode basiert auf dem Austausch von an HABA gebundenem Avidin gegen Biotin. Die Verdrängungsreaktion führt zu einer Abnahme der Absorption, so dass die gebundene Biotinmenge berechnet werden kann (HABA / Avidin-Komplex, Extinktionskoeffizient $E_{500} = 34,000$).

Eingesetzt wurden 15 mg (entspricht ca. 750 µL) Avidin-modifizierte Protein-Nanopartikel (HSA-Av-NP bzw. Gel-NAv-NP), die mit 50 - 62,5 µg biotinyliertem Antikörper (55 µg/mL) gemischt und 90 min / 10°C und 500 U/min im Thermomixer geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Partikel wieder durch 3-faches Zentrifugieren (16.000 g / 6 min) und Redispergieren im Ultraschallbad aufgereinigt. Im letzten Schritt wurden die NP für die Zellkulturversuche in 500 µl sterilem PBS pH 7,0 mit Pen / Strep (100 Units Penicillin und 100 µg Streptomycin/mL) aufgenommen.

Die Partikeldurchmesser wurde mittels PCS (siehe 3.3.2.) charakterisiert und die Antikörperbeladung wurde über Western-Blot (siehe 3.4.7.) quantifiziert.

3.4.6.2.1. Bindung biotinylierter Phosphorothioate an HSA-Nanopartikel (PTO-HSA-Av-NP)

Die biotinylierten Phosphorothioate wurden im stöchiometrischen Verhältnis mit Avidin-modifizierten Nanopartikeln, bezogen auf die photometrisch ermittelte Avidin-Beladung der Nanopartikel, umgesetzt. Theoretisch würden alle vier Bindungstaschen eines jeden Avidin-Moleküls bei einer 100%igen Kopplung belegt.

Eine HSA-Av-NP-Menge von 4 - 5 mg (ca. 250 µL) wurde in Abhängigkeit von der Avidin-Beladung mit ~100 µg biotinyliertem PTO (entspricht ca. 50 µL) gemischt und 90 min / 20°C bei 500 U/min im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel abermals durch 3-faches Zentrifugieren (16.000 g / 6 min) und Redispergieren im Ultraschall aufgereinigt.

3.4.7. Quantifizierung biotinylierter Liganden

3.4.7.1. Ermittlung der Antikörperbeladung

3.4.7.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page-Methode [Laemmli, 1970] beruht auf der elektrophoretischen Proteinseparation über die Molekulargewichte. Die Proteine wurden zur Detektion auf dem Polyacrylamidgel in einem Coomassie-Farbbad angefärbt.

Beim Western-Blot (WB) werden die durch SDS-Page aufgetrennten immobilisierten Proteine bzw. Antikörper durch Anlegen eines Stroms auf eine Nitrocellulosemembran [Towbin et al., 1979] übertragen und mit einer „semi-wet“ oder „wet-blotting“ Methode transferiert. Zur Immunanfärbung wurde die Membran mit einer zweiten Antikörperlösung, gekoppelt an alkalische Phosphatase, inkubiert und über eine enzymatische Reaktion zu einem gefärbten Produkt umgesetzt.

Für die Quantifizierung des anti-CD3- und des anti-Her2-neu-AK, vom IgG-Typ wurden zwei Trenngele 7,5% (Lower Gel) in die Sandwichhalterung einer Mini-Bio-Rad Apparatur ausgegossen. Sie wurden gegen das Austrocknen mit

etwas Isopropylalkohol überschichtet, der eine Stunde später, nach Beendigung des Polymerisationsvorgangs, mit einem Filterpapier abgezogen wurde. Dieses Trenngel wurde mit dem Sammelgel (Upper Gel) überschichtet und durch vorsichtiges Einführen eines Teflonkammes wurden Taschen zur späteren Probenaufnahme ausgeformt. Nach 45 min war der Polymerisationvorgang beendet, der Kamm wurde entfernt und die Gele in eine Mini-Protean-II-Laufkammer überführt, die mit SDS-Laufpuffer befüllt wurde.

Die Probenüberstände wurden vor der Aufbereitung nochmals in der Zentrifuge 5417 bei 20.000 g / 25 min lang behandelt. Unverdünnt wurde ein Volumen von 30 µL pro zu füllender Tasche abgenommen. Dieses wurde entweder unverdünnt oder in einer Verdünnung von 1 : 3 mit 7,5 µL Probenpuffer versetzt. Jeweils 15 µL der Verdünnung wurden pro Tasche mit Gel-Loadingspitzen aufgebracht. Als Größenstandard wurde ein angefärbter Molekulargewichtsmarker, bestehend aus Aprotinin (6,5 kDa), Lysozyme (16,5 kDa), β -Lactoglobulin A (25 kDa), Triosephosphatisomerase (32,5 kDa), Aldolase (47,5 kDa), Glutamat-dehydrogenase (62 kDa), MBP-Paramyosin (83 kDa) und MBP- β -galaktosidase (175 kDa) verwendet. Dieser wurde vor dem Einsatz für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA über ca. 35 min durchgeführt, bis die Lauffront am unteren Rand des Gels angekommen war.

Zur Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde die „wet-blotting“-Methode eingesetzt. Hierzu wurden die benötigten Utensilien zuvor in 4°C kaltem Transferpuffer gewässert. Der Aufbau der Transferkassette erfolgte von der Anodenseite aus und setzte sich aus folgenden Schichten zusammen:

- Textilfaser-Pad
- Gel-Blotting-Papier
- 3MM Filterpapier
- Nitrocellulosemembran
- Gele
- 3MM Filterpapier
- Gel-Blotting-Papier
- Textilfaser-Pad

Die Kassette wurde im Anschluss in eine mit Transferpuffer gefüllte Tankapparatur gehängt, die bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA über 75 - 90 min laufen gelassen wurde. Die entstehende Wärme wurde über ein Wasserkühlsystem abgeführt.

Der vollständige Transfer vom Gel auf die Membran wurde über ein Coomassie-Färbung nachgewiesen. Dazu wurde das Gel 10 min in die Farblösung eingelegt und eventuell vorhandene Proteinbanden wurden nach mehrstündigem Baden in Entfärberlösung sichtbar.

Da Antikörperlösungen durch Zusatz von BSA stabilisiert werden, wurde die Membran 1 min lang in abwaschbare Ponceau S Lösung eingelegt und das BSA wurde als roter Fleck sichtbar.

Nach Waschen mit 1x TBS-Puffer (10 min) wurde die Membran eine Stunde mit BSA-Lösung 2% in TTBS-Puffer eingelegt und geblockt. Nach dreimaligem Abspülen und zweimaligem Waschen mit 1x TBS-Puffer für 10 min wurde mit 25 mL der 2. Antikörperlösung (Anti-mouse IgG AK (goat), alkalische Phosphatase), in einer Verdünnung von 1 : 5.000 in TTBS eine Stunde lang inkubiert. Dann wurde erneut zweimal in 1x TBS, einmal in 1x TTBS und einmal in Detektionspuffer für jeweils 10 min gewaschen. Abschließend wurden die Banden mit Substratpuffer über einen Zeitraum von 1 - 10 min visualisiert und die Reaktion durch Ersatz des Entwicklungsreagenzes mit Stopp-Puffer abgebrochen.

Das Resultat wurde gescannt und die Membran bei 4°C in MQ gelagert.

3.4.7.1.2. Fluorimetrie

Bestimmt wurde die freie, ungebundene Menge an biotinyliertem Antikörper in den gesammelten Waschüberständen, die an Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten gebunden wurde. Der 1. AK wurde auf immunologischem Wege durch die Zugabe eines fluoreszenzmarkierten 2. AK (AlexaTM Fluor546 goat anti-mouse IgG AK) quantifiziert.

Die Überstände wurden zuvor noch einmal bei 20.000 g / 25 min zentrifugiert und dann jeweils 200 µl pro zu untersuchenden Üb in eine 96-Well Sigma ScreenTM Platte pipettiert. Die Proben wurden alle unverdünnt aufgegeben, zusätzlich wurden der 1. Üb noch 1 : 3 bzw. 1 : 5 und der 2. Üb noch 1 : 2 verdünnt aufgetragen. Die Platte wurde inklusive einer Antikörperver-

dünnungsreihe von 0,1 - 2,5 µg/mL über 2 h / RT inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgegossen und jedes Well dreimal mit 300 µl Waschpuffer gespült. In jedes Well wurden dann 200 µL der 2. AK-Lösung (5 µg/mL in PBS-Puffer pH 7,4) gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C im Dunkeln liegen gelassen. Nach dem Abgießen der Lösungen, 3-fachem Waschen mit 300 µl Waschpuffer, wurden 200 µL PBS-Puffer pH 7,4 eingefüllt und die Fluoreszenzintensität des 2. AK gegen PBS mit einem ELISA-Reader gemessen. Der Farbstoff wurde bei 550 nm angeregt und das emittierende Licht bei 590 nm vermessen.

Alle Proben und Standards wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Werte wurden, um die eventuell auftretende unspezifische Bindung des 2. AK an die beschichtete Mikrotiterplatte, korrigiert.

3.4.7.2. Ermittlung der Beladungsrate von Phosphorothioaten an HSA-Nanopartikel (HSA-PTO-NP)

Die Beladungseffizienz wurde durch Überstandsuntersuchungen mittels HPLC ermittelt. Vor dem Aufbringen auf die Säule wurden die gesammelten Überstand erneut bei 20.000 g / 25 min zentrifugiert. Die Peakflächen wurden integriert und der freie, ungebundene PTO-Anteil mit Hilfe einer PTO-Eichgeraden im linearen Bereich von 10 - 50 µg/mL über die Fläche korreliert.

3.5. Zellkultur

3.5.1. Kultivierung der verschiedenen Zelllinien

3.5.1.1. HeLa-Zellen

Die Kultivierung der adhärennten Zelllinie erfolgte in 75 cm² Kulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS, 1 h / 65°C inaktiviert), 2 mM L-Glutamin, 100 Units Penicillin/mL, 100 µg Streptomycin/mL bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden regelmäßig nach dem Waschen mit PBS-Puffer pH 7,4 alle 2 - 3 Tage mit Trypsin / EDTA abgelöst und gesplittet. Nach der Zellernte wurden die

HeLa-Zellen bei 800 U/min, 4 min lang pelletiert und der Rückstand wurde in 10 mL Medium wieder resuspendiert. Einige Tropfen (4 - 7) dieses Konzentrats wurden mit 25 mL frischem Medium wieder ausgesät.

3.5.1.2. Lymphozytäre Zellen

Es handelt sich bei Jurkat und CEM um Suspensionszellen, die in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 Units Penicillin/mL, 100 µg Streptomycin/mL bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert wurden. Zum Passagieren wurden die Zellen bei 1200 U/min für 7 min zentrifugiert, das alte Medium abgenommen und ein Teil der Zellen in frischem Zellkulturmedium weitergezogen.

3.5.1.3. Brustkrebszellen

Es handelt sich bei den hier eingesetzten vier Brustkrebszelllinien um die adhärenenten Zelllinien BT474, MCF-7, SK-BR-3 und MDA-MB-435. Kultiviert wurden sie in verschiedenen Medien, die je nach den Bedürfnissen supplementiert wurden.

BT474 und MCF-7 wuchsen in RPMI-Medium, SK-BR-3 in Mcoys 5a-Medium, MDA-MB-435 in DMEM F12 Ham-Medium. Alle Medien wurden supplementiert mit 10% FCS, 2% L-Glutamin und 1% Pen / Strep. Zusätzlich erhielten die BT474 noch Insulin (10 µg/mL) und insgesamt 20% FCS. Kultiviert wurden sie im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

3.5.2. Zellzahlbestimmung

Unter Verwendung einer Neugebauer-Zählkammer wurde die HeLa-Zellsuspension zuerst 1 : 10 mit Medium verdünnt und davon 50 µL entnommen. Dieses Volumen wurde mit 40 µL PBS-Puffer pH 7,4 und 10µL Trypanblaulösung gemischt. Die Kammer ist in 16 Felder eingeteilt, wovon jeweils 4 Quadrate unterm Mikroskop ausgezählt wurden. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / mL} = \frac{\text{Zellen} \times 16 \times \text{Verdünnung (1 : 2)}}{3,2 \times 4} \quad \times 1000$$

Die Zellzahlbestimmungen für lymphozytäre Zellen wurden in Kova[®]-Zählkammern durchgeführt. Hierzu wurden 100 µL Zellsuspension abgenommen und mit 100 µL einer Trypanblaulösung (0,5 M in PBS pH 7,4) verdünnt. Die Kammer ist in 9 Hauptquadrate untergliedert, die ihrerseits wieder in 9 Unterquadrate unterteilt sind. Jeweils 10 Unterquadrate wurden unterm Mikroskop ausgezählt. Der gebildete Mittelwert wurde durch 10 dividiert und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / mL} = \text{Zellen} \times 2 \times 1000 \times 9 \times 9$$

3.5.3. Zytotoxizitäts-Test (MTT-Test)

Der MTT-Test ist ein gebräuchliches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Viabilität von Zellen [Mosmann, 1983]. Zur Beurteilung der Toxizität der modifizierten Trägersysteme wurden HeLa Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden wie unter 3.5.1.1. beschrieben kultiviert und nach der Zellzahlbestimmung (siehe 3.5.2.) auf 50.000 - 80.000 Zellen/mL eingestellt. Von der Suspension wurden 200 µL in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und den Zellen wurde 24 Stunden Zeit gegeben, um zu adhären. Das Medium wurde dekantiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 4 Stunden lang mit 100 µL der verschiedenen NP-Zubereitungen in drei Konzentrationen inkubiert, die Überstände abgeschüttet und vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µL frischem Medium über Nacht im Brutschrank ruhen gelassen. Für die Reaktion wurden 25 µL einer steril filtrierten MTT-Lösung (2,5 mg/mL in PBS-Puffer pH 7,4) in jedes Well pipettiert. Durch die mitochondriale Dehydrogenase wurde das Reagenz innerhalb einer Stunde bei 37°C in das blau gefärbte Formazan umgewandelt. Die Kulturüberstände wurden nun vorsichtig abgenommen, die Zellmembran durch Zugabe von 200 µL basischem Lysereagenz (25% SDS in 0,1 N NaOH) aufgelöst und die Absorption bei 550 nm im ELISA-Reader bestimmt.

Die Bestimmungen wurden pro Inkubationsprobe 8-fach ausgeführt.

Zur Auswertung dienten unbehandelte Zellen als Wert für 100%ige Viabilität und Zellen, die bei der Inkubation 15 min lang mit einer 5%-igen PFA-Lösung vollständig abgetötet wurden, als Referenzwert für 0% Viabilität. Die Messdaten wurden abzüglich der Blindwerte rechnerisch auf diesen Bereich bezogen und ebenfalls in % Viabilität angegeben.

3.5.4. Antikörper-beladene Gel-Nanopartikel

3.5.4.1. Inkubation mit lymphozytären Zellen

Untersucht wurde die rezeptorvermittelte Aufnahme in Zellen des lymphozytären Systems über einen biotinylierten anti-CD3-AK, welcher über kovalent an die Partikeloberfläche gebundenes NeutrAvidinTM-FITC komplexiert wurde.

Jurkat-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausplattiert. Die Zellen wurden mit 1 mL der Partikelpräparation (1 mg/mL) für 4 Stunden bei 37°C und 7% CO₂ Begasung im Brutschrank inkubiert.

Zur Kontrolle wurden Competitionsexperimente mit freiem anti-CD3- und IgG-AK durchgeführt. Dazu wurden 30 min vor der Nanopartikelzugabe die entsprechenden Zellansätze mit 2,5 µg Antikörperlösung versetzt. Direkt im Anschluss an die Nanopartikelinkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer durch Zentrifugieren (2000 U/min für 5 min) und Redispergieren auf dem Vortex gewaschen. Die Proben wurden ohne Fixierung mit PFA in der FACS-Analyse gemessen (siehe 3.5.5.) und für die CLSM-Aufnahmen vorbereitet (siehe 3.5.6.1.).

Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen und IgG-Gel-NAv-FITC-NP unter identischen Zellkulturbedingungen mitgeführt, um eine unspezifische Zellaufnahme auszuschließen.

3.5.4.2. Inkubation mit Brustkrebszellen

Untersucht wurde die rezeptorvermittelte Aufnahme von Gel-NP in mehreren Brustkrebszelllinien, die sich bezüglich des Her2-Rezeptorstatus voneinander unterscheiden. Der biotinylierten anti-Her2-neu- bzw. Trastuzumab-AK wurde über kovalent an die Oberfläche gebundenes NeutrAvidinTM-FITC komplexiert.

Die vier Zelllinien (BT474, MCF-7, SK-BR-3 und MDA-MB-435) wurden in 24-Well-Platten ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert bis sie eine Konfluenz von 70% erreichten. Inkubiert wurden sie mit 100 µg/mL unmodifizierten und Antikörper beladenen Gel-NP für 3 h. Nach 2-fachem Waschen mit PBS wurden sie trypsinisiert, zentrifugiert und für die Analyse im FACS in PBS-Puffer (3%BSA, 0,5% Natriumazid) resuspendiert (siehe 3.5.5.).

3.5.5. Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Quantifizierung der oberflächlich an den Zellen anhaftenden oder aufgenommenen AK-Gel-NAv-NP erfolgte mit Durchflusszytometrie. Die Partikelpräparation wurde über ein FITC markiertes NeutrAvidinTM sichtbar gemacht.

Die gewaschenen Zellen des Zellinkubationsexperiments (siehe 3.5.4.) wurden in 400 µL PBS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt und für die Analyse verwendet. Die Fluoreszenzsignale von 10.000 lebenden Zellen wurden mit einem Argonlaser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm bestimmt und das Signal des FL-1-Kanals (530 nm bei Lymphozyten und 505 nm bei Brustkrebszellen) ausgewertet. Zur Ermittlung der Partikelbindung an die Zelloberfläche bzw. der Zellaufnahme wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Probe herangezogen.

3.5.6. Zellaufnahme mittels Konfokalem Laserscanning Mikroskop (CLSM)

3.5.6.1. Lymphozytäre Zellen

Zur Fixierung der Zellen auf Adhäsionsobjektträgern wurden die mit PBS-Puffer gewaschenen Zellen in 100 µL PBS aufgenommen und 20 µL der Probe auf einen Objektträger getropft. Die adhärenierten Zellen wurden nach 5 min mit PBS gespült, der Objektträger abgeklopft und die verbliebenen Zellen mit 20 µL PFA-Lösung 5% in PBS-Puffer fixiert. Nach 10 min Inkubation in einer feuchten Kammer wurde der überschüssige PFA durch Waschen mit PBS vorsichtig entfernt und die Zellmembran durch Zugabe von 20 µL einer 0,0005%-igen Concanavalin A Alexa[®] Fluor594 Konjugatlösung gefärbt. Nach 5 min wurden die Präparate mit einer Lösung bestehend aus Mowiol[®] 488 10%, Diazabicyclo [2,2,2] octan 2,5% und Glycerol 25% in 0,2 M Tris-Puffer pH 8,5 versetzt und

mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Präparate können so auch über längere Zeit im Kühlschrank vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

Die Proben des Zellkulturexperiments mit den Antikörper-beladenen Gel-NP wurden mit Hilfe der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie ausgewertet, um die Aufnahme der Nanopartikel in das Zellinnere sichtbar zu machen. Die Aufnahmen wurden mit einem 65fach vergrößerndem Objektiv durchgeführt und eine Schnittebene in z-Richtung ausgewählt, die sich im Inneren der Zellen befand. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs für die Zellmembranfärbung erfolgte bei 590 nm, die der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel bei 488 nm. Beide Fluoreszenzkanäle wurden dabei sequentiell aufgenommen, um Interferenzen zwischen Anregung und Emission beider Farbstoffe zu vermeiden („cross talk“). Die Bilddaten aus den so gewonnenen einzelnen Fluoreszenzkanälen wurden anschließend mit Hilfe der Software LUCIA zu einem Mischbild vereint („merging“).

3.5.6.2. Brustkrebszellen (SK-BR-3)

Die Zellen wurden in der Dichte von 2×10^5 Zellen in „slide flasks“ über Nacht ausplattiert, so dass sie adhären konnten. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µg/mL Trastuzumab-modifizierten oder Gel-NAV-FITC-NP für 3 h / 37°C und 7% CO₂ Begasung im Brutschrank inkubiert, bevor sie mit PBS-Puffer wieder herausgewaschen wurden. Zur Kontrolle wurde eine Preinkubation mit Trastuzumab-Lösung (2,5 µg/mL) für 30 min vor der Partikelinkubation durchgeführt.

Die Zellmembranfärbung wurde mit einer 0,0005-%igen (m/V) Concanavalin A Alexa[®] Fluor594 Konjugatlösung durchgeführt. Nach 2 min wurde das Reagenz mit PBS-Puffer durch 2-faches Waschen herausgespült und mit PFA-Lösung 4% über 30 min fixiert, welche dann durch 3-faches Spülen mit PBS entfernt wurde. Der Boden der Probenkammern wurden mit Vectashield[®]-Medium bedeckt und mit Deckgläschen verschlossen

Die Proben des Zellkulturexperiments mit den Antikörper-beladenen Gel-NP wurden mit Hilfe der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie ausgewertet, um die Nanopartikelaufnahme in das Zellinnere sichtbar zu machen. Zweikanalbilder mit einem Argon / Kryptonlaser bei einer Anregungswellenlänge von 488 und 568 nm wurden mit optischen Filtern für FITC und TRITC aufgenommen.

Eingesetzt wurde für diesen Versuch eine andere Scan-Software (TCS v.5.1) und die Bildaufbereitung wurde mit Imaris Software (Bitplane) in Kombination mit einem Silicon Graphics Computer durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung proteinbasierter Trägersysteme, die zum gezielten Transport von Antisense-Wirkstoffen in von Viren befallene Zellen eingesetzt werden können. Die als Wirkstoffe eingesetzten Oligonukleotide und Phosphorothioate weisen alle eine stark eingeschränkte Zellmembrangängigkeit auf, so dass der Einsatz von Nanopartikeln als Transportvehikel einen sinnvollen Ansatz darstellt. Die Wirkstoffbeladung erfolgt entweder durch direkte Einbettung in die Nanopartikelmatrix oder über die Bindung an chemisch modifizierte Oberflächenstrukturen. Um eine Anreicherung der Nanopartikel in den Zielzellen zu ermöglichen, werden sie auf der Oberfläche mit Antikörpern, die als spezifische Drug-Targeting-Liganden fungieren, versehen. Die präklinische Testung der verschiedenen Zubereitungen umfasst Untersuchungen zur Zytotoxizität, zellspezifischen Aufnahme und intrazelluläre Anreicherung.

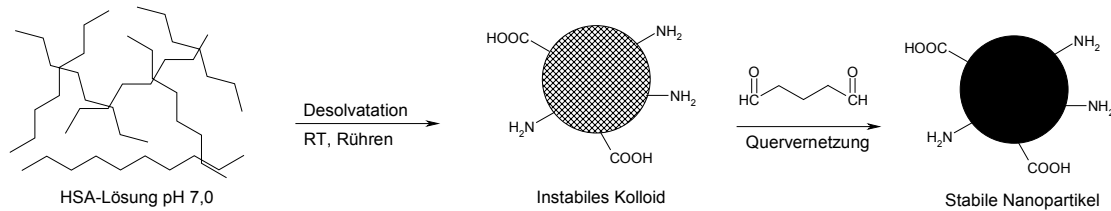
4.1. Herstellungsmethoden proteinbasierter Nanopartikel

4.1.1. Nanopartikel aus Albumin (HSA-NP)

Vielfach kommen synthetische Polymere wie Acrylsäurederivate als Trägermaterialien zum Einsatz. Die Monomere werden durch radikalische Polymerisationsreaktion, häufig unter sehr drastischen Reaktionsbedingungen, wie im stark sauren Milieu und zum Teil unter Wärmeeinwirkung zu Nanopartikeln umgesetzt. Eine Arzneistoffbindung kann daher, bei entsprechender Stabilität des Wirkstoffs, entweder inkorporativ während des Polymerisationsprozesses oder später adsorptiv an die Nanopartikeloberfläche erfolgen. Die Polymere weisen im allgemeinen nur eine geringe Affinität gegenüber hydrophilen Stoffen auf. Daneben werden sie häufig nur sehr langsam oder gar nicht biodegradiert. Die entstehenden Abbauprodukte können toxischer Natur sein, so dass daraus negative Effekte in der Zellkultur resultieren. Im weiteren bieten sie für chemische Modifikationen wenige Möglichkeiten, weshalb die Suche nach ver-

träglicheren Materialien begann. Proteinbasierte Nanopartikel bieten einen möglichen Ansatz zur Lösung dieser Nachteile.

Abbildung 4-1: Desolvatationsprozess zur Herstellung von HSA-NP



Bei der Auswahl des Proteins, welches zur Nanopartikelherstellung eingesetzt werden sollte, fiel die Wahl aus verschiedenen Gründen auf humanes Serumalbumin. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das in großen Mengen im Blut vorkommt, über eine hohe Arzneistoffbindungskapazität verfügt, als Arzneimittel zur Infusion zugelassen ist und hinreichend Möglichkeiten für chemische Modifikationen bietet. Die zuvor beschriebenen Nachteile der Nanopartikel auf synthetischer Polymerbasis können durch den Einsatz von natürlichen Polymeren ausgeschaltet werden. In der Abbildung 4-1 ist die Herstellung von HSA-NP über die Desolvatationstechnik aufgezeigt. Die Herstellungsvorschrift basiert auf einer von Weber et al. [C. Weber et al., 2000a] entwickelten Methode und ist in Anlehnung an die Desolvatationsmethode von Marty et al. [Marty et al., 1978] entstanden. Durch Zugabe des Nichtlösungsmittels Ethanol zu einer wässrigen Albuminlösung wird das Protein in nanopartikulärer Form unter Rühren ausgefällt und anschließend durch Zusatz des homo-bifunktionalen Glutaraldehyds auf chemischen Wege quervernetzt. Die Abtrennung von nicht abreagiertem gelöstem HSA, überschüssigem Quervernetzer und Fällungsmittel erfolgt durch wiederholtes Zentrifugieren und Redispergieren im Ultraschallbad. Die Gehaltsbestimmung (3.3.1.) der in Milli Q-Wasser (MQ) aufgenommenen Nanopartikel ergab eine Konzentration von durchschnittlich ~ 20 mg/mL. Sie wiesen eine mittlere Teilchengröße von 270 - 420 nm und einen geringen Polydispersitätsgrad, im Bereich von 0,01 bis 0,08 auf, so dass eine enge monomodale Größenverteilung vorlag (siehe 3.3.2.). Die Oberfläche war stark negativ geladen und die Messung des Zetapotentials ergab Werte von -20 bis -44 mV (siehe 3.3.3.).

Im Rahmen des Projektes wurde die Teilchengröße zum einen mit der dynamischen Laser-Lichtstreuung und zum anderen durch den Kooperationspartner Herrn Dr. Vitali Vogel am Institut für Biophysik an der J. W. Goethe Universität mit der analytischen Ultrazentrifuge (AUZ) überprüft. Die ermittelten Daten lagen im Schnitt um etwa 60 nm auseinander, wobei die in der analytischen UZ gemessenen Werte kleiner als die PCS-Angaben waren. Wichtiger als die absolute Teilchengröße ist eine einheitliche Verteilung; diese wurde mit beiden Verfahren nachgewiesen (siehe Tabelle 4-1) [Langer et al., 2003].

Tabelle 4-1: Vergleichende Größenbestimmung von HSA-NP mittels PCS und analytischer UZ

Probe	Partikeldurchmesser [nm]	
	PCS	analytische UZ
1	260	202
2	268	210
3	255	184
4	262	196
Mittelwert	261	198
S.D.	5,4	11,0

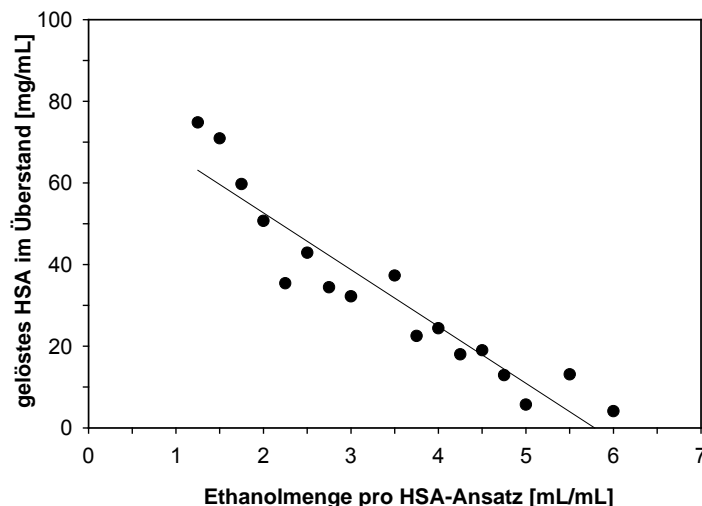
In der Literatur gibt es nicht viele, aber abweichende Aussagen bezüglich einer optimalen Teilchengröße für kolloidale Träger. Unbestritten ist, dass es sich um einen wichtigen physikochemischen Parameter handelt. Die Trägersysteme müssen so klein sein, dass es nach intravenöser Applikation nicht zu einer Embolie kommt, und die Partikel durch Filtration wieder aus dem Kapillarbett entfernt werden können. Eng mit der Größe verknüpft sind die Oberflächeneigenschaften. Es darf auf gar keinen Fall zu Gefäßverschlüssen durch Aggregationen der kolloidalen Träger kommen. Im weiteren wird in Abhängigkeit von den Oberflächeneigenschaften die Proteinadsorption an die Träger im biologischen Medium gesteuert. Das Ausmaß der Anlagerung scheint zumindest bei Liposomen von der Größe der Oberfläche und deren Krümmungsgrad beeinflusst zu werden. Es wurde beobachtet, dass die Opsonisierung bei Liposomen von 800 - 200 nm immer weiter abnahm. Eine erleichterte Phagozytose für Monozyten / Makrophagen wurde für Kolloide unter 200 nm

nicht mehr beobachtet [Harashima et al., 1994]. Für eine lange Verweildauer solider Partikelmatrizes im Organismus wird in diesem Zusammenhang eine Größe zwischen 100 - 200 nm und eine enge Verteilung als optimal betrachtet. In der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Partikel im Größenbereich > 500 nm durch einen phagozytotischen Mechanismus aufgenommen werden, während Nanopartikel im Größenbereich < 500 nm durch endozytotische Prozesse in die Zelle gelangen [Koval et al., 1998].

Die HSA-NP liegen damit nach bisherigen Erkenntnissen mit ihren ~300 nm in einem akzeptablen Bereich.

Im folgenden soll der Einfluss des Desolvationsmittels auf die Nanopartikelausbeute untersucht werden. Es zeigt sich, dass die im Überstand gelöste HSA-Menge abhängig ist von der zugesetzten Ethanolmenge. Bei den gewählten Umsetzungsbedingungen wird ausgehend von einer 10%-igen Proteinlösung bei einer um das 4-fache erhöhten Alkoholzugabe der Anteil an gelöstem Protein bis auf 4% reduziert (siehe Abbildung 4-2). Diese Werte stimmen mit den von Weber et al. [C. Weber et al., 2000a] ermittelten Daten überein.

Abbildung 4-2: Einfluss des Desolvationsmittels auf den nichtdesolvatisierten HSA-Anteil bei der Herstellung von HSA-NP



BCA-Lösung als ein Standard-Proteinreagenz wurde zur Quantifizierung des gelösten Proteins eingesetzt (siehe 3.3.7.). Die Nachweisreaktion beruht auf der Redoxreaktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} , es entsteht ein violett gefärbter Komplex mit

einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Reduktion der Kupferionen ist allerdings nicht selektiv für Proteine, da neben verschiedenen Aminosäuren auch andere funktionelle Gruppen (Aldehyde, Hydrazide u.a.) zur Ausbildung des BCA-Cu-Komplexes führen. Es wurde gezeigt, dass der Einfluss des Desolvationsmittels und des Glutaraldehyds vernachlässigt werden kann, daher diente eine reine HSA-Lösung als Eichgerade, die über einen weiten Konzentrationsbereich zu einem linearen Absorptionsanstieg führt.

4.1.2. HSA-Nanopartikeln beladen mit Phosphorothioaten (HSA-PTO-NP)

Die Wirkstoffbeladung eines Trägersystems kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen entweder direkt bei der Partikelherstellung durch Einschluss in die Matrix oder im Anschluss daran durch Bindung an Oberflächenstrukturen. Vorzuziehen ist der erste Weg, wenn gewährleistet ist, dass es durch Degradation oder Diffusion zu einer Wirkstofffreisetzung am Zielort kommt, da der Arzneistoff hierbei langfristiger gebunden und vor enzymatischen Angriffen geschützt vorliegt [Arnedo et al., 2002]. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie und Messung der Anisotropie wurde eine stöchiometrische Komplexbildung zwischen BSA : PTO (21mer) von 1 : 1 beobachtet. Das Konjugat bietet jedoch keinen Schutz vor enzymatischen Wirkstoffabbau [Arnedo et al., 2003]. Nach intravenöser Applikation wurde eine Dissoziationskonstante von $2,4-3,1 \times 10^{-4}$ M für eine 20mer PTO an HSA ermittelt [Srinivasan et al., 1995].

Die Untersuchungen von Geselowitz und Neckers mit einem Oligonukleotid in serumfreien und -haltigen Medium zeigen, dass das ODN nur mit der Zellmembran assoziiert ist, wenn das Medium serumfrei ist [Geselowitz and Neckers, 1995]. Ansonsten findet man vorrangig eine Bindung an BSA. Polyanionische Nukleinsäurederivate binden demnach spontan an BSA

Die Beladung erfolgte vor der Desolvatation über ein sich ausbildendes Ionenpaar, zwischen dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Oligonukleotide und dem zum Teil positiv geladenen Albumin. Nach Einstellung des adsorptiven Gleichgewichtes über elektrostatische Wechselwirkungen wird der assoziierte Komplex durch Ethanolzusatz ausgefällt. Albumin als natürliches Polymer vereint verschiedene Vorteile. Aufgrund seiner Herkunft ist es nicht immunogen und bioabbaubar und besitzt wie Gelatine eine Zulassung als Hilfsstoff bzw. als

Plasmaexpander. Es stellt mit ca. 41 mg/mL den Hauptproteinbestandteil des Blutes dar und verfügt über ein hohes Adsorptionsvermögen für viele Arzneistoffe.

Die HS-PTO-NP wurden in Anlehnung an die unter 3.2.1. beschriebene Standardherstellungsvorschrift für HSA-NP von Wartlick et al. [Wartlick et al., 2004] entwickelt. Die Einbindungseffizienz konnte durch das Einstellen der Proteinlösung auf einen pH-Wert von 5,5 - 6,0, der in der Nähe des isoelektrischen Punktes (5,3) von Albumin liegt, deutlich verbessert werden. Der Anteil an positiv geladenen Aminosäuren wird durch die pH-Wertverschiebung erhöht, so dass die Wahrscheinlichkeit der Ionenpaarabildung mit den PTOs erhöht wird.

Die Charakterisierung der Nanopartikel ergab vergleichbare Werte wie unter 4.1.1. beschrieben, wobei der mittlere Nanopartikeldurchmesser bei einer einheitlichen Größenverteilung zwischen 265 - 400 nm lag (siehe 3.3.2.). Das Zetapotential fällt trotz der Einführung negativ geladener Phosphorothioate nur im geringem Maße bzw. gar nicht ab und wies Werte zwischen -15 bis -30 mV (siehe 3.3.3.) auf. Die Bestimmung der Nanopartikelausbeute mit BCA-Reagenz erfolgte analog wie unter 4.1.1. beschrieben und fällt mit 70 - 80% deutlich geringer aus als für die unbeladenen HSA-NP; dies ist vermutlich auf die Reduktion der Proteinkonzentration in der Ausgangslösung von 10% auf 2% zurückzuführen.

Auf die gleiche Art und Weise, ebenfalls über adsorptive Wechselwirkungen, wurde versucht, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) an Albumin zu binden. Nach der Partikelherstellung wurde mittels HPLC-Analytik [C. Coester et al., 2000] der ungebundene PNA-Anteil im Überstand bestimmt. Im Ergebnis zeigt sich, dass die gesamte eingesetzte Wirkstoffmenge nach der Desolvation im Überstand wiedergefunden wurde. Dieser Ansatz scheiterte, weil das synthetische Rückrat der PNA keine Affinität zu Albumin aufwies.

4.1.3. Lösliches Konjugat aus Albumin und modifizierten Oligonukleotiden (HSA-SS-ODN)

Wie bereits unter Punkt 4.1.2. beschrieben wurde nun durch die Bildung eines löslichen Konjugats der Wirkstoff kovalent und direkt an das Trägermaterial ge-

bunden. Im Gegensatz zur instabileren Adsorption, die immer die Gefahr der Desorption durch mechanische Beanspruchung oder enzymatischen Angriff im Zellkulturmedium bzw. Blutplasma birgt, wird über eine kovalente Bindung ein stabileres System geschaffen. Dabei muss es sich um eine chemische Verknüpfung handeln, die durch im Zytoplasma vorkommende Enzyme wieder aufgespalten wird, so dass die Wirkstofffreisetzung erfolgen kann. Diese Anforderungen werden von einer reaktiv spaltbaren Disulfidverbindung erfüllt. Die beiden Komponenten wurden mit einem hetero-bifunktionalen Crosslinker verbunden. Es muss gewährleistet werden, dass die Funktionalität des Wirkstoffs erhalten bleibt und das lösliche Konjugat genau wie HSA alleine durch das zuvor etablierte Herstellungsverfahren zu Nanopartikeln umgesetzt werden kann.

Ausgewählt wurde der wasserlösliche Crosslinker Sulfo-LC-SPDP, der zum einen über eine amino- und zum anderen über eine sulfhydrylreaktive spezifische Bindungsstelle verfügt. Der Vorteil des Crosslinkers liegt in der einfachen Quantifizierung, die sich an eine erfolgreiche Umsetzung anschließt. Bei der Umsetzung der primären Aminogruppen des Proteins mit der Succinimidylstruktur des Crosslinkers wurde die Kopplungsrate im Anschluss durch eine reduktive Spaltung mit Dithiotreitol (DTT) bestimmt. Bei der im zweiten Schritt durchgeführten Bindung an die Thiolgruppe des Oligonukleotids dient das freiwerdende, photometrisch detektierbare Pyridin-2-thion zur Quantifizierung der Kopplungseffizienz. Oligonukleotide verfügen als DNA-Sequenzen weder über eine Amino- noch über eine Thiolgruppe. Daher werden sie vorher am 5'-Ende durch einen „Spacer“ mit einer Thiolgruppe versehen. Albumin verfügt durch Lysin über freie Aminogruppen. Die im Molekül vorkommenden SH-Gruppen des Cysteins liegen, abgesehen von einer alle als Disulfide vor. Die einzelnen Umsetzungsschritte sind in der Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 4-3: Reaktionsschema für die HSA-Aktivierung mit Sulfo-LC-SPDP und anschließende Quantifizierung der Umsetzung durch reduktive Spaltung mit DTT

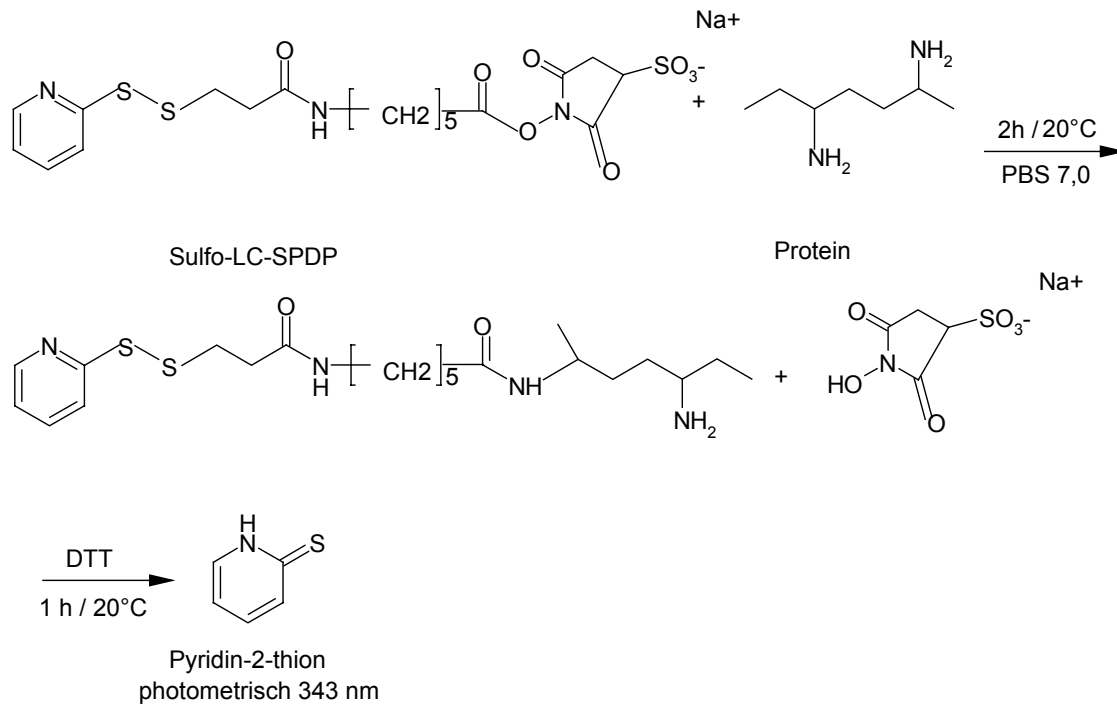
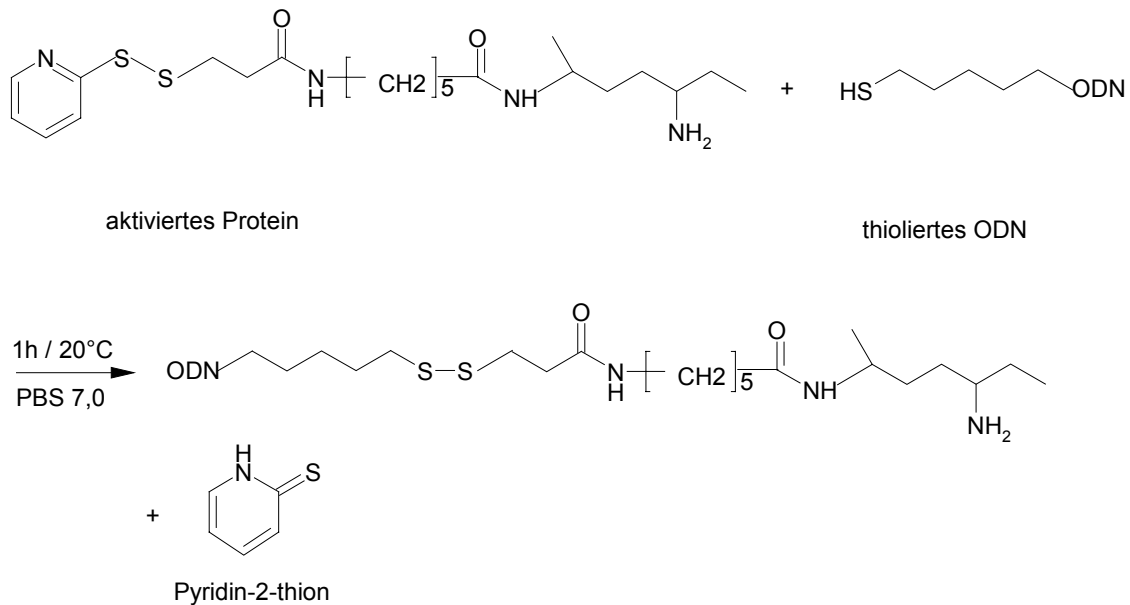


Abbildung 4-4: Konjugation von aktiviertem HSA an thioliertes Oligonukleotid



In der folgenden Tabelle 4-2 ist die Aktivierung des Albumins für acht verschiedene Ansätze aufgeführt.

Tabelle 4-2: Kovalente Bindung von HSA an den Crosslinker Sulfo-LC-SPDP

HSA Ansatzgröße [mg/mL]	HSA Ausbeute nach Aufreinigung [%]	Crosslinker pro HSA
11,7	88	12
16,1	77	8
10,6	75	7
10,6	60	7
20,3	32	6
56,6	63	6
50,5	61	7
64,3	25	12

Zur Abtrennung des im Überschuss zugesetzten Crosslinkers wurde eine Säulenaufreinigung durchgeführt. Die dabei anfallenden Fraktionen wurden photometrisch bei 280 nm auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Normalerweise ist der Hauptteil an aktiviertem HSA (aHSA) in den Eluaten 5 und 6 enthalten. Manchmal findet man allerdings auch eine nicht unerhebliche Menge schon in den Fraktionen 4 oder 7. Der durch die Aufreinigung bedingte Proteinverlust wurde über die Bestimmung des Trockenrückstandes (siehe 3.3.1.) ermittelt. Der Verlust durch die Aufreinigung war größer als erwartet, so dass sich im Durchschnitt nur eine Ausbeute von 60% ergab. Bei zwei in der Tabelle aufgeführten Gehaltsbestimmungen fällt die Ausbeute mit 25 und 32% deutlich aus dem Rahmen. Dies ist auf eine breite Streuung des Konjugats über mehr als zwei Eluatfraktionen zurückzuführen. Es wurden jedoch immer nur zwei Fraktionen vereinigt, um die Proteinkonzentration nicht zu stark zu verdünnen. Der im 15-fach molaren Überschuss zugesetzte Crosslinker reagiert nur zu einem kleinen Teil mit dem Protein, wenn man berücksichtigt, dass jedes HSA-Molekül theoretisch über 60 Aminogruppen verfügt [Rajur et al., 1997]. Im Durchschnitt wurden 6 - 8 Crosslinkermoleküle pro HSA-Molekül gebunden. Vergleicht man das Ergebnis mit der Menge an eingeführten Thiolgruppen durch Trauts Reagenz, ergaben sich vergleichbare Werte. Allerdings lässt sich die SH-Gruppenanzahl durch einen um das 8-fache gesteigerten Reagenzienzusatz auf maximal 14,8 pro HSA steigern [Carolin Weber, 2001]. Das Molekulargewicht von Trauts Reagenz zu Sulfo-LC-SPDP unterscheidet sich

um den Faktor 5. Diese Differenz könnte sich eventuell durch eine leichte, sterische Behinderung auf die maximal eingeführte Crosslinkerzahl pro Molekül HSA auswirken. Der Effekt eines höheren molaren Überschusses an Crosslinker wurde in dieser Arbeit nicht evaluiert.

Der kommerziell erworbene, lyophilisierte Oligonukleotid wies deutliche Qualitätsunterschiede bezüglich seines Anteils an SH-Monomer auf. Die direkt nach der Resolvatation in MQ durchgeführten HPLC-Untersuchungen belegten, dass schon ein erheblicher Anteil des Wirkstoffes Disulfidbrücken ausgebildet hatte und in dimerer Form vorlag. Der Kopplungsreaktion wurde deshalb eine in mit PBS gepufferter Lösung durchgeführte Reduktion mit DTT vorgeschaltet. Der Literatur ist zu entnehmen, dass andere Arbeitsgruppen ebenfalls einen Reduktionsschritt vor die Umsetzung gestellt haben [Rajur et al., 1997, Antopolsky et al., 1999]. Das im gewaltigen Überschuss zugesetzte DTT wurde vor der Weiterverarbeitung durch eine nachgeschaltete Dialyse erst wieder abgetrennt.

Die Verwendung eines reduktiven Gels auf der Basis von Trialkylphosphin führte nicht zum Erfolg [Han and Han, 1994, Getz et al., 1999]. Auf Grund des kleinen Molekulargewichtes von Oligonukleotiden war der Einsatz einer enorm großen Menge an Reduktionsgels erforderlich, so dass es zu einer starken Verdünnung der Lösung kommt, die eine Einengung der Lösung nach sich gezogen hätte.

Um die Anzahl freier SH-Gruppen (siehe 3.2.3.3.) zu bestimmen, wurde eine Umsetzung mit Ellmans Reagenz angeschlossen. Als Kontrollen wurden eine reine und gleich behandelte DTT-Lösung und eine unbehandelte ODN-Lösung eingesetzt. Das Oligonukleotid lag nach der Behandlung zu 60 - 90% als SH-Monomer vor. Der aufgetretene Materialverlust durch die Aufreinigung ist vergleichbar mit dem bei der Säulenaufreinigung. Bei allen weiteren Versuchen wurde als Kontrolle eine aufgereinigte DTT-Lösung zur Gewährleistung einer vollständigen Abtrennung und zur richtigen Interpretation der Konjugationsergebnisse mitgeführt.

Die Kopplungseffizienz des aktivierten HSA (aHSA) mit dem SH-ODN wurde durch die Verlängerung der Inkubationszeit von einer auf drei Stunden deutlich verbessert. Der Vorgang wurde photometrisch über die ansteigenden Absorptionswerte des freiwerdenden Pyridin-2-thions verfolgt. An jedem zweiten bis siebten HSA-Molekül hängt nun ein Oligonukleotid, wobei verschiedene weitere

Parameter die Bindungseffizienz beeinflussen; dazu zählen die Anzahl der eingeführten Crosslinkermoleküle, die effiziente Reduktion der thiolmodifizierten Oligonukleotide und das molare Umsetzungsverhältnis von aHSA zu reduziertem SH-ODN. Eine Übersicht verschiedener Ansätze stellt die nachfolgende Tabelle dar.

Tabelle 4-3: Ergebnisse der Bindung von SH-ODN an aktiviertes HSA

Crosslinker pro HSA	SH-ODN Monomere [%]	Umsetzungsverhältnis SH-ODN / HSA [mol/mol]	SH-ODN gebunden [%]	SH-ODN / HSA [mol/mol]
7	66	1 : 5	112	1 : 14
7	29	1 : 3	72	1 : 14
6	73	1 : 3	43	1 : 22
7	93	1 : 2	107	1 : 41
12	83	1 : 2	99	1 : 63

Eingesetzt wurden Oligonukleotide mit einer Sequenzlänge von 15 (Tabelle 4-3, Zeile 1-3) und 20 (Zeile 4, 5) Basen. Aufgrund der parallel durchgeführten Antisense-Testung, die mit anderen proteinbasierten Trägersystemen (Protaminpartikeln, die über elektrostatische Wechselwirkungen mit Oligonukleotiden gekoppelt wurden) aus der Arbeitsgruppe erfolgte; zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur [Lebedeva et al., 2000], ein besseres Ergebnis bei einer um 5 Basen verlängerten, stärker spezifisch bindenden Sequenz. Im Gegensatz zu einer adsorptiven Einbindung ist bei einer kovalenten Bindung die Verlängerung der Basensequenz kaum von Bedeutung für die Bindungseffizienz.

Die in der Herstellungsvorschrift beschriebenen molaren Umsetzungsverhältnisse zwischen HSA und SH-ODN beziehen sich auf die ursprünglich eingesetzte ODN-Menge, ohne Berücksichtigung der durch die Aufreinigung bedingten Verluste. In der Versuchsbeschreibung (siehe 3.2.3.4.) ist ein molares Ansatzverhältnis von SH-ODN zu aHSA von 1,4 : 1 bei Einsatz eines 15-mer ODN angegeben, dies verschiebt sich durch die Verwendung eines 20-mer ODN zu einem theoretischen Verhältnis von 1 : 1. Durch schwankende

HSA-Einwaagen und aufreinigungsbedingte variiierenden Verlusten beider Umsetzungskomponenten kommt es zu Abweichungen von der berechneten Grundlage. Für die Ergebnisberechnung in der dargestellten Tabelle wurde nur der als SH-Monomer vorliegende Wirkstoffanteil einbezogen, so dass aufgrund der unterschiedlichen SH-Reduktionsergebnisse, die molaren Verhältnisse der beiden Reaktionspartner von der Protokollvorlage abweichen. Trotz einer Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der SH-ODN-Komponente weist das 20 mer eine um das 3 – 4 fache erniedrigte Bindung an aHSA auf. Diese Beobachtung könnte aufgrund störender sterischer Effekte verursacht werden. Natürlich spielt neben dem molaren Verhältnis auch die Anzahl eingeführter Crosslinkermoleküle in HSA eine Rolle. Das letzte Ergebnis in der Tabelle fällt durch die hohe Menge an gebundenen Crosslinkermolekülen aus dem Rahmen. Die nachgeschaltete gravimetrische Untersuchung ergab, bezogen auf die eingewogene Menge, einen großen Verlust an aHSA, so dass eine fehlerhafter Gehaltsbestimmung eine mögliche Erklärung wäre.

Dass eine SH-ODN Bindung größer als 100% ermittelt wurde, kann nicht durch adsorptive, unspezifische Bindung erklärt werden, da es durch die kovalente Kopplungsreaktion zur Freisetzung des photometrisch detektierbaren Pyridin-2-thions kommt. Zur Korrektur der Messwerte wurde der Absorptionswert einer gleich verdünnten Lösung aktivierten Proteins eingesetzt und abgezogen. Es wurde allerdings beobachtet, dass die Absorption der mit ODN versetzten ursprünglichen HSA-Lösung deutlich höher als die der reine Proteinlösung war, wobei der Wert immer noch unterhalb der Kontrolllösung von aHSA lag. Zur Überprüfung wurde zusätzlich noch die nicht reduzierte SH-ODN-Lösung mit aHSA umgesetzt, so wurde eine Bestätigung für die SH-Gruppenbestimmung mit Ellmans Reagenz nach der DTT-Reduktion erhalten (siehe 3.2.3.3.).

Ein Problem bei der Herstellung des Konjugats sind die kleinen Ansatzgrößen, dies gilt im besonderen für die Menge an eingesetztem Oligonukleotid. Die vielen Reaktionsschritte und die damit verbundenen Gehaltsbestimmungen führen möglicherweise zu einer Potenzierung von Fehlern, so dass es zum Teil zu nicht interpretierbaren Werten bei den Kontrollen kam und zu Ergebnissen, in denen eine Bindungseffizienz von über 100% ermittelt wurden.

4.1.4. Umsetzung des löslichen Konjugats zu Nanopartikeln durch Desolvatation (HSA-SS-ODN-NP)

Eine Zellaufnahme alleine und eine Antisense-Wirkung ließen sich auch mit einem löslichen Konjugat erreichen. Das am 5'Ende mit einer SH-Gruppe versehene und über einen Crosslinker an HSA geknüpfte ODN könnte zusätzlich über ein Biotin am 3'Ende mit einem spezifischen Targeting-Liganden versehen werden. Nanopartikuläre Trägersysteme bieten jedoch im Vergleich zu löslichen Konjugaten einen Schutz vor Wirkstoffabbau, erhöhen eine endozytotische Zellaufnahme, zirkulieren länger im Organismus, üben also einen Depoteffekt aus, bieten durch ihre größere Oberfläche mehr Möglichkeiten für eigenschaftsverändernde Modifikationen und somit eine größere Anzahl an Bindungsstellen für Targeting-Liganden.

Das Konjugat wurde in Anlehnung an die Standardvorschrift (siehe 3.2.1.) durch langsame Ethanolzugabe zu Nanopartikeln umgesetzt. Obwohl lediglich eine ~1% ige Proteinlösung eingesetzt wurde, konnte im Überstand mittels Mikro-BCA-Reagenz (Durchführung analog 3.3.7.) kein gelöstes HSA mehr gefunden werden. Die Nanopartikel wurden in Anlehnung an die adsorptiv beladenen HSA-PTO-NP nur zu 40%, bezogen auf die 60 Aminogruppen im HSA-Molekül, quervernetzt. Nur diese schwächere Quervernetzung ermöglicht das Auflösen und die Wirkstofffreisetzung mittels Proteinase K aus der Nanopartikelmatrix (siehe 3.3.5.2.2.).

Ein allgemeines Umsetzungsschema von Nanopartikeln aus löslichen Konjugaten ist in der Abbildung 4-5 dargestellt. In der Abbildung 4-6 sind die genauen chemischen Strukturen wiedergegeben.

Abbildung 4-5: Allgemeines Reaktionsschema für Nanopartikelherstellung aus dem löslichen Konjugat

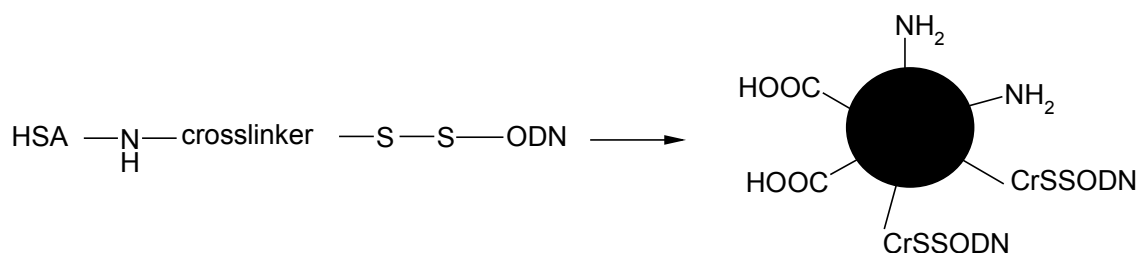
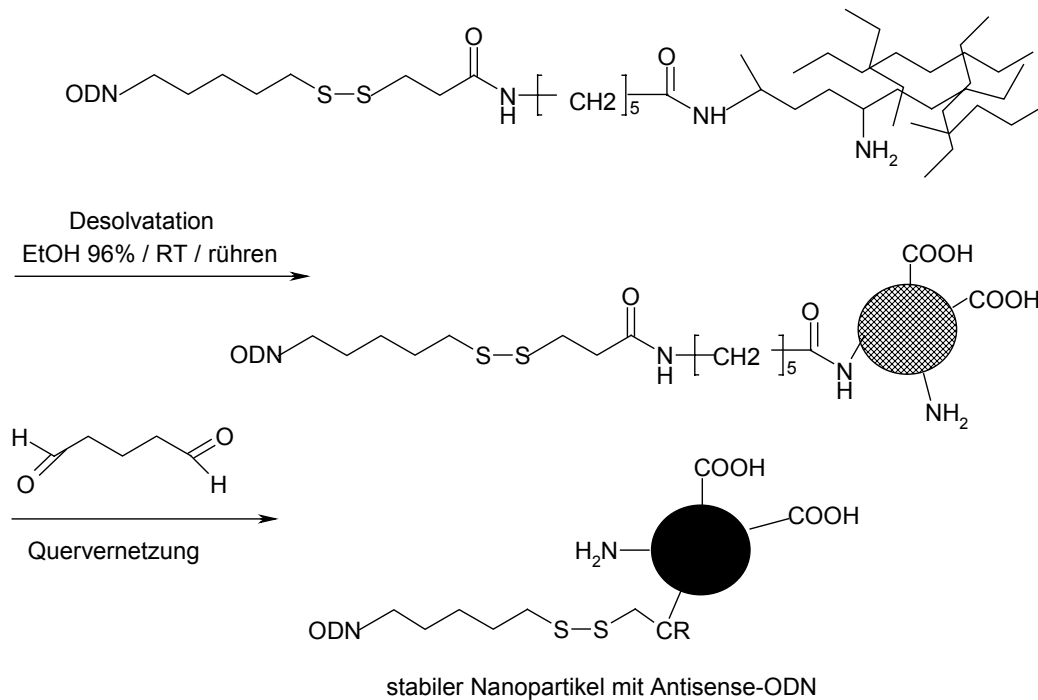


Abbildung 4-6: Umsetzung des löslichen Konjugats zu einem soliden Nanopartikel



Die anfallenden Nanopartikel wurden ebenfalls durch Zentrifugieren und Redispersieren im Ultraschalbad aufgereinigt und in Milli Q-Wasser aufgenommen. Die beladenen Nanopartikel wiesen mit 160 - 180 nm einen kleineren mittleren Teilchendurchmesser als die Leertypen mit 300 nm, die aus aHSA-Lösung hergestellt wurden. Allerdings trat bei den aus dem Konjugat hergestellten Nanopartikeln eine breitere Größenstreuung auf. Die Oberfläche ist, wie zu erwarten, durch die Einführung eines Polyanions stark negativ geladen und die Messung des Zetapotentials ergab Werte von -40 mV.

Die Beladungseffizienz konnte auf diesem Weg im Vergleich zu der adsorptiven Einbindung auf 25 - 32 $\mu\text{g}/\text{mg}$ HSA verdoppelt werden. Die Bestimmung der gebundenen Wirkstoffmenge erfolgte im Überstand und durch Partikelabbau mittels Proteinase K. Im Überstand wurden mit HPLC-Analytik 18% des Wirkstoffs wiedergefunden, während durch den enzymatischen Verdau lediglich 40 - 54% wieder aus der Matrix freigesetzt wurden. Genau wie bei der adsorptiven Wirkstoffeinbindung tritt auch hier ein Oligonukleotidverlust von 30 - 40% bei der Wiederfindung auf.

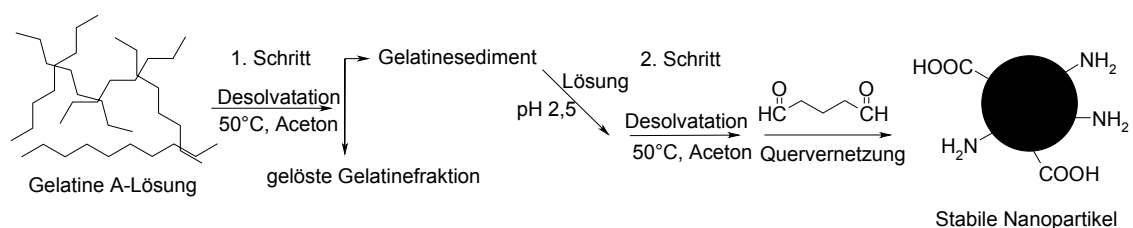
Man hat nun die Möglichkeit, mit Hilfe der etablierten Oberflächenmodifikationen die Nanopartikel durch Kopplung von spezifischen Drug-Targeting-Liganden zu einem Drug-Delivery-System weiter zu entwickeln.

4.1.5. Nanopartikel aus Gelatine A (Gel-NP)

Neben Nanopartikeln aus humanem Serumalbumin wurden noch Träger auf Gelatinebasis produziert. Die Herstellungsvorschrift ist in Anlehnung an die Desolvatationsmethode von Marty et al. [Marty et al., 1978] von Coester et al. [C. J. Coester et al., 2000] weiterentwickelt worden (siehe Abbildung 4-1 und Abbildung 4-7).

Da es sich bei Gelatine im Gegensatz zu Albumin um ein nicht näher definiertes Protein mit einer variablen Aminosäurezusammensetzung handelt, wurde bei der Herstellung ein zweistufiges Verfahren eingesetzt. Nach Erwärmen der kolloidalen Gelatinelösung wurde durch Acetonzusatz als Desolvatationsmittel der mengenmäßig größte Proteinanteil ausgefällt. Die bisherigen Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie ergaben, dass es zu einer Anreicherung des höhermolekularen Anteils im Sediment kommt [C. J. Coester et al., 2000]. Durch die Abtrennung der niedermolekularen Fraktion im ersten Desolvatationsschritt kommt es im zweiten Schritt zur Ausbildung einer stabileren Partikeldispersion. Die zuvor bei Marty et al. aufgetretenen Aggregationen wurden über diesen Umweg behoben. Essentiell für die Stabilisierung des sich bildenden Kolloides scheint die Verschiebung des pH-Wertes in den stark sauren Bereich, weit entfernt vom isoelektrischen Punkt (IEP bei pH-Wert 7 - 8,5) der Gelatine A, zu sein. Hierdurch kommt es zur Protonierung von Amino- und Carboxylgruppen.

Abbildung 4-7: Zweistufige Desolvatationsmethode zur Herstellung von Gel-NP



In der Abbildung 4-7 wird die Herstellung von Gel-NP dargestellt. Nach der Abtrennung des höhermolekularen Proteinanteils durch die erste Acetonzugabe wird die ausgefällte Gelatine erneut in Wasser aufgelöst und nach Einstellen

des pH-Wertes, mit Aceton zu Nanopartikeln umgesetzt. Die Stabilisierung des Systems erfolgt abschließend wieder durch Glutaraldehydzusatz.

Um den Einfluss der Desolvatationsmenge auf die Molekulargewichtsverteilung zu untersuchen, wurde die unter 3.2.4.1. beschriebene Versuchsreihe durchgeführt. Untersucht wurden die native Gelatinelösung und das Sediment bzw. die Überstände nach Zugabe der verschiedenen Acetonvolumina im ersten Desolvationsschritt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte diente eine Eichgerade globulärer Standardproteine, die einen Bereich von 0,137 - 660 kDa abdecken. Da Gelatine nicht als globuläres Protein vorliegt, sind die angegebenen Molekulargewichte nur als Annäherung zu betrachten. Im folgenden wurde die Auswirkung des ersten Desolvationsschritts auf das Ausgangsmaterial Gelatine untersucht. Analysiert wurde inwieweit die Präzipitation mittels Aceton die Proteinzusammensetzung verändert.

Abbildung 4-8: Molekulargewichtsverteilung im Überstand nach der 1. Desolvation

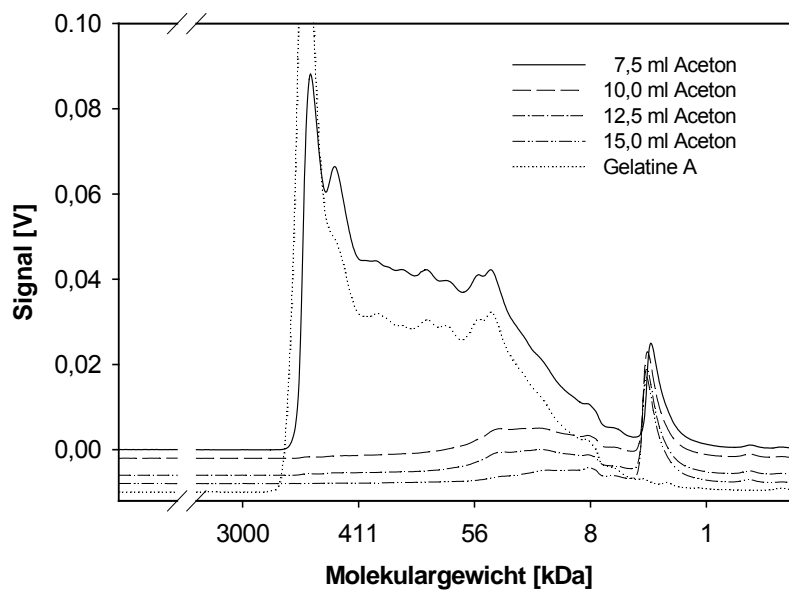
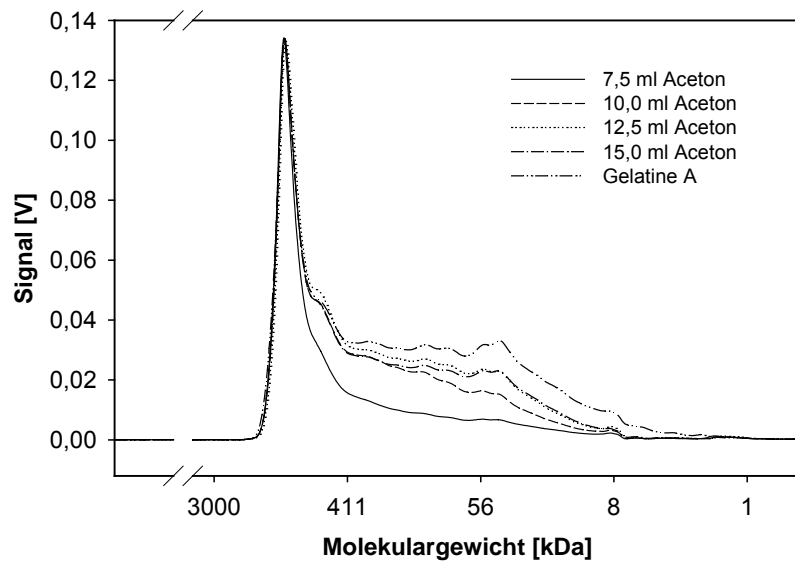


Abbildung 4-9: Molekulargewichtsverteilung im Sediment nach der 1. Desolvation



Die Untersuchungen beweisen, dass die zugesetzte Acetonmenge die Proteinzusammensetzung bezüglich des Molekulargewichtes beeinflusst. Man kann deutlich erkennen, dass schon bei einer Zugabe von 7,5 mL Aceton der hochmolekulare Anteil im Überstand deutlich abfällt (siehe Abbildung 4-8). Im Sediment zeigt sich adäquat dazu ein schmalere Peak der hochmolekularen Fraktion (siehe Abbildung 4-9). Bei einer Zugabe von 7,5 mL zeigt sich die schärfste Abtrennung der höhermolekularen Gelatinefraktion. Die Steigerung der Zugabe bis zu 15 mL Aceton führt zu einer nahezu vollständigen Präzipitation der Gelatine. Dieser Ansatz zeigt die Obergrenze auf, weil sich die Lösung genau wie die ursprüngliche Gelatinelösung verhält. Beide lassen sich nun nicht mehr zu einer stabilen Nanopartikeldispersion umsetzen. Die Verteilung für Gelatine A erstreckt sich nach dieser Untersuchung in einem molekularen Bereich von 7 - 1500 kDa. Interessant ist der sich stark verändernde Bereich zwischen 7,5 und 10,0 mL. Aus diesem Grund wurde in einem neuen Ansatz mit dem gleichen Versuchsaufbau der Volumenbereich von 7,0 - 9,0 mL noch einmal näher betrachtet.

Abbildung 4-10: Molekulargewichtsverteilung im Überstand nach der 1. Desolvation

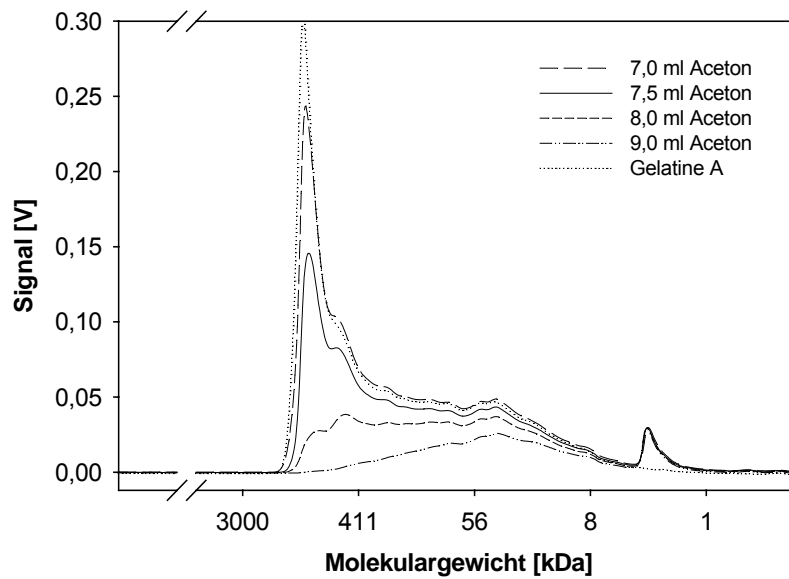
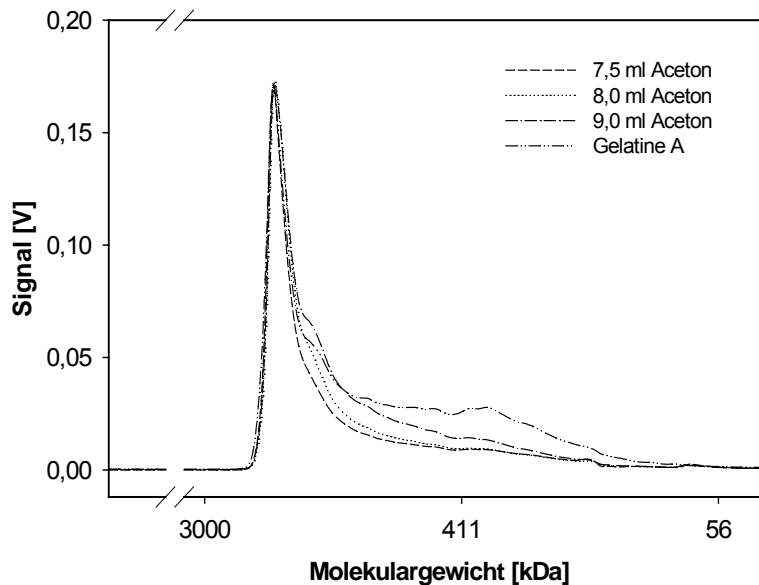


Abbildung 4-11: Molekulargewichtsverteilung im Sediment nach der 1. Desolvation



In den Abbildungen (siehe Abbildung 4-10) zeigt sich, dass Volumina von 7,0 – 7,5 mL eine gute Trennschärfe liefern. Schon Zugaben über 7,5 mL führen zu einer schlechteren Trennleistung. Die Auswertung des Sediments (siehe Abbildung 4-11) war für den Zusatz von 7,0 mL Aceton wegen des zu geringen Gelatinepräzipitates nicht durchführbar. Aufgrund des niedrigen Proteingehalts war der Überstand für die zweite Desolvation durch Dekantieren kaum von

der überstehenden Lösung abzutrennen und eine akzeptable Nanopartikel-ausbeute wurde nicht erreicht (siehe Tabelle 4-4 und Tabelle 4-5).

Neben der zugesetzten Menge an Desolvatationsreagenz haben noch andere Parameter wie die Proteinkonzentration, die Temperatur, der pH-Wert und die Art des Fällungsmittels einen Einfluss auf die Molekulargewichtsverteilung. Der Einsatz von Ethanol anstelle des Acetons wie auch eine Konzentrationserhöhung der Ausgangslösungen führten nicht zu einem reproduzierbaren Herstellungsprozess. Die Temperatur wurde nicht weiter variiert. Vor dem Dekantieren wurde lediglich überprüft, dass sich die Lösung auf 23 - 25°C abgekühlt hat.

Da es sich trotz aller Bemühungen um eine von vielen Variablen abhängige Konventionenmethode handelt, wäre es wünschenswert, ein definiertes Ausgangsmaterial - wie im Fall von Albumin - zur Verfügung zu haben, in der Hoffnung, den ersten Desolvatationsschritt umgehen zu können.

Der Einfluss des Desolvatationsmittels auf die Ausbeute von Gel-NP soll analog wie für HSA-NP auch gezeigt werden [C. Weber et al., 2000a]. Dafür wurden beide Herstellungsschritte auf diesen Parameter hin, wie unter 3.2.4.2. beschrieben, untersucht. Die Proteinbestimmung wurde mit zwei Methoden bestimmt. Das ausgefällte Sediment wurde mit BCA-Reagenz (siehe 3.3.5.1.) und gravimetrisch (siehe 3.3.1.) analysiert. Wegen der zurückbleibenden geringen Menge an gelöster Gelatine im Überstand wurde hier nur die kolorimetrische Absorptionsmessung durchgeführt.

Tabelle 4-4: Bestimmung der Gelatinemenge nach dem 1. Desolvatationsschritt

Acetonvolumen [mL]	Gelatinemenge [%]	
	Überstand	Sediment
7,5	28,8	72,2
10,0	8,9	91,1
12,5	2,1	97,9
15,0	1,1	98,9

Tabelle 4-5: Bestimmung der Gelatinemenge nach dem 2. Desolvationsschritt

Acetonvolumen im 2. Schritt [mL]	Gelöste Gelatine im Überstand [%]			
	Acetonzugabe im 1. Schritt			
	7,5 mL	10,0 mL	12,5 mL	15,0 mL
20,0	-	90,8	96,9	87,9
30,0	-	63,5	60,0	60,4
40,0	61,8	24,0	29,7	30,1

Die Ergebnisse in der Tabelle 4-4 zeigen, dass durch die Steigerung der Acetonmenge im ersten Desolvationsschritt von 7,5 auf 15,0 mL der Anteil an gelöstem Protein im Überstand von 28,8 auf 1,1% stark reduziert wurde. Wie schon für HSA-NP gezeigt wurde (siehe Abbildung 4-2), kann die Nanopartikel- ausbeute durch die Erhöhung der Desolvationsmenge gesteigert werden. Die Steigerung der Acetonmenge auf das Zweifache im 2. Umsetzungsschritt führt zu einer signifikant verbesserten Ausbeute an Nanopartikeln. Nimmt man beide Ergebnisse zusammen, dann liegt die Nanopartikelausbeute mit 70 – 75% deutlich unter den 96%, die bei der HSA-NP Herstellung erreicht wurden.

Der Einfluss der ersten Acetonzugabe hat keine so große Relevanz auf eine möglichst gute Ausbeute. Im Vordergrund steht hier der Einfluss auf die Molekulargewichtsverteilung. Nimmt man die Erkenntnisse beider Untersuchungen zusammen, wurde die beste Trennschärfe zwischen hoch- und niedermolekularer Gelatine bei einer Acetonzugabe von 7,5 mL erzielt. Die Daten unterstützen die These, dass eine Abtrennung des niedermolekularen Anteils im ersten Desolvationsschritt zu einer robusteren und reproduzierbaren Herstellungsmethode beiträgt. Einen vernünftigen Kompromiss zwischen einer akzeptablen Nanopartikelausbeute und einer zuverlässigen Herstellungstechnik stellt die Zugabe von 10,0 mL im ersten und von 40,0 mL Aceton im zweiten Desolvationsschritt dar. Bei der abschließenden Aufreinigung wurde das Volumen der Nanopartikeldispersion um ein Viertel des Volumens reduziert, und in Analogie zu den HSA-NP auf einen Gehalt von 20 - 25 mg/mL eingestellt (siehe 3.3.1.).

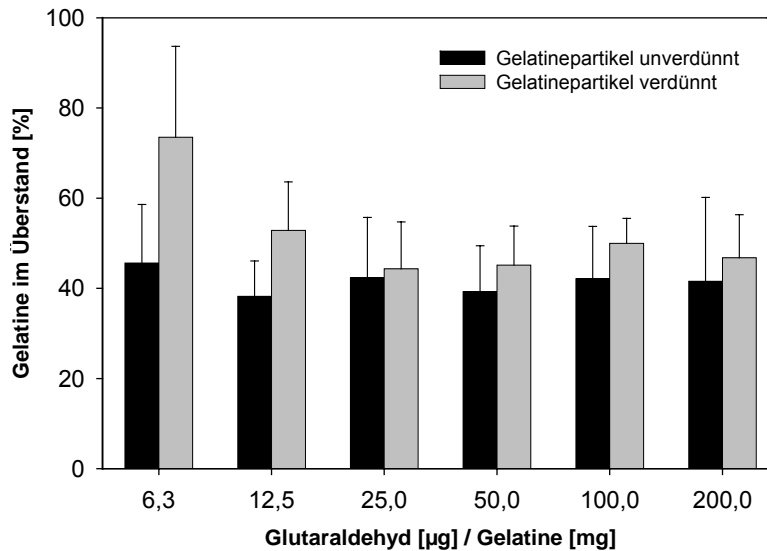
Ein weiterer Herstellungsparameter, der bisher nicht näher untersucht wurde, ist die Glutaraldehydmenge, die für eine ausreichende Stabilisierung benötigt

wird. Bei der Stabilisierung der Nanopartikelmatrix wurde wegen der angestrebten quantitativen Umsetzung auch bei einem stark sauren pH-Wert mit einem großen Überschuss an Crosslinker gearbeitet. Bei der Quervernetzung muss allerdings immer ein Kompromiss zwischen einer ausreichenden physikalischen Stabilität und einem späteren Partikelabbau in der Zellkultur gefunden werden. Entscheidend für die Wirkung in der Zelle ist nämlich die Freisetzung eines Wirkstoffes aus dem Träger. Einerseits muß eine frühzeitige Freisetzung des inkorporierten Wirkstoffes durch Diffusion oder Abbau des Trägers im Nicht-Zielgewebe verhindert werden und andererseits muß es beim Erreichen des Zielortes zu einer schnellen und möglichst quantitativen Freigabe aus der Matrix kommen. Der Quervernetzung kommt im Zusammenhang mit einer späteren Wirkstoffbeladung und Anwendung in der Zellkultur eine besondere Bedeutung zu. Deshalb wurde im Weiteren auf dem Weg zu einem vollständig charakterisierten Trägersystem der noch offene Parameter der Quervernetzung evaluiert.

Eine stöchiometrische Kalkulation konnte, im Gegensatz zu Albumin, wegen der unbekanntenen Aminosäurezusammensetzung nicht durchgeführt werden. Die Umsetzung von Aldehyden mit primären Aminogruppen zu Schiffsbasen ist eine pH-abhängige Reaktion und läuft im neutralen oder alkalischen schnell und effizient ab. Bei dem durch die Herstellungsmethode bedingten stark saurem pH-Wert von 2,5 ist die Reaktivität primärer Aminogruppen stark eingeschränkt, so dass ausgehend von den Erfahrungen mit anderen natürlichen Proteinen (siehe 3.2.1.) für das Standardherstellungsprotokoll Glutaraldehydkonzentrationen von ~100 µg/mg Gelatine eingesetzt wurden. Den Einfluss den die Acetonzugabe auf die Molekulargewichtsverteilung im ersten Desolvationsschritt hat wurde hier berücksichtigt, indem abweichend von dem Standardherstellungsprotokoll (siehe 3.2.4.) 7,5 mL anstatt 10,0 mL Aceton zugegeben wurden.

In der unter Punkt 3.2.4.3. beschriebenen Versuchsreihe wurden Glutaraldehydmengen von 12,5 – 200 µg/mg Gelatine eingesetzt. Der frei und gelöste Proteinanteil wurde wieder mit BCA-Reagenz bestimmt.

Abbildung 4-12: Einfluss des Glutaraldehyds auf die Stabilität von Gel-NP, die vor oder nach der Zentrifugation mit MQ (1:10) verdünnt wurden



Die Ergebnisse in Abbildung 4-12 zeigen, dass schon durch den Zusatz von 25 µg Glutaraldehyd pro mg Gelatine, eine ausreichende physikalische Stabilität erreicht wurde. Die niedrigste Konzentration von 6,3 µg/mg Gelatine reicht für die Stabilisierung nicht aus, weil hier die Nanopartikel lediglich im Aceton / Wasser-Gemisch stabil sind. Beim Aufreinigungsprozess entstand eine nicht resuspendierbare, gallertartige Masse und der gelöste Gelatineanteil im Überstand steigt deutlich an. Die im Standardprotokoll (siehe 3.2.4.) verwendete Glutaraldehydmenge von 100 µg/mg Gelatine übersteigt den ermittelten minimal erforderlichen Wert um das 4-fache. Die im Überstand ermittelte Menge an gelöster Gelatine entspricht den Werten, die bezüglich des Desolvatationsmitteleinflusses auf die Ausbeute gemacht wurde (siehe Tabelle 4-5). Der Quervernetzungsgrad zur Herstellung einer physikalisch stabilen Nanopartikelsuspension hat wie erwartet keine Auswirkungen auf die gelöste Gelatinemenge im Überstand und somit auch nicht auf deren Ausbeute.

Der Grad der Quervernetzung hat außer auf die Degradation auch noch Einfluss auf die Anzahl der freien Aminogruppen auf der Partikeloberfläche [C. Weber et al., 2000a] (siehe Abbildung 4-17). Unter den Bedingungen des Standardherstellungsprotokolls wurden im Durchschnitt mit der TNBS-Reaktion (siehe 3.3.6.) 4×10^{-8} mol Aminogruppen / mg Protein gefunden. Basierend auf Literaturdaten [Digenis et al., 1994], die Werte von 33 ε-Aminogruppen pro

1000 Aminosäuren in einem Molekül Gelatine angeben, sind somit trotz starker Quervernetzung noch 30% der Aminogruppen verfügbar. Diese Anzahl ist ausreichend für die weiteren chemischen Oberflächenmodifikationen und liegt sogar über den 23%, die für HSA-NP detektiert wurden.

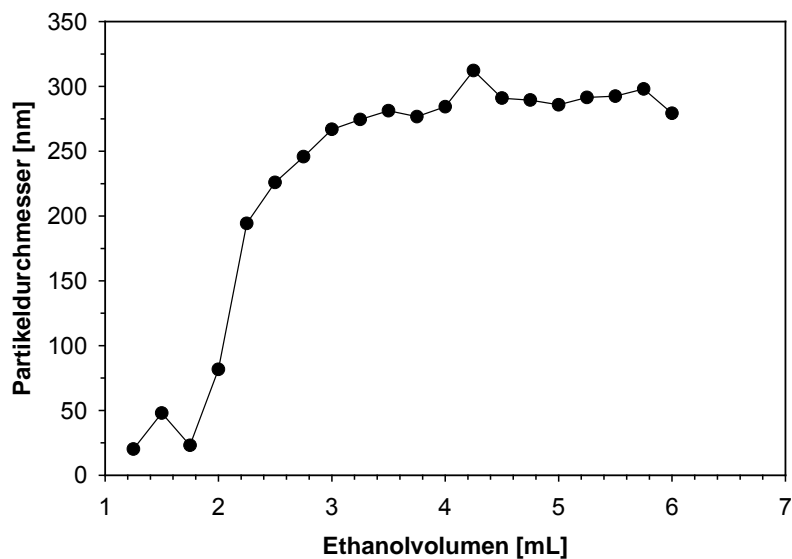
Die in MQ aufgenommenen Nanopartikel weisen eine mittlere Teilchengröße von 250 - 330 nm und einen geringen Polydispersitätsgrad von 0,02 bis 0,08 auf, dass heißt es liegt eine enge monomodale Größenverteilung vor (siehe 3.3.2.). Die Oberfläche des unmodifizierten Trägers ist in Wasser positiv geladen und die Messung des Zetapotentials ergab Werte von +4 bis +21 mV (siehe 3.3.3.).

4.2. Charakterisierung der HSA-Nanopartikel

4.2.1. Einfluss des Desolvationsmittels auf die Partikeldurchmesser

Untersucht wurde bisher der Einfluss des Desolvationsmittels auf die Ausbeute von HSA-NP. Nicht bestimmt wurde ob die Erhöhung der zugesetzten Menge an Desolvationsreagenz auch zu einer Veränderung des Partikeldurchmessers führt.

Abbildung 4-13: Partikeldurchmesser in Abhängigkeit des Ethanolvolumens



Anhand der in Abbildung 4-13 abgebildeten Grafik lässt sich ein signifikantes Ansteigen des Nanopartikeldurchmessers durch Steigerung der Ethanolmenge beobachten. Bis zu einer Ethanolzugabe von 3,0 mL, welche dem 1,5-fachen Volumen der Ausgangslösung entspricht, wurde mittels PCS ein Partikelwachstum ermittelt (siehe 3.3.2.). Danach bleibt der Durchmesser von dem weiteren Zusatz an Desolvatationsreagenz unbeeinflusst und liegt unverändert bei 280 - 300 nm. Im Unterschied dazu erhöht sich die Konzentration an Nanopartikeln in der Lösung noch weiter (siehe Abbildung 4-2).

Neben der Bestimmung des gelösten Proteinanteils im Überstand mit BCA-Reagenz kann auch mit der PCS-Methode eine Konzentrationszunahme der Nanopartikel verfolgt werden. Neben dem Partikeldurchmesser nimmt auch die Summe der Lichtimpulse, die während der Messung auf den Photomultiplier treffen, zu, so dass sie zur Auswertung herangezogen werden können. Die Zunahme der Lichtimpulse bei der PCS-Messung wurde in der Arbeit von Weber et al. [Carolin Weber, 2001] untersucht. Beide Methoden belegen eine Zunahme der Nanopartikelkonzentration bei steigenden Ethanolmenge auf bis zu 5,0 mL.

4.2.2. Darstellung der Oberflächenstruktur mittels Rasterkraftmikroskopie

Untersucht wurde im folgenden die Oberflächenstruktur von HSA-NP. Es sollte überprüft werden, ob man mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie die Unterschiede der oberflächenmodifizierten zu den unmodifizierten Nanopartikeln abbilden kann.

Abbildung 4-14: Unmodifizierte HSA-NP (PCS 309 nm, Gehalt 17,5 mg/mL)

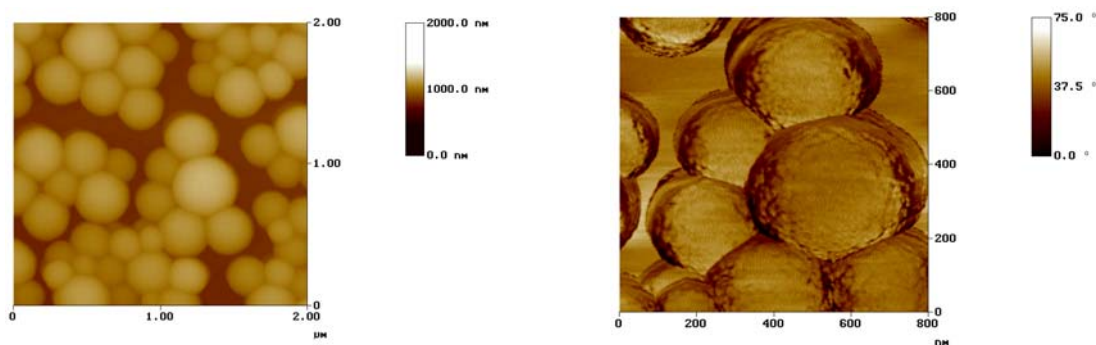


Abbildung 4-15: SH-Gruppen modifizierte HSA-NP (PCS 326 nm, Gehalt 16 mg/mL)

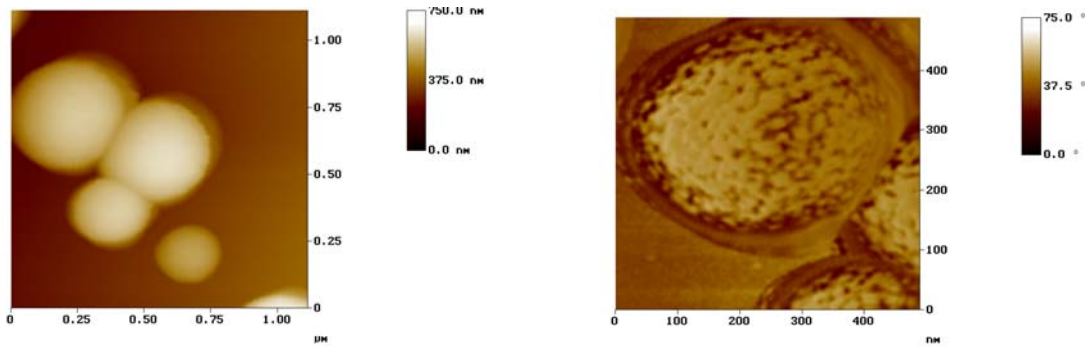
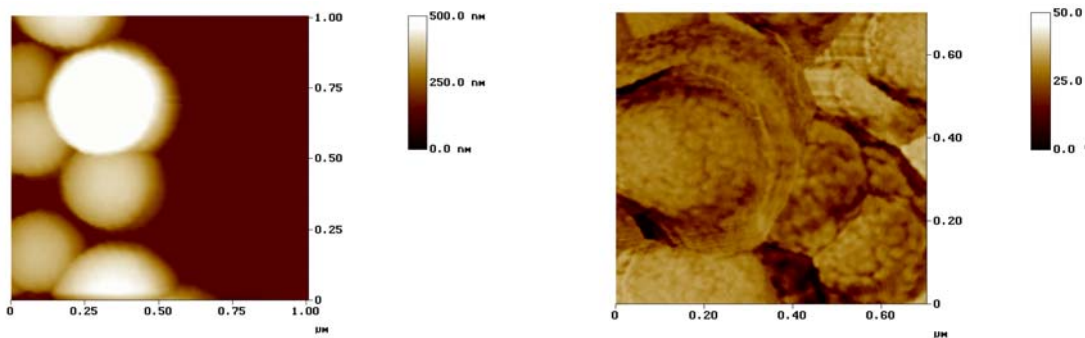


Abbildung 4-16: Avidin-modifizierte HSA-NP (PCS 322 nm, Gehalt 14,7 mg/mL)



Aufnahmen von D. Wouters und U. S. Schubert, Institut für Makromolekulare und Organische Chemie, Technische Universität in Eindhoven

Die mit einer geringeren Vergrößerung aufgenommenen und auf der linken Seite abgebildeten Nanopartikel lassen gleichmäßig runde und glatte Gebilde ohne Brückenausbildung erkennen. Sie weisen eine Größe zwischen 140 - 400 nm auf. Auch nach den durchgeführten Oberflächenmodifikationen liegen sie noch immer im selben Größenbereich. Die Nanopartikel liegen damit in einem Größenbereich der auch mit Hilfe der PCS-Methode und der analytischen UZ ermittelt wurde.

Die in der Abbildung 4-14 zu sehenden unmodifizierten Nanopartikel weisen durch die Quervernetzung mit Glutaraldehyd eine deutliche Substruktur von 15 nm auf. Ähnlich sehen die Oberflächenstrukturen der thiolierten Partikel aus. Auch die Avidin-modifizierten unterscheiden sich nur minimal in ihrer Substruktur von den anderen zwei Proben. Die Partikel scheinen eine mit 20 nm nur geringfügig größere Substruktur zu haben, die zudem auch eine etwas weniger scharf begrenzte, weichere Kontur erkennen lässt. Visuell lässt sich die Modifikation nur sehr schlecht und lediglich andeutungsweise

darstellen, was an den sehr ähnlichen Molekulargewichten von Albumin (65 kDa) und Avidin (66 kDa) liegen kann.

4.2.3. Quantitative Bestimmung von adsorptiv inkorporierten PTOs

Die Beladungsrate eines in die Trägermatrix inkorporierten Wirkstoffes kann prinzipiell über zwei Wege bestimmt werden. Zum einen indirekt durch die Menge an freiem Wirkstoff der nach Abtrennung der Nanopartikel im Überstand wiedergefunden wird und zum anderen direkt durch den beim enzymatischen Partikelabbau freiwerdenden Anteil. Beide Methoden wurden zur Bestimmung eingesetzt.

Zu Beginn wurden verschieden stark quervernetzte NP hergestellt. Der im Anschluss erfolgte Verdau ergab jedoch, dass lediglich die zu 40% stabilisierten NP (19 µg GA / mg HSA) wieder vollständig abgebaut wurden. Auch dieser schwächere Quervernetzungsgrad reicht aus, um den Wirkstoff bei Lagerung von 4°C mindestens über zwei Monate stabil in die Partikelmatrix einzuschließen.

Die zugesetzte Menge an quervernetzendem Aldehyd ist im Vergleich zu einer für BSA-Nanopartikel publizierten Arbeit von Arnedo et al. immer noch sehr hoch [Arnedo et al., 2002]. Hier wurde mit einer wesentlich geringere Quervernetzung von 1,56 µg/mg Protein gearbeitet. Untersucht wurde die Wirkstofffreisetzung in PBS-Puffer pH 7,4 in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Innerhalb der ersten 4 Stunden wurden 50 – 90% des Wirkstoffes im Überstand wiedergefunden. Der hierbei beobachtete „Boosteffekt“ kann durch oberflächlich gebundenes PTO ausgelöst worden sein. Die Beladung fällt allerdings um das 2,5 – 3-fache niedriger aus. Nach der Initialfreigabe von mit Ganciclovir beladenen, bovinen Albumin-Nanopartikeln, wurde eine kontrollierte und verzögerte Abgabe über einen Zeitraum von 5 Tagen erreicht [Merodio et al., 2002].

Tabelle 4-6: Bestimmung der inkorporierten PTO-Menge nach zweimonatiger Lagerung

Proben	Leere HSA-NP		PTO-NP		PTOsc-NP	
	November	Januar	November	Januar	November	Januar
100 µg PTO						
PCS [nm]	300	302	265	275	267	283
Zetapotential [mV]	- 15		-40	-30	-32	-27
HPLC-Überstand [µg PTO]			8	1	0	3
NP – Abbau [µg PTO]			84	94	71	51
Wiederfindung [%]			92	95	71	54

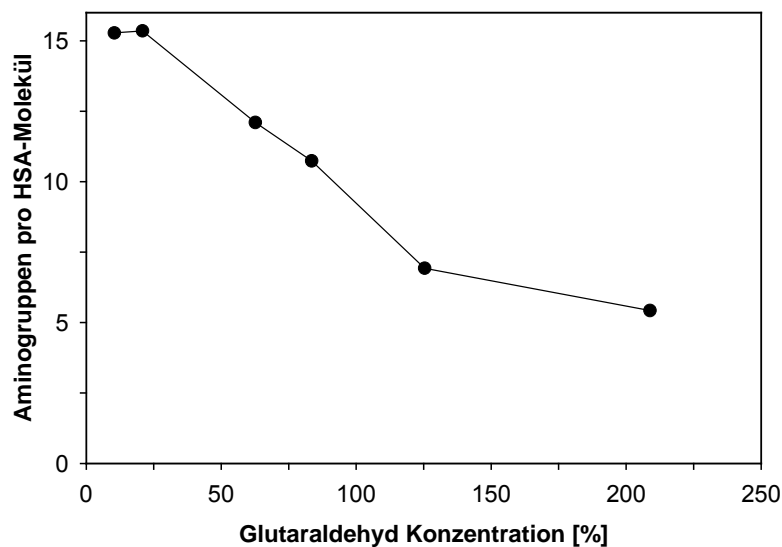
Die PCS-Messdaten zeigen, dass die NP in Wasser stabil und lagerbeständig sind. Das negativere Zetapotential der beladenen NP spiegelt eine erfolgreiche Bindung mit PTO wider, da es zur Einführung von negativ geladenen, modifizierten Phosphatresten kommt. Untersucht man den Überstand hinsichtlich des freien Wirkstoffs, findet man normalerweise zwischen 0 – 15% (0 - 15 µg) wieder. Wie aus der Tabelle 4-6 zu entnehmen ist, ergibt sich häufig eine nicht zu erklärende Differenz von 25 - 45% bei der Wiederfindung. Obwohl nach dem enzymatischen Abbau eine Untersuchung im PCS keine Partikel mehr erkennen ließ, kann dieser Verlust nur auf eine ungenügende Auftrennung bei der HPLC-Methode zurückgeführt werden. Doch auch durch Zusatz einer 20%-igen Polyphosphatlösung, die die Adsorption der PTOs an HSA verhindern bzw. vermindern soll, bewirkte keine Verbesserung der Ergebnisse. Eine Adsorption an die Reaktionsgefäße und eine Beeinflussung der PTO- oder HSA-Stabilität durch das Enzym wurde durch die Kontrollen ausgeschlossen. Trotz aller Bemühungen wurde das Phänomen nicht beseitigt. Beobachtet wurde eine gewisse Sequenzabhängigkeit, da die Einbindung der scrambled Sequenz im Hinblick auf die Wiederfindung schlechtere Ergebnisse lieferte.

4.2.4. Quantitative Bestimmung von Aminogruppen auf der Oberfläche

Die von Habeeb [Habeeb, 1966] entwickelte Methode bezieht sich auf die Bestimmung von Aminogruppen in gelösten Proteinen. Die Umsetzung erfolgt mit TNBS-Reagenz, welches normalerweise zu einem löslichen Konjugat abreagiert. In diesem Fall allerdings liegt das Endprodukt in nanopartikulärer Form vor und wurde vor der photometrischen Bestimmung abzentrifugiert, so dass eine indirekte Bestimmung des nicht abreagierten Reagenzes erfolgte [C. Weber et al., 2000a]. Man kann in der folgenden Abbildung sehr deutlich die Abnahme von 15 auf 6 NH₂-Gruppen pro HSA-Molekül bei zunehmender Glutaraldehydmenge beobachten.

Für HSA-PTO-NP, die nur zu 40% quervernetzt waren, wurden in Übereinstimmung mit HSA-NP zwischen 11,5 und 19,7 Aminogruppen pro HSA-Molekül ermittelt.

Abbildung 4-17: Einfluss der Quervernetzung auf die Anzahl der Aminogruppen auf der Oberfläche von HSA-NP



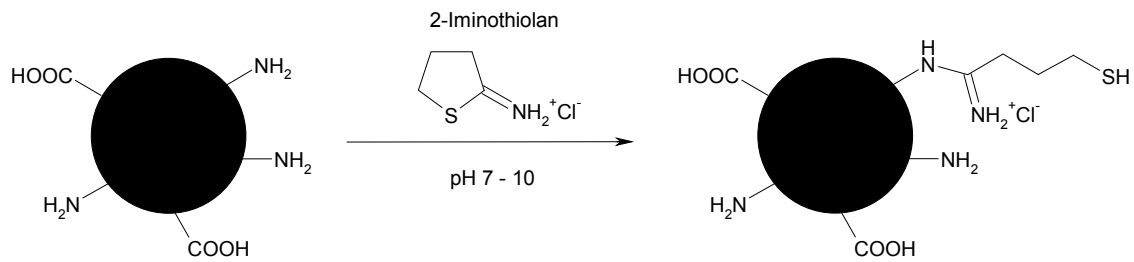
4.3. Oberflächenmodifikationen

Die aufgezeigten Oberflächenveränderungen im folgenden Abschnitt beziehen sich auf die unter 4.1. hergestellten Präparationen. In den einzelnen Ausführungen werden keine Angaben mehr zur Nanopartikeldurchmessern gemacht, da die innerhalb der normalen Schwankungsbreite lagen.

4.3.1. Einführung von SH-Gruppen

Die Bindung von Arzneistoffen oder Drug-Targeting-Liganden an die Träger soll mit einem hetero-bifunktionalen Crosslinker erreicht werden, der auf einer Seite über eine NH_2 -reaktive Succinimidylstruktur und auf der anderen Seite über eine Maleinimidgruppe verfügt. Für die Einführung von Sulfhydrylgruppen können neben 2-Iminothiolan auch Reduktionsmittel wie DTT, das im Protein vorhandene Disulfidbrücken spaltet, eingesetzt werden. Weiterhin können auch die durch die Quervernetzung mit Glutaraldehyd eingeführten und zurückbleibenden freien Carbonylgruppen für die Einführung von SH-Gruppen durch die Umsetzungen mit dem Disulfid Cystamin herangezogen werden. Die geschütz vorliegende SH-Gruppe wird dabei durch reduktive Spaltung mittels DTT freigesetzt. Neben der Umsetzung von Aldehydgruppen und der Spaltung von originär im Protein vorhandenen Disulfidbrücken, können auch Carboxylgruppen für die Einführung von Thiolgruppen genutzt werden. Der Einsatz wasserlöslicher Carbodiimiden zusammen mit SH-Gruppen-haltigen Reagenzien wie Cystamin / Cystein führt über die gleichzeitig im Molekül vorhandenen primäre Aminofunktion zur Ausbildung eines Säureamids. Die gewünschte Thiol-Modifikation wird beim Einsatz von Cystamin im Anschluss durch reduktive Spaltung mittels DTT erhalten. Mit dem Einsatz von Trauts Reagenz steht eine vierte etablierte und leicht handhabbare Methode zur Verfügung. Es kann eine ausreichende Anzahl an Thiolgruppen eingeführt werden und es resultiert ein untoxisches Produkt [C. Weber et al., 2000b, Nobs et al., 2003]. Mit Ellmans Reagenz, einem etablierten Nachweisverfahren, wurden die reaktiven Sulfhydrylgruppen bestimmt (siehe 3.4.2.).

Abbildung 4-18: Einführung von Thiolgruppen mit Trauts Reagenz



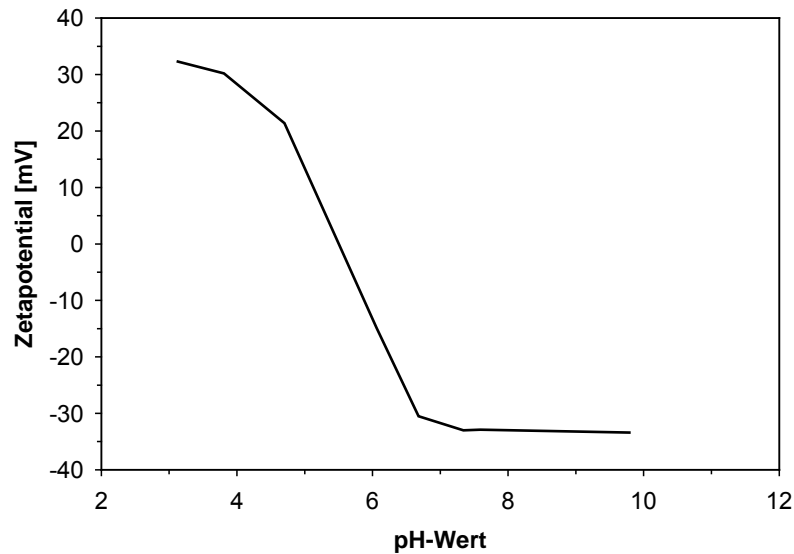
Unter den beschriebenen Umsetzungsbedingungen wurden für unbeladene HSA-NP 6 - 13 SH-Gruppen pro HSA-Molekül eingeführt.

Die geringere Stabilisierung der HSA-PTO-NP lieferte eine größere Zahl an NH_2 -Gruppen und analog dazu mit 12,5 - 17,7 auch eine etwas höhere Anzahl an SH-Gruppen.

Durch diese Methode wurden im Fall von unbeladenen Gel-NP im Durchschnitt $1,7 - 2,6 \times 10^{-8}$ mol SH-Gruppen / mg Gelatine eingeführt. Dies entspricht 43 - 65% der zuvor ermittelten Aminogruppen. Die Daten stimmen mit den von Coester et al. [C. Coester et al., 2000] ermittelten überein.

Im Gegensatz zu den HSA-NP wurde das Zetapotential der Gel-NP durch die Modifikation umgekehrt und ergab Werte zwischen -20 bis zu -40 mV. In der nachfolgenden Abbildung ist exemplarisch die Veränderung des Zetapotentials in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Um pH 6 herum neigen die Systeme zur Aggregation, dies zeigt sich durch eine Zunahme der Teilchengrößen und der Polydispersität.

Abbildung 4-19: pH Titrationskurve für thiolierte Gel-NP



Die mit SH-Gruppen modifizierten Nanopartikel wurden im Anschluss mit einem hetero-bifunktionalen Crosslinker mit dem Protein Avidin gekoppelt.

Man verfügt durch die Verwendung von Proteinen als Trägermaterial und mit Avidin als Kopplungskomponente über ein sehr variables System, da jeglicher biotinylierte Ligand über diese Komplexierung gebunden werden kann. Es besteht weiter die Möglichkeit, dass Ganze genau andersherum aufzuziehen und anstelle des Trägermaterials das an die Oberfläche zu bindende gelöste Protein zu thiolieren. Genau wie HSA weist auch Avidin freie primäre Aminogruppen auf, die zur Umsetzung mit Thiolierungsreagenzien eingesetzt werden können. Von den 36 durch Lysinreste vorkommenden NH_2 -Gruppen wurden 10 - 22 mit Trauts Reagenz zu Thiolgruppen umgesetzt (siehe 3.4.1.3.). Die HSA-NP wurden entsprechend dazu nun mit dem Crosslinker Sulfo-MBS zur aktivierten Komponente umgesetzt. Die erfolgreiche Aktivierung der HSA-NP mit dem bifunktionalen „Spacer“ muss mit einer Abnahme von primären Aminogruppen auf der Partikeloberfläche einhergehen. Zur Überprüfung wurde die TNBS-Reaktion (siehe 3.3.6.) durchgeführt. Als Vergleich wurden unbehandelte HSA-NP mitgeführt und die Differenz zu den modifizierten berechnet. Zumeist wurde die Aktivierung der Nanopartikel durch eine 30 – 45%ige Abnahme an NH_2 -Gruppen bestätigt (siehe 4.2.4.).

4.3.2. Kopplung von aktiviertem Avidin und NeutrAvidin™

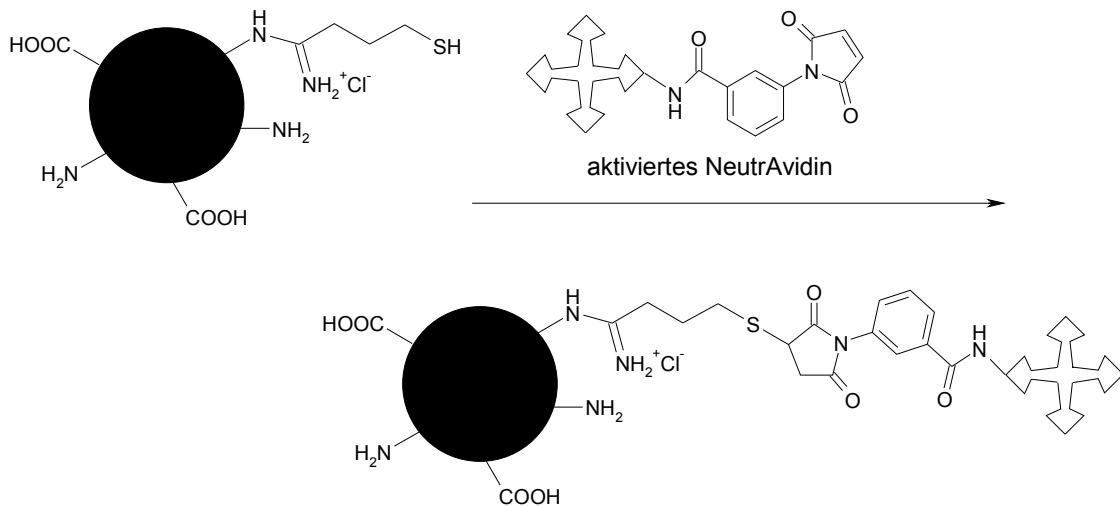
Avidin ist ein aus dem Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa, welches sich aus vier identischen Untereinheiten zusammensetzt. Interessant ist die sehr hohe Bindungsaffinität gegenüber Biotin. Der sich ausbildende Komplex zählt mit einer Bindungskonstante von $K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$ zu einem der stärksten biologischen Komplexbildner. Die Bindung ist über einen weiten pH-Bereich hin beständig, gelöst werden kann unter sehr drastischen und unphysiologischen Bedingungen, durch Zusatz von 8 M Guanidin in salzsaurer Lösung bei pH 1,5.

Avidin weist wegen seiner Kohlenhydratresten und seinem isoelektrischen Punkt bei pH ~10, bei physiologischem pH-Wert eine Tendenz für eine unspezifische Zelladhäsion auf. Durch Abspalten der Kohlenhydratreste kann man diese Eigenschaft minimieren und erhält das partialsynthetische Produkt NeutrAvidin™ (NAv) mit einem isoelektrischen Punkt von 6,3. Es besitzt im Gegensatz zum Streptavidin, einem weiteren Biotin bindenden Protein, keine RYD-Domäne, welche einer allgemeinen Rezeptorerkennungssequenz homolog ist.

Alle drei Proteine werden in vielen Untersuchungsmethoden wie der Affinitätschromatographie, in Immunoassays und zur Immobilisierung von Enzymen eingesetzt.

Für die Bindung an die Oberfläche von Gel-NP stellte sich NeutrAvidin™ wegen einer höheren Bindungseffizienz als wesentlich besser geeignet heraus als Avidin. Bei den HSA-NP verhält es sich genau umgekehrt, hier kommt es häufig zur Aggregatbildung mit NeutrAvidin™. Die Konjugation des mit einem Crosslinker aktivierten Avidin / NeutrAvidin™ an die Oberfläche von thiolierten Nanopartikeln ist in der folgenden Grafik dargestellt.

Abbildung 4-20: Konjugation des aktivierten Proteins an thiolierter Nanopartikel



Zum Beweis einer Nanopartikelinternalisation in das Zellinnere mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM), müssen die Trägersysteme fluoreszenzmarkiert werden. Ausgenommen davon sind HSA-NP, die im Gegensatz zur Lösung nach der Quervernetzung mit Glutaraldehyd eine starke Eigenfluoreszenz im Wellenlängenbereich von Fluorescein (488 nm) aufweisen. Um herauszufinden, ob die Fluoreszenz abhängig ist von der eingesetzten Menge an Glutaraldehyd bzw. auch von der Art des Quervernetzers, wurden HSA-NP hergestellt, die durch Hitze (2 h, 70°C) oder mit Glutaraldehydlösung zu 40, 100 oder 200% stabilisiert wurden.

Die Aufnahme eines Emissionsspektrums bei einer festgelegten Anregungswellenlänge von 490 nm zeigte eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität sowohl von der Art als auch vom Grad der Quervernetzung. Die mit Hitze stabilisierten Nanopartikel wiesen nahezu keine Fluoreszenz auf, und unterschieden sich durch ihre weiße Farbe schon optisch von den bräunlichen mit Glutaraldehyd quervernetzten Trägern. Für die nur zu 40% quervernetzten NP lässt sich eine deutlich kleinere Fluoreszenzintensität messen. Bei den zu 100 und 200% stabilisierten Nanopartikeln ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Bei dem in Zellkultur relevanten Konzentrationsbereich von 0,1 - 0,2 mg/mL wurde eine konzentrationsabhängige Intensitätszunahme ermittelt. Zur Detektion bei den nachfolgenden Zellkulturexperimenten wurden die Gel-NP mit fluoreszenzmarkiertem NAv beladen.

4.3.2.1. Beladung von HSA-Nanopartikeln mit Avidin (HSA-Av-NP)

Im folgenden werden die Ergebnisse aufgelistet, die nach der Umsetzung einer Avidinlösung (variierender Konzentration) mit dem gleichen Volumen einer Nanopartikeldispersion (15 - 20 mg/mL) erzielt wurden (siehe Tabelle 4-7). In den ersten beiden Zeilen sind die Ansätze für wirkstofffreie HSA-Av-NP und in den Zeilen 3 - 5 sind HSA-PTO-NP aufgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die unbeladenen HSA-NP als auch die adsorptiv mit PTO-beladenen eine Bindungseffizienz für Avidin von 28,5 – 65%, bezogen auf die für die Umsetzung eingesetzte Menge, ergaben.

Tabelle 4-7: Bindung von Avidin an SH-HSA-NP oder PTO-beladenen SH-HSA-NP

gebundenes Avidin		Av / HSA-NP [mol/mg]	Bindungsstellen [mol/mg]
[%]	[mg]		
28,47	0,72	6,18E-10	2,47E-9
50,90	1,02	1,08E-9	4,32E-9
64,16	0,75	1,67E-10	6,70E-9
57,02	0,66	1,29E-10	5,16E-9
65,28	0,76	2,40E-10	9,58E-9

Die prozentuale Beladung bei dem Ergebnis in Zeile 1 fällt durch einen auffallend niedrigen Wert aus dem Rahmen, weil hier andere Umsetzungsverhältnisse vorlagen. Die eingesetzte Avidinmenge wich mit 2,5 mg vom üblichen Ansatzverhältnis ab. Trotz des größeren Überschusses an Avidin, war der gebundene Anteil pro mg NP jedoch vergleichbar.

Die letzten drei Ansätze beziehen sich auf HSA-PTO-NP, die mit Bindungsraten von durchschnittlich 62% eine bessere Beladungsrate und auch mehr Bindungsstellen aufwiesen. Ziel eines solchen Trägersystems ist zukünftig die Kopplung über das Avidin-Biotin-System mit einem spezifischen Drug-Targeting-Liganden für eine rezeptorvermittelte Zellaufnahme.

Der Grad der Quervernetzung lag bei den wirkstoffbeladenen Nanopartikeln im Gegensatz zu den unbeladenen nur bei 40%, da ansonsten der enzymatische

Abbau nicht erfolgreich verlief (siehe 4.2.3.). Der geringere Quervernetzungsgrad spiegelt sich auch in der Anzahl der quantifizierbaren Aminogruppen wider. Für die aufgeführten Chargen wurden im Mittel 19 NH₂-Gruppen detektiert, die durch Trauts Reagenz zu 13 Thiolgruppen umgesetzt wurden, von denen 9 - 10 an Avidin gebunden wurden.

4.3.2.2. Beladung von Gel-Nanopartikeln mit NeutrAvidin™ (Gel-NAv-NP)

Es werden zahlreiche kommerziell erhältliche biotinylierte Liganden angeboten, so dass man sehr unterschiedliche Wirkstoffe und Drug-Targeting-Liganden zur Verfügung hat. Diese Vielzahl kann über das Avidin-Biotin-Prinzip an die Nanopartikeloberfläche gebunden werden, so dass man über ein sehr universelles Trägersystem verfügt. Belegt wurde die Variabilität des Trägersystems neben den in dieser Arbeit beschriebenen Möglichkeit, Kopplung von Oligonukleotiden (siehe 4.3.4.3.) und Antikörpern (siehe 4.3.4.1. und 4.3.4.2.), zuvor schon durch die erfolgreiche Bindung von peptidischen Nukleinsäuren [Langer et al., 2000]. Die Gehaltsbestimmung von NAV-FITC ist problematisch, da das lyophilisierte Produkt mit einer unbekanntem Puffermenge verschnitten ist. Daher wurde vor der Umsetzung der gesamte Inhalt des eingesetzten Behältnisses ausgewogen. Die verwendeten Aliquote wurden auf die im Datenblatt angegebene Proteinmenge bezogen. Das Auflösen des gesamten Gefäßinhaltes in einem definierten Volumen war nicht praktikabel, da die fertige Lösung laut Herstellerangaben nicht lagerbeständig ist.

In der folgenden Tabelle 4-8 wird die Bindungseffizienz des NeutrAvidin™ an SH-Gel-NP für neun verschiedenen Ansätze aufgeführt.

Tabelle 4-8: Bindung von NAv-FITC an SH-Gel-NP

gebundenes NAv-FITC		NAv-FITC / Gel-NP [mol/mg]	Bindungsstellen [mol/mg]
[%]	[mg]		
55,90	0,79	3,60E-10	1,44E-9
71,50	0,86	8,65E-10	3,46E-9
81,67	1,20	1,25E-9	4,98E-9
75,89	0,40	3,24E-10	1,30E-9
62,8	0,79	6,53E-10	2,61E-9
75,36	0,92	8,41E-10	3,36E-9
69,62	0,91	7,36E-10	2,94E-9
73,28	1,02	9,40E-10	3,76E-9
47,58	0,67	6,81E-10	2,72E-9

Die prozentualen Bindungsraten für NAv-FITC lagen zwischen 47,6 - 81,6% und damit, trotz einer geringeren Anzahl an eingeführten SH-Gruppen, im Bereich der für SH-HSA-NP erzielten Bindungsraten (siehe 4.3.2.1.). Die mit NAv-beladenen Gel-NP ergaben ähnliche Messwerte. Sie lagen im Durchschnitt mit 53% etwas niedriger, bezogen auf das Verhältnis von NAv / NP entspricht dies $1,25 - 4,89 \times 10^{-9}$ [mol/mg] Bindungsstellen. Die in der zweiten Spalte angegebenen Angaben in mg beziehen sich immer auf den Proteingehalt der Lösung der aufgrund der Einwaagen und Ausbeuten bedingten Verluste schwankend ist.

Untersucht wurde weiterhin welchen Einfluss das Fluoreszenzlabel auf die Bindungsrate hat. Zu diesem Zweck wurden Kontrollexperimente an unmodifizierten und thiolierten Gel-NP durchgeführt, um eine mögliche unspezifische adsorptiven Bindung zu Quantifizierung. Die Nanopartikel wurden nach dem Standardherstellungsprotokoll (siehe 3.4.4.1.) mit aktivierter und unaktivierter NeutrAvidinTM- bzw. NeutrAvidinTM-FITC-Lösung inkubiert. Die nach der Aufreinigung anfallenden Überstände wurden photometrisch (280 nm) und mit BCA-Reagenz auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die beiden Methoden, die zur Quantifizierung der freien NeutrAvidinTM-menge eingesetzt wurden, lieferten vergleichbare Ergebnisse, wobei die proteinchemische Untersuchung mit BCA-Reagenz allgemein eher etwas höhere Werte ergab. Für NAv-FITC

wurde im Vergleich mit unmarkiertem NAv mit beiden Nachweismethoden eine adsorptive Bindung zwischen 30 – 40% gefunden. Diese Spanne liegt somit höher als die Differenz, die sich aus der durchschnittlichen Bindungsrate für NAv zu NAv-FITC ergeben hat. Anzumerken ist, dass die Bedingungen nicht identisch sind, weil das NeutrAvidinTM durch die Kopplung mit dem Crosslinker auch über andere Adsorptionsneigungen verfügen kann als das unbehandelte Protein.

Die zur Kontrolle eingesetzten unmodifizierten Gel-NP ließen keine präzise Aussage über eine generelle unspezifische Adsorption an die Trägermatrix erkennen, weil die photometrischen und die proteinchemischen Ergebnisse keine Übereinstimmung zeigten. Allerdings sind auch hier die Umsetzungsbedingungen nicht identisch, weil die Gel-NP mit einem positiven Zetapotential im Gegensatz zu den SH-Gel-NP über andere Oberflächeneigenschaften verfügen.

Eine eindeutige Aussage zur unspezifischen Adsorption des markierten oder unmarkierten NAv und damit der Einfluss des Fluoreszenzlabels wurde mit den gewählten Analysemethoden nicht mit letzter Sicherheit erreicht.

Der größte Teil des NAv ist kovalent an die Oberfläche gebunden. Die Adsorptionsneigung ist durch das Fluoreszenzlabel leicht erhöht, wobei auch wiederholtes Waschen und Zentrifugieren nicht zu einem Ablösen des Proteins führt. Auch die mehrtägige Lagerung des Trägersystems und die Untersuchung des durch Zentrifugieren gewonnen Überstandes zeigt keinen durch Desorption bedingten Proteinanstieg in der Lösung.

4.3.2.3. Thiolierung von Avidin zur Bindung an aktivierte HSA-NP (aHSA-NP)

Die in der Arbeit vorgestellten Proteinnanopartikel auf Albuminbasis werden durch die Einführung von SH-Gruppen auf ihrer Oberfläche verändert. Die Modifikation ermöglicht nun die Kopplung über einen hetero-bifunktionalen Crosslinker an Avidin bzw. NeutrAvidinTM. Beide verfügen als Proteine über freie Aminogruppen, die sich zu Thiolgruppen umsetzen lassen, so dass prinzipiell die Möglichkeit besteht den umgekehrten Weg zu gehen. Anstelle der Nanopartikel wurde das Avidin / NeutrAvidinTM thioliert und die Trägermatrix mit dem Crosslinker Sulfo-MBS aktiviert. Auslöser für die Umkehrung des Ansatzes waren Probleme, die bei der Bindung eines pegylierten, hetero-bifunktionalen

Crosslinkers und bei der zuvor erwähnten NeutrAvidin™-Bindung an HSA-NP aufgetreten sind (siehe 4.3.2.).

Wie bereits unter 4.3.1. erwähnt, wurden 10 - 23 der 36 im Avidin vorkommenden Lysinreste mit Trauts Reagenz zu Thiolgruppen umgesetzt. Im Vergleich dazu wurde bei der Umsetzung von unbeladenen HSA-NP mit Trauts Reagenz 6 – 13 SH-Gruppen pro HSA-Molekül eingeführt (siehe 4.3.1.). HSA besitzt mit 60 deutlich mehr primäre Aminogruppen als Avidin. Allerdings reagiert eine nicht bekannte Anzahl, in Abhängigkeit vom Grad der Quervernetzung über die Ausbildung von Schiffchen Base ab. HSA liegt auch nicht in gelöster Form vor wie Avidin, sondern in einer partikulären Struktur, so dass eine sterische Behinderung auch eine Einfluss auf die weitere Umsetzung hat. Bei der Quantifizierung der Aminogruppen mit TNBS wurden 6 – 15 Aminogruppen detektiert (siehe 4.2.4.). Unter Berücksichtigung aller Parameter ist überraschenderweise die Thiolierung der Nanopartikel quantitativer.

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse des reversen Versuchansatzes für HSA-NP aufgeführt.

Tabelle 4-9:Thioliertes Avidin gebunden an Sulfo-MBS aktivierte HSA-NP

gebundenes Avidin		SH-Av / HSA-NP [mol/mg]	Bindungsstellen [mol/mg]
Anzahl SH-Gruppen	[mg/mL] eingesetztes Protein [%]		
10	0,84 (51,5%)	5,15E-10	2,06E-9
23	0,25 (31,8%)	3,68E-10	1,47E-9
22	0,37 (12,4%)	2,85E-10	1,13E-9

Die Thiolierungsergebnisse für Avidin schwanken mit 10 – 23 eingeführten SH-Gruppen recht stark. Dies ist auf die geringe Versuchanzahl zurück zu führen. Weitere hier nicht aufgeführte Versuchsansätze weisen Tendenzen zu höheren Werten auf. Angegeben in der Aufstellung ist sowohl die absolut gebundene Avidinmenge an die Nanopartikel pro mL wie auch die prozentuale Bindungsrate, bezogen auf die eingesetzte Avidinmenge. Auf den ersten Blick

erscheinen die Ergebnisse recht unterschiedlich, bezieht man allerdings die Thiolierungsergebnisse und die umgesetzten Stoffmengen mit ein, ergibt sich ein schlüssigeres Bild.

Bei dem Ansatz 1 und 3 wurden zwar gleiche Mengen an Nanopartikel eingesetzt, jedoch wurden diese mit unterschiedlichen Mengen Avidin umgesetzt. Obwohl bei der dritten Probe doppelt so viele SH-Gruppen in das Avidin eingeführt wurden und annähernd die doppelte Menge an Avidin mit aHSA-NP umgesetzt wurde, war die Menge des gebundenen Proteins am Ende nur halb so groß. Dies kann durch eventuelle Mehrfachverknüpfung eines Avidinmoleküls mit dem selben Nanopartikel verursacht werden, so dass die Oberfläche schneller belegt ist und insgesamt nur für weniger Moleküle zugänglich gewesen ist. Es zeigt sich, dass die Verschiebung der Umsetzungsbedingungen hin zu größeren Avidinmengen nicht zu einer gesteigerten Kopplung führt. Auch die Einführung einer möglichst großen Anzahl an SH-Gruppen erweist sich nicht als Vorteil.

Die drei Versuchsansätze beweisen, dass der reverse Weg prinzipiell praktikabel ist. Die gebundene Avidinmenge fällt im Vergleich zu dem Standardprotokoll (siehe 3.4.1.1.) allerdings eher etwas geringer aus und ist nur halb so groß (siehe Tabelle 4-7). Die Bindung mit Sulfo-MBS aktiviertem NeutrAvidin an HSA-NP scheiterten auch mit dem reversen Versuchsprotokoll aufgrund der Ausbildung von Aggregaten.

4.3.3. Bestimmung der Funktionalität von Avidin und NeutrAvidinTM

Die Einführung von SH-Gruppen auf der Partikeloberfläche mit DTT-Reagenz hat gezeigt, dass zwar viele Thiolgruppen mit Ellmans Reagenz detektiert werden konnten, die sich aber bei weiteren Kopplungsversuchen zum großen Teil als nicht zugänglich erwiesen [Langer et al., 2000]. Allgemein bergen chemische Umsetzungen an Proteinen das Risiko, dass sie in ihrer Funktionalität beeinträchtigt werden. Für die Bindung eines biotinylierten Liganden ist es essentiell festzustellen, ob das eingeführte Avidin-Derivat auch nach einer Behandlung im Ultraschallbad zugänglich und funktionsfähig ist.

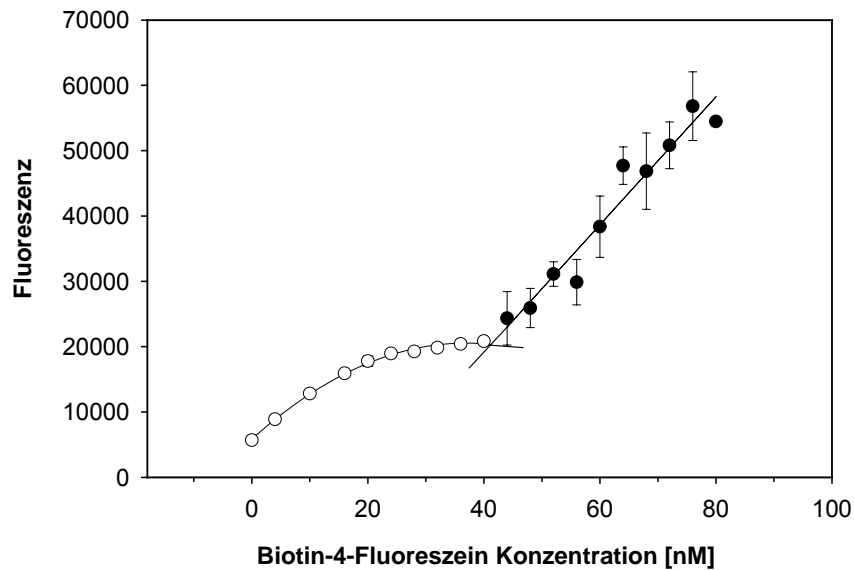
Die Quantifizierung mit 2-(4 Hydroxyazobenzen)-benzoesäure (HABA), einem etablierten Nachweisverfahren für lösliche Proteine, ließ sich in abgewandelter

Form mit Nanopartikeln nicht erfolgreich umsetzen, da die Konzentrationen außerhalb der Nachweisgrenze lagen [Livnah et al., 1993, Gruber et al., 1998].

Stattdessen wurde für die Detektion von Av / NAv auf der Oberfläche von Nanopartikeln ein in der Literatur beschriebenes Protokoll in modifizierter Form angewendet [Kada et al., 1999a, Kada et al., 1999b]. Bei diesen Versuchsdarstellungen wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte Biotinderivate getestet. Die besten Bindungseigenschaften wiesen nach den Literaturangaben ein Biotinderivat (Biotin-4-Fluorescein, B4F) auf, welches über Ethylendiamin mit Fluorescein markiert ist. Genau wie D-Biotin verfügt das Derivat über eine starke Affinität und bindet schnell an Avidin. Die Titrationskurve geht von einem flachen Abschnitt nach Absättigung aller Bindungstaschen mit B4F durch Quenchen in einen linearen Kurvenabschnitt über. Der Schnittpunkt an dem es zu einem starken und sprunghaften Anstieg der Fluoreszenz kommt gibt die Biotinkonzentration (nM) an, die zur Belegung aller Bindungsstellen benötigt wird. Mit dieser Methode können Avidinmengen bis zu 0,2 nM auch in Anwesenheit von 1 mg/mL BSA noch zuverlässig detektiert werden. Durchgeführt wurde ein Titrationsexperiment. Zu einem bestimmten Nanopartikelvolumen wurden ansteigende Mengen an B4F-Reagenz hinzugegeben.

Die Gel-NAv-FITC-NP können wegen der Intensität des Labels nicht mit der Methode untersucht werden, stattdessen wurden gleich hergestellte unmarkierte NeutrAvidinTM-beladene Partikel untersucht.

Abbildung 4-21: Titrationskurve für Funktionalitätsbestimmung für Gel-NAv-NP



Charakteristisch für das Experiment ist der Knick in der Kurve. Der Kurvenverlauf steigt bis zur Absättigung der Biotinbindungsstellen nur flach an. Dann kommt es zu einem starken Fluoreszenzanstieg und die Kurve verläuft im oberen Bereich linear weiter [Gruber et al., 1998]. Fällt man vom Schnittpunkt der beiden Kurven das Lot auf die x-Achse, kann man die benötigte B4F-Menge ablesen. Teilt man diesen Wert nun durch den Faktor vier, da jedes NAv über 4 Bindungsstellen verfügt, erhält man für die untersuchten Präparation die zur Ligandenbindung funktionsfähige und zugängliche NeutrAvidinTM-Menge. Bei dem hier aufgeführten Beispiel wurde eine Konzentration von 41,2 nM B4F benötigt. Nach der photometrischen Messung der Überstände wurde eine Konzentration von 70 nM B4F erwartet.

Man kann zwei Schlüsse daraus ziehen. Nimmt man an, dass die NAv-Beladungsrate den tatsächlichen Wert wiedergibt, ergibt sich eine Funktionalität von 2,4 der möglichen vier Bindungsstellen. Weiter ist denkbar, dass aus sterischen Gründen nicht alle Taschen zugänglich sind. Möglich wäre auch, dass die tatsächliche NAv-Beladung niedriger lag als die photometrischen Daten ergaben. Genau wie bei Zellkulturanalysen ist auch für die NP, aufgrund von Konzentrationsschwankungen in der Suspension, eine merkliche Standardabweichung zu beobachten.

Die Untersuchungsergebnisse verschiedener Nanopartikelchargen, wobei sowohl HSA-NP mit und ohne Wirkstoff (PTOs) als auch Gel-NP getestet wurden, lieferten im Mittel 2 - 3 Bindungsstellen pro Avidin bzw. NeutrAvidinTM

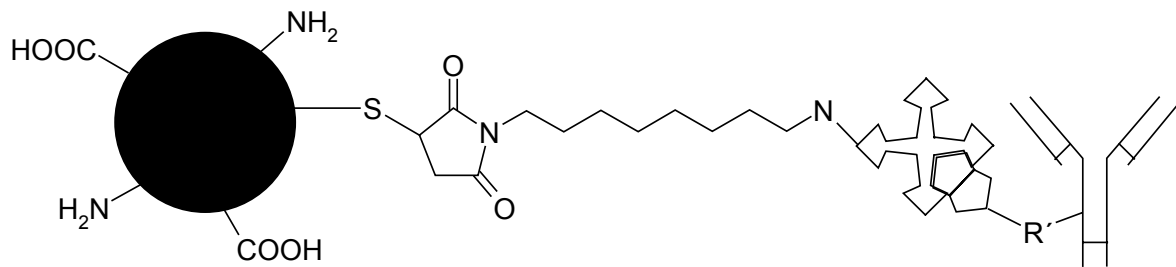
auf den Nanopartikeln. Dies kann darauf hindeuten, dass nicht alle Taschen zugänglich sind. Es konnte also wiederholt an den unterschiedlichen Systemen die Funktionstüchtigkeit des eingeführten Proteins nachgewiesen werden. Die Umsetzungsbedingungen und die Partikelauflösung führen nicht zu einem gravierenden Funktionalitätsverlust.

4.3.4. Bindung biotinylierter Liganden über Avidin

4.3.4.1. Anti-CD3-Antikörper an Gel-Nanopartikel (CD3-Gel-NAv-FITC-NP)

Bei den NeutrAvidinTM-FITC-modifizierten Gelatine Nanopartikeln handelt es sich um ein universell einsetzbares Trägersystem für biotinylierte Komponenten (siehe Abbildung 4-22). Für eine spezifische, antikörpervermittelte Zellaufnahme in T-Lymphozyten wurden Gel-NAv-FITC-NP mit anti-CD3 Antikörpern (AK) beladen, die die mit dem T-Zellrezeptor (TZR) assoziierte Zetaketten auf reifen T-Lymphozyten erkennen [Renneisen et al., 1990, Buschle et al., 1995, Wojda and Miller, 2000]. Zur Detektion der Zellaufnahme in Lymphozyten durch FACS und CLSM wurde fluoreszenzmarkiertes NAv gebunden.

Abbildung 4-22: Spezifisches Drug-Delivery-System beladen mit einem biotinylierten Liganden



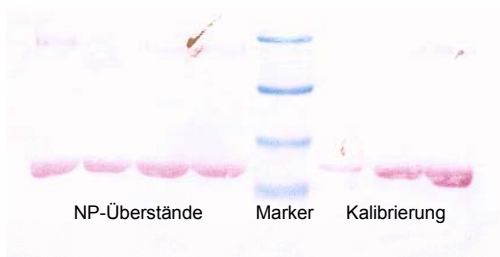
4.3.4.1.1. Quantifizierung über SDS-Page

Die Antikörperbeladungsrate wurde mit zwei verschiedenen indirekten Methoden nachgewiesen und bestimmt. Hierbei wurde durch die Erfassung des ungebundenen Anteils im Überstand die Beladung bestimmt.

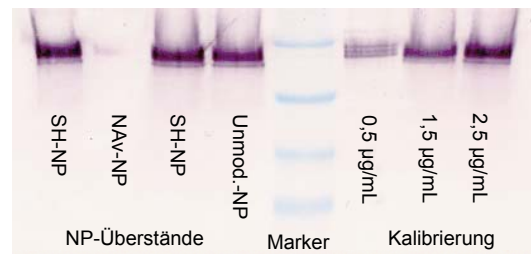
Als Kontrollproben, um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurden neben NAV-beladene Nanopartikel (Vollprobe) auch unmodifizierte und thiolierte NP mit AK inkubiert.

Abbildung 4-23: Western-Blot zur Bestimmung der AK-Bindung an Gel-NAV-NP

Ponceau S-Färbung



2. AK-Färbung mit alkalischer Phosphatase



Durch eine Ponceau S-Färbung wurde belegt, dass alle Taschen mit AK-Lösung beschickt wurden. An der Stärke der BSA-Banden kann man schon die verschiedenen Konzentration, die für die Eichgeraden aufgetragen wurden, erkennen. Die gesammelten Nanopartikelüberstände wurden vor der Aufgabe noch einmal zentrifugiert, um sicher alle Partikel abzutrennen. Sie wurden soweit verdünnt, dass sie bei einem 100%-igen nicht-Binden des anti-CD3-AK, keine höheren Antikörperergebnisse zulassen als der höchste Standard der Eichgeraden. Zur Kontrolle einer möglichen adsorptiven Bindung an das Trägersystem wurden gleichbehandelte, thiolmodifizierte NP untersucht. Die Banden der SH-Gel-NP wiesen dieselbe Farbintensität wie der höchste Standard (2,5 µg/mL anti-CD3-AK) auf. Es wurde also keine unspezifische Antikörperbindung weder an thiolierte noch an unmodifizierte Gel-NP detektiert. Bei der Vollprobe ließ sich eine leicht violette Färbung ausmachen, die jedoch deutlich unter dem niedrigsten Standard von 0,5 µg/mL anti-CD3 AK lag.

Für diesen WB wurde eine kleinere Ansatzgröße, als unter 3.4.6.1. beschrieben, und üblicherweise für die Zellkulturexperimente verwendet, angesetzt. Lediglich 0,45 mg Gel-NP die mit 17,4 µg ($2,84 \times 10^{-10}$ mol) NAV-FITC

Ergebnisse und Diskussion

beladen waren, wurden mit 1,875 µg (inkubiert. Im Überstand wurde nur ein anti-CD3 AK wiedergefunden, so dass gebunden wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass nur 2,4 der möglichen 4 Bindungsstellen besetzt wurden nur 1,9% der Bindungsstellen. Mit der Absättigung aller Bindungsstellen. Mit der Absättigung aller Bindungsstellen. Molekulargewichts der Antikörper nicht zu einer sterischen Behinderung noch durch eine Verlängerung der Inkubationszeit. Die Bindungsrate auf nahezu 100% erreicht. Dargestellte Western Blot wurden durchgeführt. Er zeigt exemplarisch eine Nanopartikel, die in einem Zellkulturexperiment in T-Lymphozyten eingesetzt wurden.

Abbildung 4-24: Western-Blot von Gel-NAV-Fraktionierung von anti-CD3-AK



Es zeigt sich, dass in allen NP-Überständen kein Antikörper mehr wiedergefunden wurde. Durch die Ponceau S Färbung wurde BSA, welches standardmäßig zur Stabilisierung von AK zugesetzt wird, nachgewiesen. Dies belegt, dass die Nanopartikel mit Antikörperlösung inkubiert wurden und sich NP-Proben auf dem Gel befanden. Die Eichgerade wurde immer mit derselben Antikörpercharge angefertigt, die auch zur Partikelbeladung diente.

Bei den meisten Immunoblots wurde aus ungeklärten Gründen eine schwächere Färbung des IgG AK, mit dem an alkalischer Phosphatase

konjugierten 2. Antikörper, beobachtet. Die Beladungsergebnisse lagen hier nur zwischen 60 – 80%.

Die Sensitivität wurde bis auf 0,25 µg/mL anti-CD3-AK als niedrigsten Standardwert herabgesenkt. Der Detektionsbereich und die Beladungseffizienz korreliert mit den Versuchen von Klegermann et al. [Klegerman et al., 2002], die eine spezifische Bindung von 78% IgG an anionische Liposomen beschreiben. Zusätzlich zum Immunoblotting wurde hier noch ein Standard-Proteinassay eingesetzt. Die Verfahren lieferten vergleichbare Ergebnisse, bezüglich der Sensitivität und Spezifität erwies sich die WB-Methode als die bessere. Bei den hier eingesetzten Ansatzverhältnissen lag die zu detektierende anti-CD3 Antikörpermengen bei den Nanopartikelproben außerhalb der Nachweisgrenze für den Einsatz eines Proteinassays.

4.3.4.1.2. Quantifizierung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Bei dem zuvor beschriebenen WB handelt es sich um eine semiquantitative Bestimmungsmethode. Als Alternative wurde deshalb noch eine schnellere, fluorimetrische Methode etabliert [Bayer et al., 1986, Butler, 2000, Bonen et al., 2001, Valimaa et al., 2003].

Untersucht wurden wieder die nach der Aufreinigung gesammelten NP-Üb. Der in Lösung befindliche freie AK bindet an eine Streptavidin überzogene Mikrotiterplatte und wird anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten 2. Antikörper gebunden und detektiert. Die Werte wurden um die unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers an die Platte korrigiert. Dieser lag im Bereich des Lösungsmittelblindwertes und ist vernachlässigbar. Die Ergebnisse des WB wurden bestätigt, auch hier wurde eine nahezu 100%-ige Bindung der Antikörper an die Partikeloberfläche gezeigt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zwei indirekte Methoden etabliert wurden, die eine Beladungseffizienz von 100% für die Antikörperkopplung belegen.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Anzahl an gebundenen Antikörpern für eine zellspezifische Aufnahme ausreicht.

Die für HSA-NP gemessene Dichte betrug 1,31 g/mL bei einer durchschnittlichen Teilchengröße von 341,2 nm [Langer et al., 2000]. Anhand dieser Kalku-

lation ergab sich eine Beladung von 200 Antikörpermolekülen pro Nanopartikel bezogen auf die in Abbildung 4-23 dargestellten Ergebnisse. In der Literatur werden Immunliposomen beschrieben die 20 - 100 Antikörpermoleküle auf der Oberfläche tragen [Smirnov et al., 1986]. In murinen Kolonkarzinomzellen wurden Immunliposomen erfolgreich zur Überwindung der Zellmembran mittels Endozytose eingesetzt, die mit lediglich 20 tumorspezifischen Antikörpermolekülen an der Oberfläche konjugiert waren [Mizoue et al., 2002]. Die hergestellten Gelatine-Nanopartikel tragen die 10-fache Menge an Antikörper auf ihrer Oberfläche, so dass man eine rezeptorvermittelte Aufnahme und Akkumulation in T-Lymphozyten erwarten kann.

4.3.4.2. Trastuzumab an Gel-Nanopartikel (Trast-Gel-NAv-FITC-NP)

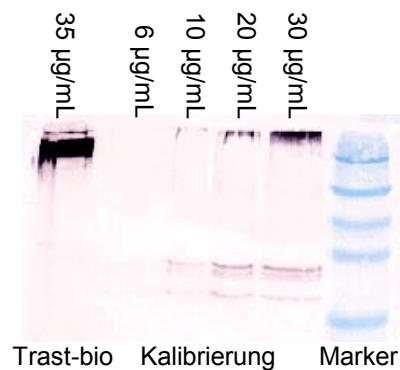
Bei Trastuzumab handelt es sich um den humanen, monoklonalen anti-Her2-neu Antikörper, der zur Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms als Monosubstanz oder in Kombination mit herkömmlichen Zytostatika zugelassen ist. Es handelt sich um einen vielversprechenden Ansatz im Sinne einer Lebenszeit verlängernden Maßnahme.

Die Biotinylierung des AK wurde freundlicherweise von Frau Heidrun Wartlick aus meinem Arbeitskreis durchgeführt. Eingesetzt wurde die weit verbreitete Methode der Säureamidbildung zwischen einer freien Aminogruppe eines Lysinrestes oder dem N-terminalen Proteinrest und der reaktiven Succinimidylstruktur des aminoreaktiven Biotinderivates (NHS).

Die Bestimmung der Biotinreste wurde zum einen mit dem HABA-Reagenz und zum anderen mit ELISA-Technik vorgenommen. Mit der üblicherweise relativ unsensitiven HABA-Methode kann die oberflächlich gebundene Biotinmenge detektiert werden, die auch für eine spätere Kopplung an das Partikelsystem zur Verfügung stehen. Nach dieser Messmethode wurden 1 - 2 Biotinreste pro AK-Molekül eingeführt. Die Bestimmung der absoluten Anzahl an eingeführten Biotinmolekülen kann eine andere sein, als die die mit einer für Liganden zugängliche Methode (HABA-Methode) ermittelt wird. Nur durch einen vorherigen enzymatischen Proteinabbau oder eine saure Hydrolyse sind alle Biotinmoleküle ohne eine sterische Behinderung zugänglich [Rao et al., 1997]. Für unsere Belange ist die Bestimmung sämtlicher Bindungsstellen nicht von Belang.

Der WB wurde wie unter 3.4.7.1.1. beschrieben durchgeführt, abgesehen vom Detektionsreagenz; anstelle des 2. AK wurde die Membran mit Streptavidin, welches ebenfalls an alkalische Phosphatase konjugiert ist, inkubiert. Während mit der Absorptionsmessung im HABA-Assay die Anzahl an eingeführten Biotinresten quantifiziert wurde, liefert der Western-Blot bei diesem Experiment lediglich noch mal eine Bestätigung für die erfolgreiche Umsetzung mit NHS-Biotin, da die eingesetzte AK-Konzentration etwas oberhalb der Eichgeraden lag (Abbildung 4-25). Die deutlich intensivere violette Anfärbung unterstützt das Photometrieergebnis, so dass man mit beiden Methoden zu dem Schluss gelangt, dass mindestens ein Biotinrest pro Antikörper eingeführt wurde.

Abbildung 4-25: Western-Blot von biotinyliertem AK-Trastuzumab detektiert mit an an alkalische Phosphatase konjugiertem Streptavidin

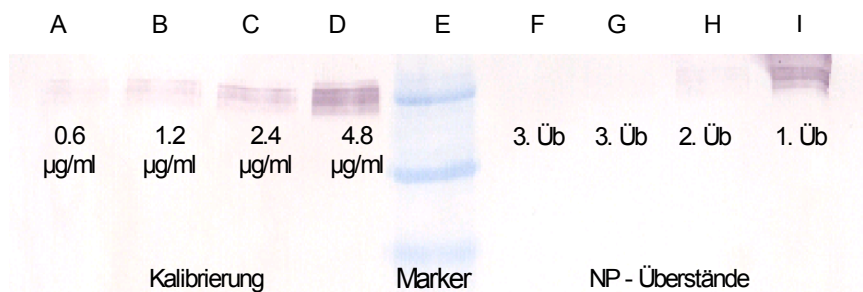


Für die Eichgerade wurde abweichend von dem bisherigem Vorgehen ein in *Escherichia coli* klonierter anti-Her2-neu- „single chain“-AK, der vom Bakterium selbst mit einem Biotinrest verknüpft wird, eingesetzt. Dieser wurde uns zur Testung vom Georg Speyer Haus aus dem Arbeitskreis von Dr. Winfried Wels überlassen. Die obere Bande, die bei einem Molekulargewicht über 175 kDa auftaucht, deutet auf Antikörperreste hin. Durch eine eventuelle Überladung der Aufgabetaschen scheint ein Teil des „single chain“ AK nicht gelaufen zu sein. Die bei der Eichgeraden zu beobachtende zweite violette Bande, die etwas unterhalb der Markerbande von 47,5 kDa liegt, ist vom Molekulargewicht nicht zu erklären, da sie weder der leichten noch der schweren Antikörperkette zugeordnet werden kann. Die Zellkulturversuche wurden später nur mit Trastuzumab

durchgeführt, da nicht gewährleistet ist, dass der „single chain“ AK über dieselbe Rezeptoraffinität wie der komplette Antikörper verfügt. Es soll jedoch ein Vergleich zwischen anti-CD3 AK, bei dem es sich um einen kompletten Antikörper handelt und anti-Her2-neu AK gezeigt werden.

Im Weiteren wurde nach der erfolgreichen Biotinylierung von Trastuzumab versucht, ob mit den gleichen Umsetzungsbedingungen (siehe 4.3.4.1.1.) die Bindungsrate, die bei der Beladung von Gel-NAv-FITC-NP mit anti-CD3-AK erreichte wurde, auch auf einen anderen biotinylierten Antikörper übertragen werden kann.

Abbildung 4-26: Western-Blot von Trast-Gel-NP für Zellkulturexperiment



Normalerweise wurden 3 mg Nanopartikel mit 12,5 µg AK inkubiert. In der Abbildung 4-26 wurde leicht vom Standardprotokoll abgewichen indem 15 µg AK dazugegeben wurden. Die Partikel hatten eine Größe von 211 nm bei einer Polydispersität von 0,03. Die NAv-FITC-Beladung lag für diesen Ansatz bei $7,36 \times 10^{-10}$ mol/mg Gelatine. Die Auswertung des WB ergibt eine AK-Bindung von 88%, das entspricht 4,44 µg/mg NP. Trotz der erhöhten Antikörpermenge liegt die gekoppelte Menge im Normbereich.

Für beide Antikörper ergibt sich eine übereinstimmende Bindungseffizienz, obwohl der anti-CD3-AK nach Herstellerangaben im Mittel über 8-10 Biotinmoleküle verfügt und die Biotinylierung von Trastuzumab nur 1 – 2 Biotinreste pro Molekül ergeben hat.

4.3.4.3. Phosphorothioate an HSA-Nanopartikel (PTO-HSA-Av-NP)

Anstelle der zuvor unter 4.3.4.1. beschriebenen Komplexierung von Antikörpern wurden nun Antisense-Oligonukleotide über das Avidin-System an die Oberfläche von HSA-NP gebunden.

Eingesetzt wurde ein am 5'Ende modifiziertes Phosphorothioat (20-mer), welches auch für die Antisense-Testung der Proticles in der Zellkultur verwendet wurde [Dinauer et al., 2004]. Proticles bestehen aus zwei Bestandteilen einem Eiweiß dem Protamin und Oligonukleotiden. Es bilden sich über elektrostatische Wechselwirkungen Koazervate zwischen den gelösten Komponenten aus. Die verwendete Sequenz ist gerichtet gegen das tat-Protein, welches aus einem gespleißten Bereich des env-Gens hervorgeht, und eine zentrale Bedeutung im Replikationszyklus des HI-Retrovirus einnimmt.

Das Partikelsystem wurde vollständig bezüglich der verschiedenen Parameter wie Thiolgruppen, eingeführte Avidinmenge, Gehalt, Größe und Zetapotential charakterisiert. Vorversuche haben gezeigt, dass die Bindung von NeutrAvidinTM, welches weniger unspezifische Wechselwirkungen in Zellkultur verursacht, nicht effizient an das Partikelsystem aus Albumin gebunden werden konnte. Anders verhält es sich bei Nanopartikeln aus Gelatine, die sich sehr gut an NAv, hingegen bei der Kopplung an Avidin weisen sie eine erhöhte Aggregationsneigung auf.

Tabelle 4-10: Kopplungsergebnisse für biotinylierte PTO an HSA-Av-NP

SH / HSA [mol/mol]	Avidin/NP [mol/mg]	Umsetzungsverhältnis Avidin / PTO-bio [mol/mol]	Av : PTO-bio	
			PTO	PTOscr gebunden
10	6,2E-10	1 : 4	2 : 1	
13	1,4E-09	1 : 4	2 : 1	
10	1,1E-09	1 : 1	2 : 1	1 : 1
11	1,7E-09	0,5 : 1	0,4 : 1	0,9 : 1

Die unbeladenen HSA-NP sind wie im Standardprotokoll (siehe 3.2.1.) beschrieben zu 200% mit Glutaraldehyd quervernetzt. Unter diesen

Bedingungen werden 6 – 7 Aminogruppen mit der TNBS-Reaktion detektiert (siehe Abbildung 4-17). Bei den Daten fällt auf, dass die Thiolierung für alle Chargen sehr gut funktioniert hat und die Bestimmung mit Ellmans Reagenz (siehe 3.4.2.) relativ hohe Werte ergibt, die mit 10 – 13 SH-Gruppen über der üblichen Anzahl liegt. Im konkreten Fall wurden die NH₂-Gruppen nicht bestimmt, so dass sich nicht feststellen lässt, ob sie von der Norm abwichen. Die große Zahl an SH-Gruppen lässt eine gesteigerte Bindung von Avidin an die Nanopartikel erwarten, die sich jedoch nicht bestätigt, denn die gekoppelte Avidinmenge ist vergleichbar mit den zuvor dargestellten Ergebnissen (siehe Tabelle 2-1). Alle anderen untersuchten Parameter bezüglich der Partikel- ausbeute, des Durchmessers und des Zetapotentials liegen im Normbereich. Die Umsetzung erfolgte nur mit einer einzigen Basensequenz und ihrer scrambled-Variante. Eine Beeinflussung der Avidin-Biotin-Komplexbildung durch eine Veränderung der Basensequenz ist nicht zu erwarten, so dass man aller Voraussetzung nach, ähnliche Ergebnisse mit anderen PTO-Sequenzen erzielen würde.

Die biotinylierte PTO-Menge wurde auf die tatsächlich oberflächlich gebundene Avidinmenge unter Berücksichtigung von vier Avidinbindungsstellen pro Molekül bezogen zugesetzt. Die molare Veränderung der Reaktionspartner zu ungunsten der biotinylierten PTO-Kopplungskomponente, führte nicht zu einer erniedrigten Bindungseffizienz wie man anhand des dritten Versuches sehen kann. Erst die Verlängerung der Inkubationszeit von einer auf fünf Stunden im letzten Ansatz weist von der Tendenz eine höhere Bindungsrate auf. Während sich bei den kürzeren Inkubationszeiten nur an jedem zweiten Avidin ein biotinyliertes PTO befindet, binden nach der Veränderung dieses Parameters 1 – 2 Wirkstoffmoleküle an das Protein. Schon die Versuche zur Bindung biotinylierter Antikörper (siehe 4.3.4.1.1.) ergaben eine Steigerung der Bindungseffizienz durch Verlängerung der Reaktionszeit. Obwohl die Oligonukleotide mit einem Molekulargewicht von ~6000 Da um das 25-fache kleiner sind als ein Antikörper ist die Reaktionszeit mit dem Trägersystem um das 3fache so lang. Eine Rolle spielt hierbei der unterschiedliche Biotinylierungsgrad. Während der CD3-AK im Durchschnitt über 8 – 10 Biotinreste verfügt, trägt jedes PTO nur einen einzigen Biotinrest, so dass die Bindungswahrscheinlichkeit herabgesetzt sein kann. Durch die starke negative Ladung

der Nukleotide können eventuell auch Abstoßungskräfte zwischen den Molekülen eine Rolle spielen.

Die erzielten Bindungsraten liegen mit maximal 12 µg/mg Nanopartikel nicht höher als die auf inkorporativem Wege eingebundene Wirkstoffmenge. Ein bis zwei Avidintaschen können besetzt werden und belegen das Ergebnis, das im Funktionalitätstest mit B4F erreicht wurde (siehe 4.3.3.).

An die Oberfläche von Gel-NAv-NP wurden zur Antisense-Testung in Makrophagen biotinylierte PNA in einer Menge von 21 µg/mg Gelatine gebunden. Die im Durchschnitt ca. 2,5-fach so große Menge an gekoppeltem NAv begründet die effizientere Beladung gegenüber den HSA-Av-NP. Hier konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Erhöhung der PNA-Menge nicht zu einer gesteigerten Komplexierung führte [C. Coester et al., 2000]

Für die anschließende Antisense-Testung in der Zellkultur wurde keine spezifische Proteinhemmung nachgewiesen. Dieses negative Ergebnis kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig auf das Nanopartikelsystem zurückgeführt werden. Dieser Bereich lässt noch viel Raum für weitere Untersuchungen offen [Merodio et al., 2001, de Diesbach et al., 2002, Arnedo et al., 2003, Arnedo et al., 2004].

4.4. Zellkulturexperimente

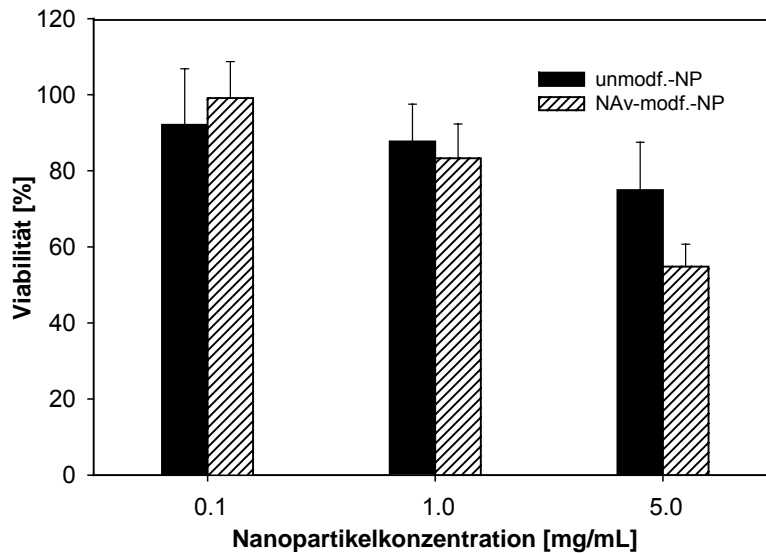
4.4.1. Zytotoxizität (MTT-Test)

Für die Beurteilung eines zellschädigenden Einflusses wurden HeLa Zellen in Anlehnung an die Inkubationszeiten für die Zellaufnahmestudien, vier Stunden lang mit drei verschiedenen Konzentrationen der proteinbasierten Trägersysteme behandelt.

Lebende Zellen können den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid durch die in den Mitochondrien vorkommende Dehydrogenase zu dem blau gefärbten Formazan umsetzen. Man erhält so eine Aussage über den mitochondrialen Zellstoffwechsel [Mosmann, 1983]. Das wasserunlösliche Reaktionsprodukt wurde durch alkalische Zellyse freigesetzt

und anschließend photometrisch bei 540 nm in den Mikrotiterplatten vermessen.

Abbildung 4-27: Toxizität verschiedener Gel-NP Zubereitungen in HeLa



Es wurde ein leicht dosisabhängiger toxischer Effekt sowohl für unmodifizierte als auch für NAV-modifizierte Nanopartikel beobachtet. Für die beiden niedrigeren Konzentrationen bis 1 mg/mL wurden kaum Verluste der Viabilität registriert. Die sehr hohe Konzentration von 5 mg/mL zeigte hingegen schon deutliche zellschädigende Eigenschaften für die Zellpopulation.

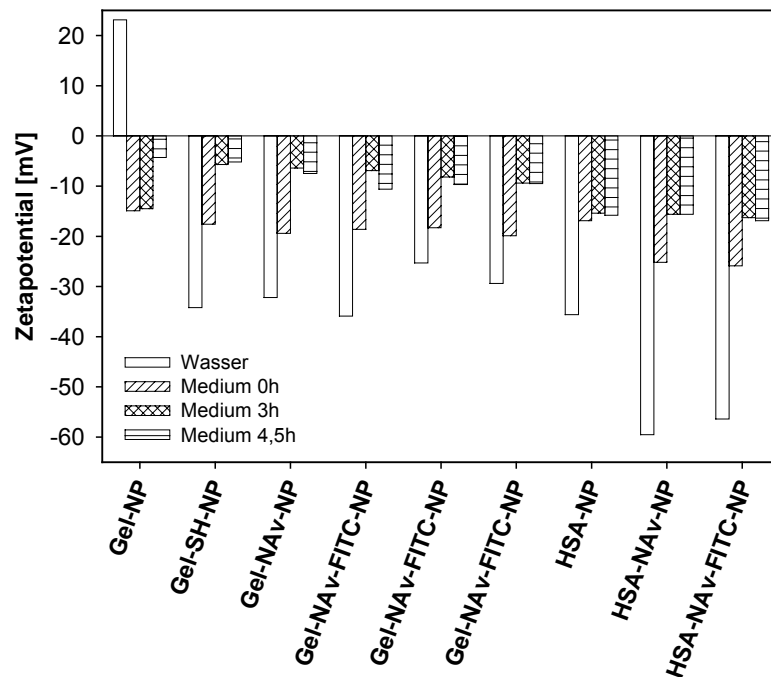
Die nachfolgenden Zellaufnahmeversuche in Lymphozyten wurden jedoch bei maximal 1 mg/mL durchgeführt. Die Versuche mit Trast-Gel-Nav-FITC-NP in Brustkrebszellen wurden nur mit 0,1 mg/mL ausgeführt. In diesem Konzentrationsbereich sind, bedingt durch das Trägersystem, keine toxischen Effekte für die Zellkultur zu erwarten.

4.4.2. Stabilität im Zellkulturmedium

Nanopartikelsuspensionen hergestellt aus HSA als auch aus Gelatine erwiesen sich über mehrere Monate im wässrigen Milieu als lagerbeständig. Eventuell

auftretende Sedimentbildung lässt sich leicht wieder aufschütteln bzw. mit dem Vortex resuspendieren. Vor den anschließenden Zellkulturexperimenten wurden Stabilitätsprüfungen im Zellkulturmedium durchgeführt. Eingesetzt wurden dieselben Medien, in denen die für die Zellaufnahme verwendeten Zellen kultiviert wurden. Gleichzeitig wurde der Einfluss von fötalem Kälberserum (FCS) auf die Nanopartikeldurchmesser betrachtet, da viele Trägersysteme in FCS-haltigem Medien nur eine begrenzte Stabilität aufweisen und zu Aggregationen neigen. Der Einfluss diverser Zellkulturkomponenten kann zu einer Veränderung des Oberflächenpotentials führen. Durch Anlagerung von Medienbestandteilen kommt es zu einem Ladungsausgleich, wobei das Zetapotential wechselt, das kolloidale Trägersystem den Nullpunkt durchläuft und zusammenbricht. Die Nanopartikel nähern sich einander soweit an, dass sich Aggregate ausbilden. Man beobachtet in FCS-freiem Medium neben einer veränderten bzw. verbesserten Kolloidstabilität für einige Trägersysteme auch eine verstärkte Zellaufnahme. Da später gezeigt werden soll, dass die Proteinnanopartikel über eine rezeptorvermittelte Endozytose und nicht über einen unspezifischen Effekt in die Zellen aufgenommen werden, erfolgten die Bestimmung des Zetapotentials im kompletten Medium, also einschließlich FCS-Zusatz. Da keine Unterschiede des Zetapotentials in Abhängigkeit von den hauptsächlich für unsrer Zellkultur eingesetzten Medien (lymphozytäre Zellen RPMI-Medium und HeLa Dulbecco's Modified Eagle's-Medium (DMEM) festgestellt wurden, sind in der nachfolgenden Graphik nur die in RPMI-Medium erhalten Ergebnisse dargestellt. Untersucht wurde das Zetapotential von Gel-NP auf allen Modifikationsstufen. Bei den HSA-NP wurden lediglich unmodifizierte und die Endstufe in Form der NeutrAvidinTM-modifizierten Nanopartikel betrachtet. Der Untersuchungszeitraum betrug in Anlehnung an die Zellkulturversuche 4,5 Stunden. Der Ausgangswert wurde in MQ und in Zellkulturmedium ermittelt. Da die Trägersysteme in Wasser stabil waren, wurden anschließend nur noch die Daten im Kulturmedium erhoben.

Abbildung 4-28: Zetapotential von Gel- und HSA-NP auf den verschiedenen Stufen des Herstellungsprozesses in MQ-Wasser und RPMI-Medium



Die Messungen weisen deutliche Unterschiede zwischen MQ-Wasser und RPMI-Medium auf, weil sowohl der pH-Wert (siehe Abbildung 4-19) als auch die Ionenkonzentration verschieden sind und beide Einfluss auf das Zetapotential ausüben. Da die Ladungen in MQ-Wasser nicht abgeschirmt werden, liegt das Zetapotential bei positiven Werten etwas höher bzw. bei negativen niedriger als im Zellkulturmedium. Die Messwerte unterliegen in reinem Wasser durch wechselnde Mengen an gelöstem Kohlendioxid stärkeren pH-Wertschwankungen als in einer gepufferten Lösung bzw. in Medium. Die erhobenen Daten weisen somit eine höhere Variabilität auf. Bei den in Medium suspendierten Proben stellt sich nach einiger Zeit ein Gleichgewichtszustand ein, der im allgemeinen zu einer leichten Erniedrigung des Potentials führt (siehe Abbildung 4-28). Denn obwohl die Nanopartikel stark quervernetzt sind, verfügen sie auf ihrer Oberfläche noch über freie funktionelle Gruppen, die der Protonierung / Deprotonierung unterworfen sind. Interessant ist der Umschlag unmodifizierter Gel-NP von positiven zu negativen Zetapotentialwerten, den allein das Auswechseln von MQ gegen Zellkulturmedium bewirkt. Die Umkehrung liegt begründet in einem veränderten pH-Wert, der unterschiedlichen Ionenstärke und der Anlagerung von Proteinen, die zu einer anderen Oberflächen-

ladung des Partikelsystems führen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Trägersystem bei physiologischen pH-Werten stabil ist. Saure Gewebe und Zellorganellen im Organismus mit einem pH-Wert um 6,0 bergen für das kolloidale System eine Stabilitätsgefahr (siehe Abbildung 4-19). Ganz entscheidend für die Anwendung in der Zellkultur ist, dass toxische Eigenschaften wie sie generell bei kationischen Trägern beobachtet wurden, bei einem negativ geladenen Partikelsystem ebenso wie unspezifische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Zellmembran nicht zu erwarten sind (siehe Abbildung 4-27).

Die Untersuchungen bezüglich des Partikeldurchmessers wurden in FCS-haltigem und -freien RPMI-Medium durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, unabhängig vom FCS-Zusatz, in beiden Medien keine merkliche durchschnittliche Größenzunahme bis zu 24 Stunden. Betrachtet man den zunehmenden Polydispersitätsindex, der ein Maß für die Größenverteilung darstellt, erkennt man in seiner Zunahme eine Verbreiterung durch ein gewisses Partikelwachstum. Man spricht von einer monodispersen Probe bei einem Polydispersitätsindex unter 0,1, alle Werte über 0,3 verlassen den idealen Bereich und im ungünstigsten Fall kommt es zur Ausbildung von Mikropartikeln. Eine zuverlässige Auswertung mittels PCS ist dann nicht mehr möglich (siehe Abbildung 4-29, Abbildung 4-30).

Abbildung 4-29: Messung zu verschiedenen Zeitpunkten in RPMI-Medium, ohne FCS

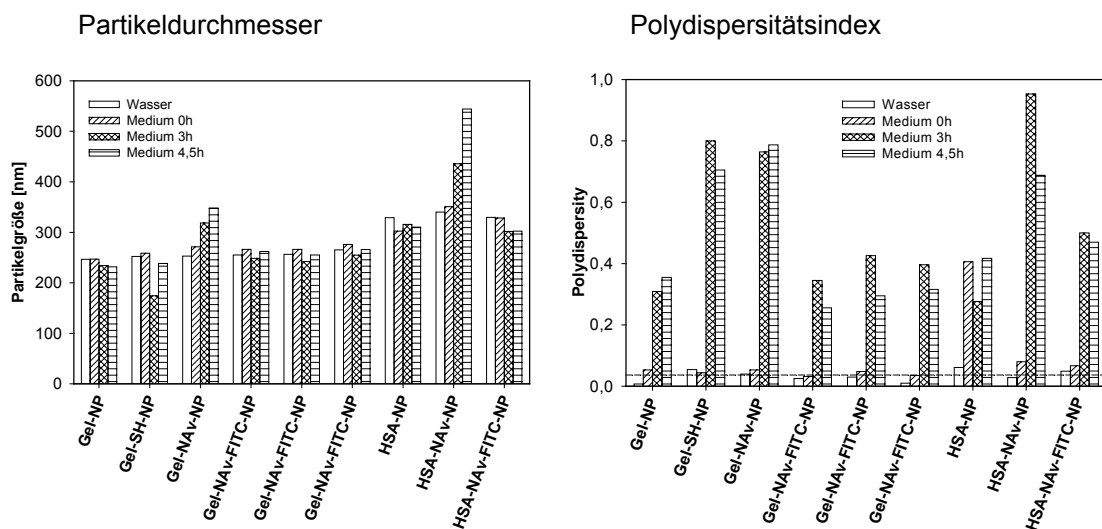
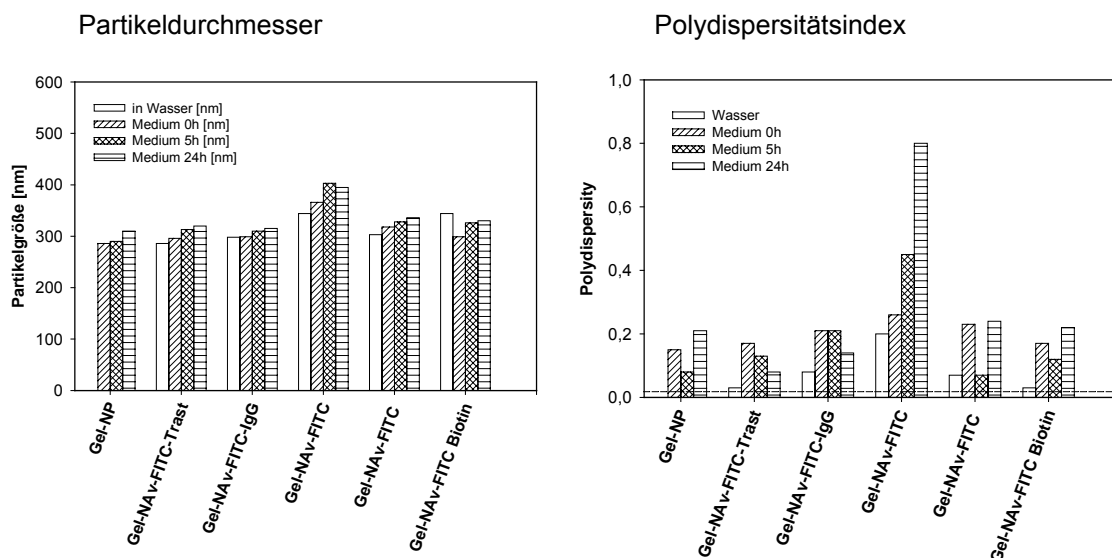


Abbildung 4-30: Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten in RPMI-Medium mit FCS

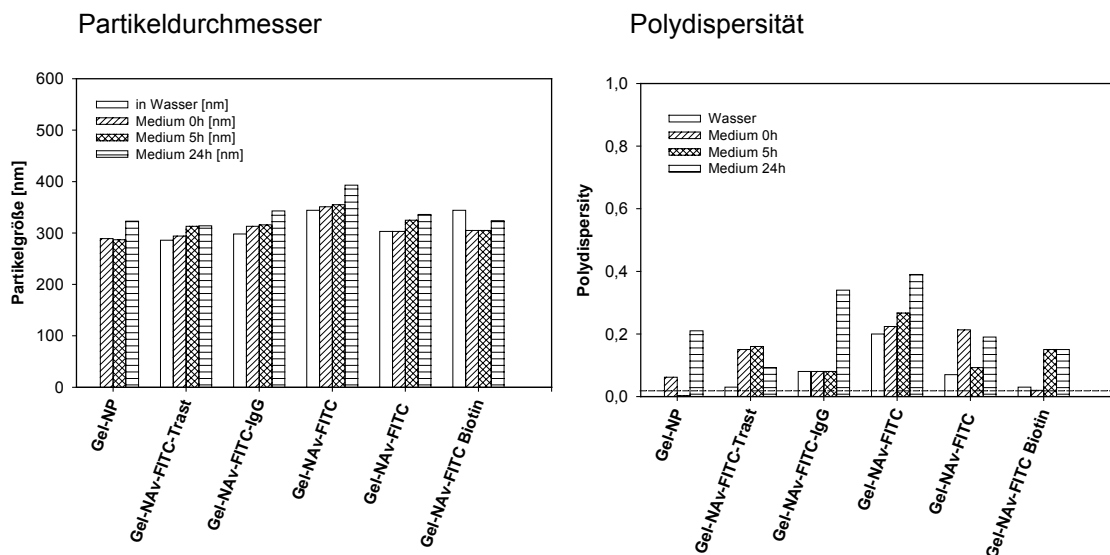


Betrachtet man die Änderungen der Partikeldurchmesser in Verbindung mit dem Polydispersitätsindex, erkennt man deutlich die Aggregationsneigung in FCS-freiem Medium, die auf der Anfälligkeit kolloidaler Systeme gegenüber variierenden pH-Werten und Ionenstärken beruht. Eine Probe von Gel-NAV-FITC-NP fällt in Gegenwart von FCS mit einem Index von 0,8 nach 24 Stunden aus dem Rahmen. Die ist entweder auf das Partikelsystem selbst oder eine schlechte Suspendierung im Medium zurückzuführen. Im Normalfall erwiesen sich die Proben über den Inkubationszeitraum von vier Stunden weitestgehend

stabil. In diesem Fall zeigt sich auch nach 24 Stunden keine merkliche Veränderung mehr bezüglich einer Partikelaggregation (siehe Abbildung 4-30, Abbildung 4-30).

Die Proben in Dulbecco's Modified Eagle's-Medium (DMEM-Medium) wurden aufgrund der Ergebnisse in RPMI-Medium nur in komplettem Medium analysiert (siehe Abbildung 4-31). Die Nanopartikelsuspension, die in RPMI-Medium die stärkste Aggregation aufwies, schneidet auch hier am schlechtesten ab. Allerdings steigt der Polydispersitätsindex mit 0,4 nur halb so stark an wie zuvor. Das vermutlich durch eine ungenügende Probenaufbereitung bedingte Partikelwachstum der einen Gel-NAV-FITC-NP-Charge wird durch die Ergebnisse unterstützt, weil alle anderen Proben vergleichbare Daten liefern.

Abbildung 4-31: Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten in DMEM-Medium



Der Größenanalyse ging nach dem Verdünnen im Medium eine Ultraschallbehandlung von 3 Minuten voran, bevor sie für Inkubationsversuche eingesetzt wurden (siehe Abbildung 4-30, Abbildung 4-31). Proben, die lediglich mit dem Vortex im Medium suspendiert wurden, wiesen nach der Inkubation zum Teil sichtbare Mikropartikel auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Untersuchungen verdeutlichen, wie wichtig eine erneute Behandlung nach dem Verdünnen der Probe im Zellkulturmedium mittels Ultraschallbad ist, um zu einem längerfristig stabilen Systemen zu gelangen. Es ist weiterhin sinnvoll die Partikel nach der Inkubation im Medium nochmals auf ihren Durchmesser zu

überprüfen, denn eine aggregierte Dispersion führt zu einer eingeschränkten oder gar ausbleibenden Zellaufnahme.

Hingegen hatte die Absättigung der freien NAV-Valenzen mit Biotin keinen Einfluss auf die Stabilität des Trägersystems. Berechnungen ergaben, dass die im RPMI-Medium vorkommende Biotinmenge sehr gut mit der zur Absättigung benötigten Biotinmenge korrelierte. Da die Trägersysteme keinen signifikanten Unterschied in den beiden Medien erkennen ließen, können die freien NAV-Bindungsstellen keinen Stabilitätsrelevanz haben. Die Stabilität scheint also nur von der Qualität der Ausgangspräparation und nicht von der Art des Mediums abhängig zu sein. Die Aggregationsneigung ist im Vergleich zu Wasser in Medium und in PBS immer erhöht. Bei sorgfältiger Vorbereitung sind die Proben aber über die Inkubationszeit von 3 - 4 Stunden stabil.

4.4.3. Zellaufnahme von Antikörper-beladenen Gel-Nanopartikeln

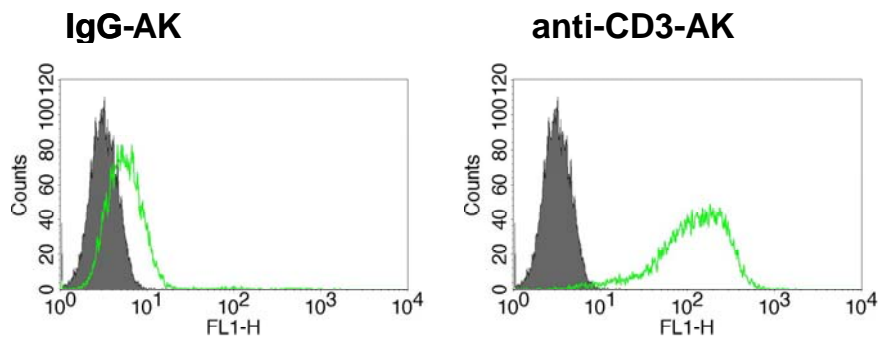
4.4.3.1. T-Lymphozyten mit CD3-Gel-NAV-FITC-NP

4.4.3.1.1. Quantifizierung der CD3-Expression

Die Zellstudien wurden im Rahmen des BMBF-Projektes von unserem Kooperationspartner Herrn Norbert Dinauer, aus dem Arbeitskreis von Herrn PD Dr. v. Briesen am Georg Speyer Haus durchgeführt.

Als Zielzellen wurden zwei lymphozytäre Zelllinien (Jurkat und CEM) auf das Ausmaß ihrer CD3-Expression auf der Oberfläche hin untersucht. Die beiden Zelltypen wurden hierfür mit einem fluoreszenzmarkierten anti-CD3 AK markiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Prozentsatz an Zellen detektiert, der aufgrund vorhandener Antigenbindungsstelle (CD3-Expression) ein Fluoreszenzsignal aufwies. Zur Kontrolle wurde eine unspezifische IgG AK-Lösung auf die Zellen gegeben.

Abbildung 4-32: Oberflächenexpression des Lymphozytenantigenes CD3 auf Jurkat-Zellen



Exemplarisch sind die FACS-Ergebnisse für die Jurkat-Zellen dargestellt. Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität, die als Zahlenwert in der Graphik vermerkt wurde. Dabei wurde eine Zunahme um das 12 fache bei den Jurkat-Zellen und lediglich eine um das 8-fache bei den CEM-Zellen ermittelt. Die schwarz ausgefüllte Kurve in der Abbildung stellt die unbehandelten Kontrollzellen dar und die grüne Linie gibt die Verschiebung der antikörperbindenden Zellen an. Jurkat-Zellen verfügen zu 98% im Gegensatz zu nur 38% der CEM-Zellen quasi alle über eine Antigenbindungsstelle. Die FACS-Ergebnisse der zwei Zelllinien zeigen also einen deutlichen prozentualen Unterschied an CD3-Oberflächenantigenen. Diese große Differenz könnte Auswirkungen auf das Ausmaß der Partikelinternalisation haben.

Die mit dem IgG Kontrollantikörper behandelten Zellen zeigen lediglich eine minimale Verschiebung, verglichen mit den mit anti-CD3 AK behandelten Zellen.

4.4.3.1.2. Quantifizierung der Partikelbindung mittels FACS

In der Literatur sind verschiedene andere Trägersysteme beschrieben, die nach Erkennung durch den T-Zell-Rezeptorkomplex über eine rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert wurden. In der Arbeit von Jelinkova et al. wurden Doxorubicin beladene Hydroxypropylmethacrylat-Copolymere als Trägersystem mit anti-CD3 AK konjugiert und an menschlichen und Maus-Lymphozyten getestet [Jelinkova et al.,53]. Immunkomplexe auf Basis von Polyethylenimin wurden zum Gentransfer ebenfalls in menschlichen lymphozytären Zelllinien eingesetzt [Jelinkova et al., 1998, Guillem et al., 2002a, Guillem et al., 2002b].

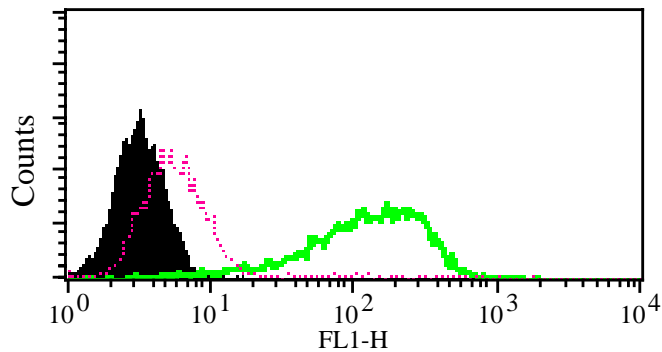
Im folgenden wurde die Bindung von anti-CD3-Gel-Nav-FITC-NP in Abhängigkeit von der CD3-Expression an Jurkat und CEM-Zellen untersucht. Dieser Vorgang dauert normalerweise nur einige Minuten. Um eine möglichst gute Aufnahme der Nanopartikel zu erreichen, wurde den Zellen vier Stunden Zeit gegeben. Die gewaschenen Zellen wurden zuerst im FACS auf ihrer Bindung an die Zellen untersucht. Rückschlüsse über eine Zellaufnahme können nicht gemacht werden. Erst die Untersuchungen derselben Proben im Konfokalen Laserscanning Mikroskop lassen eine intrazelluläre Lokalisation eindeutig beweisen. Bestimmt wurde die Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MF), die eine Aussage über die Anzahl der an die Zellen gebundenen NP macht. Auch hier dienen wieder mit IgG AK beladene modifizierte Gel-NP als Kontrolle für die spezifische Rezeptorbindung des Trägersystems an die Zellen.

Tabelle 4-11: Zellaufnahme von Antikörper-modifizierten Gel-Nav-FITC-NP in Abhängigkeit von der CD3-Expression auf der Zelloberfläche

Zelllinien	CD3-Expression [%]	Mittlere Fluoreszenzintensität	
		CD3-Gel-NP	IgG-Gel-NP
Jurkat	98,23	123,54	9,57
CEM	37,54	46,85	8,64
MCF-7	<1	5,46	10,07

Entsprechend ihrer sehr unterschiedlichen phänotypischen Ausstattung fallen die MF-Daten der drei mit CD3-Gel-NAV-FITC-NP behandelten Zelllinien im FACS aus. In Korrelation zu dem prozentualen Anteil an CD3-Oberflächenantigenen, wurde im Vergleich zu CEM-Zellen die 2,5-fache Partikelmenge an Jurkat-Zellen gebunden. MCF-7-Zellen verfügen über keinen TZR und wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Hingegen zeigten die mit Kontrollantikörper beladenen Zubereitungen für alle drei Zelltypen vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Die graphische Darstellung in Abbildung 4-33 verdeutlicht das Ergebnis noch einmal für die Jurkat-Zellen.

Abbildung 4-33: Zunahme der Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal bei Jurkat-Zellen



unbehandelte Kontrollzellen (schwarz), IgG-Gel-NP (pink) und anti-CD3-Gel-NP (grün)

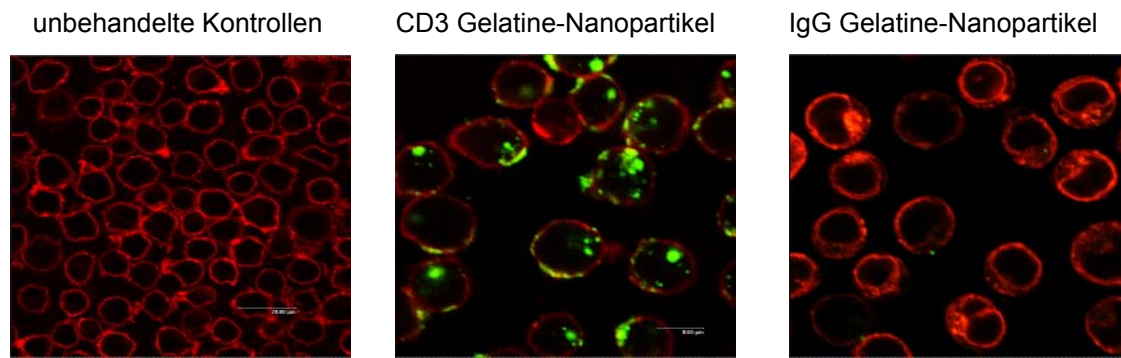
Es kommt zu einer starken Fluoreszenzverschiebung bedingt durch eine hohe Bindung der mit anti-CD3-AK beladenen Nanopartikel an die Zellen. Man kann also von einer spezifischen Antikörper-vermittelten Bindung an die Lymphozyten ausgehen, da das IgG-beladene Trägersystem nur eine kleine Fluoreszenzverschiebung im Gegensatz zu den Kontrollzellen aufweist. Die Signal-erhöhung zeigt deutlich eine vermehrte Anlagerung zugunsten der CD3-Gel-Nav-FITC-NP.

4.4.3.1.3. Bestimmung der Internalisation mittels CLSM

Nachdem eine vermehrte Bindung der anti-CD3-Gel-Nav-FITC-NP an Lymphozyten mittels FACS nachgewiesen wurde, soll nun untersucht werden ob es sich lediglich um eine Anlagerung oder um eine Partikelaufnahme in die Zellen handelt. Um die spezifische Zellaufnahme zu bestimmen, wurden die entsprechend aufbereiteten Proben durch 25 verschiedene Schnitte in der z-Ebene, in einer Gesamtdicke von 15 μm abgebildet. Durch eine nachträgliche Aufarbeitung mit einer Software erhält man ein aus den überlagerten Einzelbildern zusammengesetztes dreidimensionales Schnittbild.

Zur Detektion wurde die Zellmembran mit TRITC-konjugierten Concanavalin A gefärbt, so dass die Zellmembran rot erscheint. Die FITC-markierten NP erscheinen als grüne Punkte.

Abbildung 4-34: Zellaufnahme von Antikörper-beladenen Gel-NP in Jurkat-Zellen



Im linken Bild erkennt man lediglich die rot gefärbte Zellmembran. Dasselbe Bild zeigt sich für die mit der IgG-Kontrollzubereitung inkubierten Zellen. Die mit dem unspezifischen Kontrollantikörper gekoppelten NP-Proben wurden bei der Aufarbeitung herausgewaschen, weil sie nicht unspezifisch an der Zellmembran hafteten. Nur in dem mittleren Bild findet man grüne Fluoreszenzsignale innerhalb der Zellmembranbegrenzung von mit anti-CD3-Gel-NP behandelten Jurkat-Zellen. Es kommt zu einer punktförmige Anreicherung innerhalb der Zellen, was auf eine Anreicherung in endosomalen Kompartimenten hinweist. Für eine spätere Wirkstoffbeladung ist eine Freisetzung, bevor es zur Degradation in den Zellorganellen kommt, essentiell. Viele Trägersysteme scheitern an dieser Hürde. Andere Trägermaterialien wie zum Beispiel Polyethylenimin verfügen selbst über eine endosomolytische Aktivität. Es liegt bei physiologischen pH-Werten nur zum Teil protoniert vor und entfaltet so seine als „Protonenschwamm“ bezeichnete freie Pufferkapazitätsaktivität. Dadurch ausgelöst kommt es zu einem osmotisch bedingten Anschwellen im Kompartiment, bis es schließlich zu einer Membranruptur und der Freisetzung des Polyethylenimin-Komplexes aus dem Endosom in das Zytosol kommt [Boussif et al.].

Vielfach sind die Nanopartikel auch noch mit der Zellmembran assoziiert, so dass entweder eine längere Inkubationszeit oder ein späterer Aufarbeitungszeitpunkt nach einer längeren Ruhephase für die Zellen noch ein besseres Ergebnis liefern könnte. Als Negativkontrolle dienen wieder die CD3-negativen MCF-7-Zellen, die entsprechend der FACS Ergebnisse keine der Präparationen ins Zellinnere aufgenommen haben. Die Ergebnisse belegen eindrucksvoll eine rezeptorvermittelte Endozytose von anti-CD3-Gel-NP in humane T-Lymphozyten.

4.4.3.1.4. Zellaufnahme nach Konkurrenzexperiment

Zur Manifestierung der beobachteten rezeptorvermittelten Zellaufnahme, wurden T-Lymphozyten Zellen zur Absättigung der Antigenbindungsstellen mit einem Überschuss an freiem anti-CD3- oder unspezifischem IgG Antikörper vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen dann in Anwesenheit des freien AK mit dem Trägersystem inkubiert.

4.4.3.1.5. Quantifizierung der Zellaufnahme mittels FACS

Anstelle der CD3-negativen MCF-7-Zellen wurden neben Jurkat-Zellen nun noch CEM-Zellen eingesetzt. Diese verfügen, wie die Versuche unter 4.4.3.1.1. gezeigt haben, im Vergleich zu Jurkat-Zellen nur über ein Drittel so viele CD3-Antigenbindungsstelle auf der Oberfläche. Ermittelt wurde die Fluoreszenzintensität nach Differenzbildung zwischen den Werten, die nach alleiniger Inkubation mit CD3-Gel-NAv-FITC-NP und den Werten, die nach einer vorgeschalteten Behandlung mit der freien Antikörperlösung gemessen wurde. Die Differenz weist den Intensitätsverlust auf und belegt eine geringere Nanopartikelbindung an die Zellmembran.

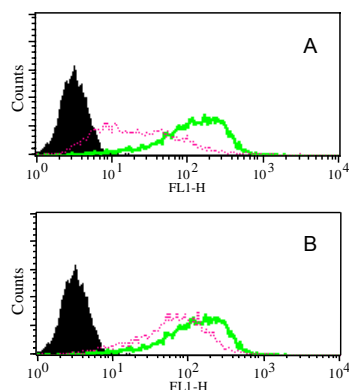
Tabelle 4-12: Zellaufnahme von Antikörper-modifizierten Gel-NP mit und ohne AK Inhibition

Inkubation mit CD3-Gel-NP	Mittlere Fluoreszenzintensität	
	CD3-Expression [%]	
	Jurkat	CEM
	98,23	37,54
ohne freien AK	123,54	46,85
+ anti-CD3 AK-Lösung	38,86	11,53
+ IgG AK-Lösung	86,23	27,51

Die Absättigung des CD3-Oberflächenantigens mit anti-CD3-Lösung führt zu einer Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MF) von 70% bei den Jurkat-Zellen und zu einer 75%igen Reduktion bei den CEM-Zellen. Die Vorinkubation bewirkt eine Belegung der Rezeptoren mit freiem anti-CD3-AK und

erreicht bei beiden Zelllinien eine um zwei Drittel reduzierte Bindung an die Zelloberfläche. Nicht so massiv verläuft der Intensitätsverlust bei der vorgeschalteten Inhibition mit IgG-AK-Lösung. Die stark exprimierenden Jurkat-Zellen weisen nur einen um 30% verminderte Intensität auf. Ähnlich verhält es sich mit den Werten bei den CEM-Zellen, die bei 40% liegen. Man erkennt, dass auch die Belegung mit unspezifischen Antikörpern zu einer Inhibition der Zellaufnahme führt. Eine mögliche Erklärung für die relativ hohen MF-Daten bei der IgG-Kontrolle kann durch Verdrängung oder sterische Effekte verursacht werden. Ein solcher Effekt ist nicht unüblich bei Antikörpern, die im großen Überschuss zugesetzt werden. In der folgenden Darstellung ist das oben aufgeführte tabellarische FACS-Ergebnis für die Jurkat-Zellen, die mit anti-CD3-modifizierten Nanopartikeln behandelt wurden noch einmal graphisch dargestellt. (Abbildung 4-35).

Abbildung 4-35: Zellbindung an Jurkat-Zellen nach Vorbehandlung mit freiem Antikörper



Fluoreszenzsignal der unbehandelten Kontrollzellen (schwarz), Vorinkubation mit freier AK-Lösung vor Nanopartikelzugabe (pink), A: mit CD3-AK, B: mit IgG-AK, ohne Vorinkubation, direkte Zugabe der Nanopartikelpräparation (grün)

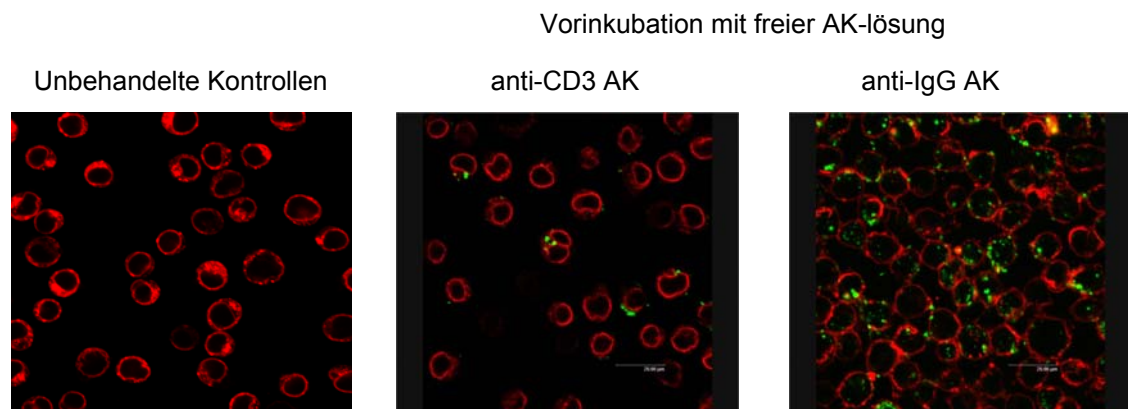
In der Abbildung wird die Partikelbindung nach der Behandlung von anti-CD3-Gel-NP an Jurkat-Zellen (grün) mit der Fluoreszenzintensität nach Vorinkubation mit freiem anti-CD3-AK (A, pink) oder mit freiem unspezifischen IgG-AK (B, pink) durch Übereinanderlegen verglichen. Das obere Bild zeigte eine deutliche Verschiebung der pinkfarbenen Kurve gegenüber der grünen, die nach Blockade mit anti-CD3-AK-Lösung auftritt. Die Partikelbindung ist durch die Absättigung mit freien CD3-AK deutlich vermindert. Es kommt allerdings

nicht zu einer vollständigen Belegung der Rezeptoren, so dass dem Trägersystem immer noch eine verringerte Anzahl an T-Zell-Rezeptoren zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu ist die Partikelbindung nach der Behandlung mit der IgG AK-Lösung kaum gegenüber der grünen Kurve verschoben, die nach einer alleinigen Inkubation mit der Partikelpräparation gemessen wurde. Der Antikörper zeigt zwar eine unspezifische Adhäsion an die Zelloberfläche, die jedoch die CD3-vermittelte Endozytose nur geringfügig beeinträchtigt.

4.4.3.1.6. Bestimmung der Internalisation mit CLSM

Im Anschluss an die Konkurrenzexperimente soll nun mittels CLSM überprüft werden, ob die CD3-Gel-NAV-FITC-NP in das Zellinnere aufgenommen wurden. Die in der Abbildung 4-36 dargestellten CLSM-Aufnahmen bestätigen eindrucksvoll die rezeptorvermittelte Zellaufnahme von CD3-Gel-NAV-FITC-NP in Jurkat-Zellen.

Abbildung 4-36: Zellaufnahme in Jurkat-Zellen nach Vorinkubation mit freiem Antikörper

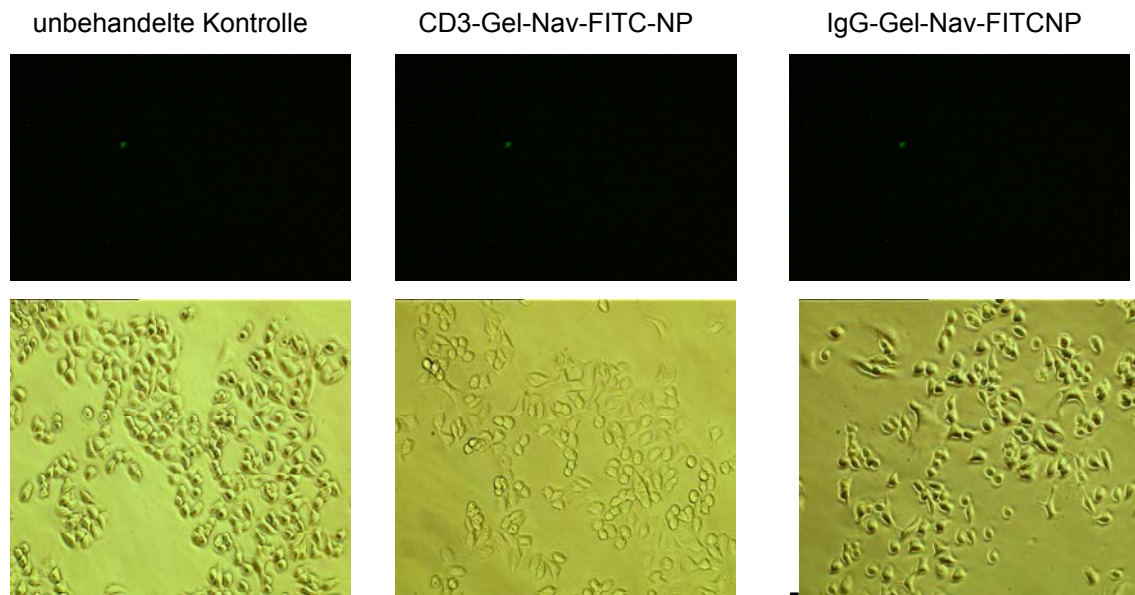


Das linke Bild zeigt unbehandelte Kontrollzellen, deren Zellmembran durch Anfärben mit TRITC-konjugiertem Concanavalin A rot erscheint. Nach Vorinkubation mit anti-CD3 AK erkennt man im mittleren Ausschnitt nur eine leichte Partikelassoziation an einigen Zellen. Die Zellaufnahme wurde durch die anti-CD3 AK-Vorbehandlung vollständig inhibiert, da die CD3-Gel-NAV-FITC-NP mit dem AK in Lösung um die Bindungsstellen konkurrieren. Die Zugabe des unspezifischen IgG-Kontrollantikörpers wirkte sich hingegen nicht auf die Nanopartikelaufnahme in die Jurkat-Zellen aus. Die punktförmigen Fluoreszenzen

weisen wieder auf eine Anreicherung in den Endosomen hin. Diese Aufnahmen erbringen den Beweis, dass CD3-Gel-Nav-FITC-NP allein durch die CD3-vermittelte Endozytose in die Zellen eingeschleust wurden.

Zusätzlich wurden noch Inkubationsversuche mit MCF-7-Zellen als Negativkontrolle durchgeführt, weil sie selbst nicht über einen T-Zell-Rezeptorkomplex auf der Oberfläche verfügen. Zur Kontrolle wurden die Zellen auch hier wieder neben den CD3-Gel-Nav-FITC-NP mit den IgG-beladenen Nanopartikeln untersucht. Die Zellen wurden zunächst im Lichtmikroskop untersucht. Anschließend wurden die Nanopartikelpräparationen durch ihr gekoppeltes FITC-markiertes NAV im Fluoreszenzmikroskop als Fluoreszenzpunkt sichtbar gemacht.

Abbildung 4-37: MCF-7-Zellen nach Inkubation mit Antikörper-modifizierten Gel-NP



Die lichtmikroskopischen Aufnahmen in der unteren Reihe zeigen deutlich die ausplattierten MCF-7-Zellen. Die unterschiedliche Zelldichte auf den einzelnen Bildern, ist auf Verluste bei der Probenaufbereitung zurückzuführen, da die ursprünglich ausgesäte Zellzahl für alle Ansätze gleich war. Wie man in der oberen Reihe sehen kann, erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop weder Zellen noch fluoreszenzmarkierte Nanopartikel. Die Zellen selbst weisen keine Eigenfluoreszenz im FITC-Bereich auf, so dass sie nur durch anhaftende Nanopartikel detektiert werden können. Die Aufnahmen lassen keine unspezifische

Adhäsion an MCF-7-Zellen erkennen, weil sich alle Nanopartikel durch das Waschen der Zellen entfernt ließen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Nanopartikel durch den anti-CD3 AK als Drug-Targeting-Liganden eine effektive, spezifische Zellmembrangängigkeit erhalten haben.

4.4.3.2. Zellaufnahme in Brustkrebszellen mit Trastuzumab-beladenen Gel-Nanopartikeln (Trast-Gel-NAv-FITC-NP)

4.4.3.2.1. Quantifizierung der Partikelbindung mittels FACS

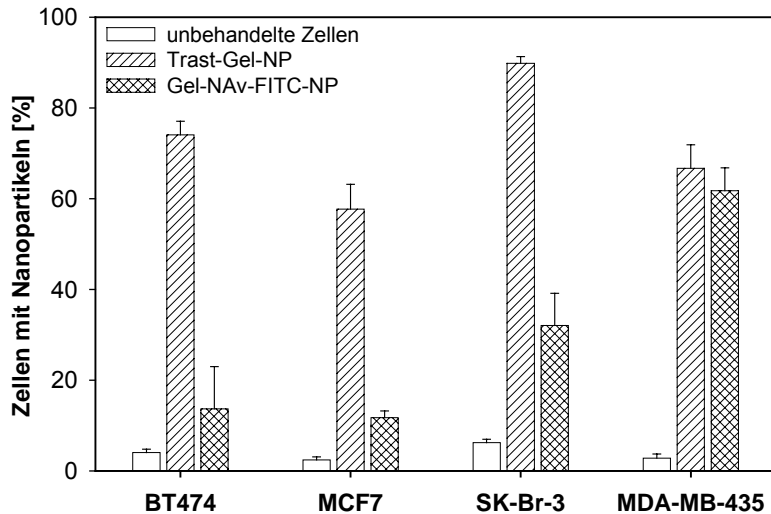
Die Zellkulturexperimente wurden freundlicherweise von Frau Heidrun Wartlick (Arbeitsgruppe Prof. Kreuter / Prof. Strebhardt) an der Frauenklinik am Universitätsklinikum Frankfurt durchgeführt.

Die Ergebnisse, die zuvor durch rezeptorvermittelte Endozytose in Lymphozyten aufgenommen CD3-Gel-NAv-FITC-NP sollen dann mit Trastuzumab beladenen NP (Trast-Gel-Nav-FITC-NP) nachvollzogen werden. Damit soll die Übertragbarkeit und die Vielseitigkeit des Trägersystems für den Einsatz biotinylierter Liganden gezeigt werden. Der Versuchsaufbau wurde mit einigen kleineren Abweichungen gegenüber dem Experimente mit den Lymphozyten durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde um eine Stunde verkürzt und die Nanopartikelkonzentration betrug mit 0,1 mg/mL lediglich noch ein Zehntel. Zur Kontrolle wurden dieses mal nur Gel-NAv-FITC-NP mitgeführt, weil unmodifizierte Gel-NP im Gegensatz zu HSA-NP über keine Eigenfluoreszenz verfügen und somit nicht detektierbar sind. Es fehlen die IgG-Gel-Nav-FITC-NP, da der Beleg für deren spezifische, rezeptorvermittelte Aufnahme zuvor schon erbracht wurde. Alle anderen Parameter und Aufarbeitungsschritte wurden identisch übernommen.

Die vier eingesetzten Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Rezeptorexpression des Her2-Oberflächenantigens voneinander. Die MCF-7-Zellen wurden, weil sie eine normale Antigenexpression aufweisen, wie in der Literatur üblich, auf 100% gesetzt [Lewis et al., 1993]. Im Vergleich dazu zählen die BT474 und die SK-BR-3 zu den überexprimierenden Zellen. Ihre Expression wurde in Relation zu den MCF-7-Zellen gesetzt. Somit verfügen sie über eine dreimal so hohe

Expression. Als negative Kontrolle dienen die MDA-MB-435 Zellen, die keine Expression des Her2- Oberflächenantigens aufweisen.

Abbildung 4-38: FACS-Daten für die Inkubation von Brustkrebszelllinien, die über eine unterschiedlich hohe Her2-Antigenexpression verfügen mit Trast-Gel-NAv-FITC-NP



In Übereinstimmung mit dem Expressionslevel des Her2-Oberflächenantigens binden die Trast-Gel-NAv-FITC-NP zu 85% an die überexprimierenden SK-BR-3-Zellen. Ähnlich verhalten sich auch die BT474, die einen vergleichbaren Antigenstatus auf der Oberfläche besitzen. Die Nanopartikel binden hier mit 75% nur geringfügig schlechter an die Zellen. Bei den MCF-7 Zellen, die für einen normalen Rezeptorstatus stehen sind es nur noch 60%. Die Zellbindung korreliert also mit der Höhe des Rezeptorstatus. Die unspezifische Bindungsneigung wurde mit der antikörperfreien (Gel-NAv-FITC-NP), aber ansonsten identischen Präparation getestet. Die Ergebnisse zeigen auch hier Unterschiede für die vier verschiedenen Zelllinien. Die SK-BR-3-Zellen weisen mit 35%, verglichen mit den bei 10 – 15% liegenden BT474 und den MCF-7, den höchsten Prozentsatz an fluoreszenzmarkierten Zellen auf. Aus dem Rahmen fallen lediglich die MDA-MB-435, die als Negativkontrolle über keinen Oberflächenrezeptor für Her2 verfügen, für die aber eine unspezifische Bindung von 60% bei beiden Testsysteme ermittelt wurde.

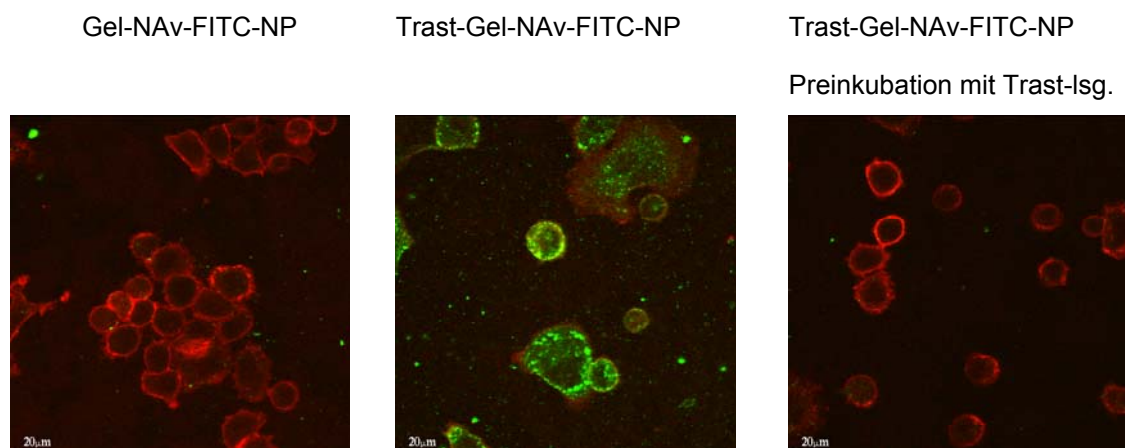
Zusammenfassend kann man anhand dieses Ergebnisses sagen, dass eine deutlich gesteigerte Bindung von antikörperbeladenen Nanopartikeln an die

Zellen gegenüber den unbeladenen zu erkennen ist. Die Affinität des anti-körperbeladenen Trägersystems ist um das 3 - 4-fache gegenüber den anti-körperfreien erhöht. Die überexprimierenden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 binden absolut gesehen, entsprechend ihres höheren Rezeptorstatus auch mehr Nanopartikel. Allerdings geht dies bei den SK-BR-3-Zellen zulasten einer erhöhten unspezifischen Bindungstendenz. Dieses Ergebnis läßt eine Internalisation der Nanopartikel durch eine rezeptorvermittelte Endozytose, wie sie schon für CD3-Gel-Nav-FITC-NP bewiesen wurde, als sehr wahrscheinlich erscheinen.

4.4.3.2.2. Bestimmung der Internalisation mittels CLSM

Als Beweis für eine spezifische Zellaufnahme wurde auch hier wieder zur Kontrolle und in Übereinstimmung mit den Untersuchungen zu den T-Lymphozyten, eine Vorinkubation mit Trastuzumablösung für die überexprimierenden SK-BR-3-Zellen gemacht. Auf den Darstellungen in Abbildung 4-39 sieht man die nach den FACS-Ergebnissen vermutete Zellaufnahme bestätigt. Nach einer 30 Minuten langen Vorbehandlung mit freier Antikörperlösung, die zur Rezeptorabsättigung führt, und anschließender Inkubation mit Gel-NAv-FITC-NP, ist lediglich die rote Zellmembranfärbung zu erkennen. Das selbe Bild ergibt sich nach der alleinigen Zugabe von Gel-NAv-FITC-NP. Im mittleren Bild hingegen sind in allen Zellen, die grün fluoreszierenden anti-körperbeladenen Nanopartikel zu sehen.

Abbildung 4-39: Zellaufnahme und -verteilung von Trast-Gel-NAv-FITC-NP (grün) in SK-Br-3 (Zellmembran rot)



Die spezifische Zellaufnahme wurde auch mit einem Zehntel der eingesetzten Nanopartikelmenge im Vergleich zu den Jurkat-Zellen erfolgreich und gleich effektiv nachvollzogen. Das Ergebnis bestätigt eindrucksvoll die Internalisation des Trägersystems durch rezeptorvermittelte Endozytose in die SK-BR-3-Zellen. Die zuvor gemachten Zellaufnahmestudien in den T-Lymphozyten mittels des anti-CD3-AK sind also in gleicher Weise auch auf den Her2-Rezeptor übertragbar. Die im Rahmen der Arbeit postulierte universelle Einsetzbarkeit des Avidin-Systems für biotinylierte Liganden wurde mit zwei verschiedenen Drug-Targeting-Liganden, die spezifisch für die eingesetzten Zelllinien waren, bewiesen.

4.5. Schlussfolgerung

In den Zellkulturexperimenten zur Untersuchung der spezifischen, rezeptorvermittelten Zellaufnahme wurden erfolgreich Nanopartikel auf Gelatinebasis eingesetzt. Hinsichtlich einer spezifischen Zellaufnahme wurden Gelatine-Nanopartikel mit zwei verschiedenen, biotinylierten Antikörpern beladen. Das Partikelsystem wurde erfolgreich mit anti-CD3 AK konjugiert in Lymphozyten und mit Trastuzumab in Brustkrebszelllinien aufgenommen.

Weiterführende Arbeiten, die ein wirkstoffbeladenes Trägersystem untersuchen, müssen nun folgen. Theoretisch wäre auch eine Bindung des Arzneistoffes über den NeutrAvidin-Biotin-Komplex, neben dem Drug-Targeting-Liganden, möglich. Dieser Ansatz erscheint jedoch nach den bisherigen Ergebnissen nur wenig erfolgversprechend, denn obwohl noch freie Avidin-Taschen auf der Partikeloberfläche nach der Antikörperkopplung übrigbleiben, gibt es bisher keinen Anhaltspunkt, dass eine mengenmäßige Erhöhung der biotinylierten Komponente zu einer gesteigerten Komplexierung führt. Zudem ist damit ein enzymatischer Wirkstoffabbau eher verbunden, als bei einem Einschluss in die Matrix.

5. Zusammenfassung

Um das Potential von modernen Arzneistoffe wie Nukleinsäuren und ihren Analoga, die selbst nur über eine eingeschränkte bis schlechte Zellmembrangängigkeit verfügen, auszunutzen, benötigt man Transportvehikel, die diese Wirkstoffe an ihren Wirkort das Zytosol oder den Zellkern bringen. Bei der Entwicklung zukunftssträchtiger Arzneiformen spielen biokompatible, kolloidale Trägersysteme, die zielgerichtet bestimmte Gewebe / Zellen ansteuern, eine große Rolle. Ihre Aufgabe ist es, ihrer Wirkstofffracht zur Überwindung von Membranen zu verhelfen, wobei sie einen gleichzeitigen Schutz vor enzymatischem Abbau geben, um sie anschließend am Zielort freizusetzen zu können. Zur Erhöhung der Zell- und Gewebeselektivität können die Träger mit diversen Targeting-Liganden bestückt werden. Der Wirkstoff und die Targeting-Liganden können hierbei adsorptiv oder kovalent mit der Matrix verbunden sein. Bei auf adsorptivem Wege gebundenen Komponenten, vor allem wenn sie sich auf der Oberfläche der Trägersysteme befinden, besteht die Gefahr, dass sie vor dem Erreichen des Zielortes desorbiert und / oder degradiert werden und damit ihre Wirkung nicht mehr entfalten können.

Als Trägerstoff können verschiedenste synthetische und natürliche Polymere eingesetzt werden. Zum Einsatz kamen hier die beiden natürlichen Proteine Gelatine und Albumin, die untoxisch, biokompatibel und bioabbaubar sind. Die partikulären Strukturen wurden in einen Desolvatationsprozess durch Lösungsmittelzusatz zu einer wässrigen Proteinlösung gewonnen. Der Nukleinsäureeinchluss erfolgte adsorptiv und kovalent in die Polymermatrix, so dass sie vor dem physiologischen Abbau geschützt sind, oder kovalent an die Oberfläche, wo sie Degradationsmechanismen ausgeliefert sind. Als Drug-Targeting-Liganden wurden die aufgrund ihrer großen Spezifität, Selektivität und Variabilität erfolversprechenden Antikörper eingesetzt. Sie sollen das Vehikel ins Zellinnere leiten, wo der Wirkstoff durch Degradation aus dem Transportsystem freigesetzt wird und anschließend aus dem Endosom entkommen muss, um an den Wirkort zu gelangen.

Durch chemische Oberflächenmodifikationen wurde die Voraussetzung geschaffen, biotinylierte Strukturen kovalent an die Nanopartikel zu binden, so dass ein spezifisches Drug-Targeting-System resultiert. Die kolloidalen, proteinbasierten Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer verschiedenen physikalischen

Eigenschaften analysiert. Neben den Parametern wie Größe, Zetapotential, Morphologie und Stabilität wurde auch die Zelltoxizität untersucht. Das Antikörper-beladene Trägersystem wurde auf seine Funktionalität und Effizienz in der Zellkultur getestet.

Albumin Nanopartikel

Die durch ethanolische Desolvation aus einer wässrigen Proteinlösung ausgefällten Nanopartikel wurden durch Glutaraldehydzusatz stabilisiert. Die Nanopartikelausbeute wurde durch steigende Ethanolmengen verbessert. Bei einem Wasser-zu-Alkoholverhältnis von 1 : 4 wurden 96% der eingesetzten Proteinmenge zu Nanopartikeln umgesetzt. Durch den Grad der Quervernetzung kann die Anzahl der freien Aminogruppen auf der Oberfläche gesteuert werden. Bei molaren Umsetzungsverhältnissen von 40 – 200% bezogen auf die Anzahl der Aminogruppen im Albumin zur Aldehydmenge blieben zwischen 6 und 13 Aminogruppen pro HSA-Molekül ohne Einbuße der physikalischen Stabilität auf der Partikeloberfläche erhalten. Die Menge an zugesetztem Quervernetzer ist weiterhin ausschlaggebend für den späteren enzymatischen Partikelabbau in der Zellkultur.

Zur Schaffung eines universell einsetzbaren Trägersystems wurden durch die Umsetzung mit Trauts Reagenz 6 – 13 reaktive SH-Gruppen pro HSA-Molekül eingeführt. Der Einsatz eines bifunktionalen Crosslinkers schuf die Möglichkeit, ein zweites Protein an die Partikeloberfläche zu binden. Ausgewählt wurde als Protein Avidin, weil es einen sehr stabilen Komplex mit Biotin ausbildet. Man verfügt jetzt über 200 – 350 nm große, negativ geladene und untoxische Trägerpartikel, die mit vielen unterschiedlichen biotinylierten Liganden komplexiert werden können und an unterschiedlichen, relevante Zielstrukturen andocken können. Sie verfügen weiterhin über eine ausreichende Stabilität im Zellkulturmedium.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Oligonukleotid-Beladung der Nanopartikel wurde auf drei verschiedenen Bindungswegen vollzogen. Die Wirkstoffeinbindung erfolgte zum einen adsorptiv über elektrostatische Wechselwirkungen in die Trägermatrix beim partikelformenden Prozess selbst, wobei über den Zeitraum von zwei Monaten eine stabile Inkorporation der intakten

Nukleinsäuresequenz nachgewiesen werden konnte. Die Einführung von Thiolgruppen und die Verbindung mit Avidin über einen bifunktionalen Crosslinker wurden erfolgreich umgesetzt, ohne dass das auf physikalischem Wege gebundene Phosphorothioat heraus diffundiert. Da dieser Bindungstyp aber immer die Gefahr der Desorption im physiologischen Milieu beinhaltet, wurde im folgenden eine kovalente Wirkstoffverknüpfung wieder über einen bifunktionalen Crosslinker entwickelt. Bei der Umsetzung mit dem Spacer wurden 6 – 12 der freien Aminogruppen des Trägermaterials HSA aktiviert. Das verwendete Oligonukleotid wurde zu diesem Zweck mit einer Thiolgruppe versehen. Das lösliche Konjugat wurde wieder durch ethanolische Desolvation zu Nanopartikeln umgesetzt und mit Glutaraldehyd zu 40% quervernetzt. Durch diese Strategie konnte die Wirkstoffeinbindung im Vergleich zur physikalischen Einbindung verdoppelt werden.

Der dritte Ansatz beschreibt die oberflächliche Komplexierung über das Avidin-System mit biotinylierten Phosphorothioaten. Die erreichten Beladungsraten für die inkorporierten und biotinylierten Phosphorothioate waren vergleichbar.

Die Antisense-Testversuche führten, unabhängig von der Art der Wirkstoffbindung, nicht zu einer ausreichenden spezifischen Hemmung des Targetproteins tat. Die fehlende Wirksamkeit kann erklärt werden durch eine ungenügende Oligonukleotidfreisetzung oder durch den vor Erreichen des Zielortes erfolgten Abbau bzw. dem nicht erfolgten Austritt aus dem Endosom. Der eventuell ungenügende oder gar fehlende Übertritt ins Zytosol könnte zukünftig durch den Einsatz sogenannter fusogener Peptide gewährleistet werden.

Gelatine-Nanopartikel

Bei Gelatine handelt es sich im Vergleich zu humanem Serumalbumin um ein sehr viel schlechter definiertes Ausgangsmaterial. Sie kann aus einer Vielzahl von Rohstoffen in unterschiedlicher Zusammensetzung gewonnen werden. Kennzeichnend für das Material sind eine breite Molekulargewichtsverteilung und eine variierende Aminosäurezusammensetzung. Für die Herstellung der Nanopartikel wird daher ein Umweg über ein doppeltes Desolvationsverfahren gemacht. Der Prozess wurde bezüglich des Einflusses den das Desolvationsmittel Aceton auf die Ausbeute hat sowie seiner Auswirkungen auf die

Molekulargewichtsverteilung hin untersucht. Im ersten Desolvationsschritt wurde in Abhängigkeit der zugesetzten Acetonmenge ein deutlicher Einfluss auf das Molekulargewicht beobachtet. Die Abtrennung des niedermolekularen Gelatineanteils wird bei steigenden Acetonmengen schlechter, neben dem Verlust der Trennschärfe nimmt auch die Robustheit der Methode ab. Eine klare Separation in hoch- und niedermolekularer Gelatine wird bei einer Menge von 7,5 mL Acetonzusatz erreicht. Der Zusatz von 10,0 mL stellt einen Kompromiss zwischen einer akzeptablen Ausbeute bei einer ausreichenden Robustheit dar. Die Ausbeute selbst ist in Analogie zu der Herstellung von HSA-NP bei einem Verhältnis von Proteinlösung zu Desolvatationsmittel von 1 : 4 am Besten. Die Nanopartikelausbeute fällt allerdings mit 75% deutlich schlechter aus.

In bezug auf eine effiziente Wirkstofffreisetzung und die Biodegradation des Trägers im Organismus stellt der Quervernetzungsgrad einen wichtigen Parameter dar. Aufgrund der unbekanntenen Aminosäurezusammensetzung kann die Menge an Quervernetzer nicht wie bei Albumin stöchiometrisch berechnet werden. Die Auswirkungen einer unterschiedlich starken Stabilisierung auf die physikalische Stabilität wurden evaluiert. Die im Standardprotokoll verwendeten Glutaraldehydmengen können ohne Einfluss auf die Stabilität und den Partikeldurchmesser auf ein Viertel reduziert werden.

Die Oberflächenmodifikationen wurden analog zu den Umsetzungsbedingungen von HSA-NP durchgeführt. Die Bindungsfähigkeit des NeutrAvidinsTM kann durch den Aufreinigungsprozess, die Kopplung an die Partikeloberfläche, und die Ultraschallbehandlung beeinträchtigt werden. Daher wurde eine Nachweisreaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Biotinderivat etabliert. Von den theoretisch vier Bindungsstellen des NeutrAvidinsTM wurde für 2 – 3 eine Funktionsfähigkeit nachgewiesen. Zur Etablierung eines spezifisches Drug-Targeting-System, wurde der Träger mit zwei verschiedenen biotinylierten Antikörpern ausgestattet. Eingesetzt wurde ein biotinylierter anti-CD3-AK, der von T-Lymphozyten internalisiert wird und ein biotinylierter anti-Her2neu-AK (Trastuzumab). Für die Bestimmung der gebundenen Antikörpermenge wurden zwei Methoden etabliert. Die Ergebnisse lieferten für anti-CD3-AK und Trastuzumab eine vergleichbare Bindungseffizienz von nahezu 100%.

In den anschließenden Zellkulturversuchen konnte eindrucksvoll eine rezeptorvermittelte Zellaufnahme in Lymphozyten und Brustkrebszellen über die an

Gelatine-Nanopartikel gekoppelten, spezifischen Drug-Targeting-Liganden anti-CD3 und Trastuzumab gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte eine antikörpervermittelte Zellaufnahme für Gelatine-Nanopartikel gezeigt werden. Eine Wirkstoffeinbindung wie sie erfolgreich auf verschiedenen Wegen für Albuminnanopartikel (adsorptive oder kovalente Einbindung von Antisense-Oligonukleotidderivaten in die Matrix oder biotinyliert über oberflächlich gebundenes Avidin) gezeigt wurde, steht für die Gelatine-Nanopartikel noch aus. Abschließend ist festzuhalten, dass mit Gelatine-Nanopartikeln bisher die besseren Erfolge hinsichtlich eines spezifischen Drug-Targetings erzielt wurden, aber prinzipiell der Einsatz von Albumin aus verschiedenen Gründen als zukunftssträchtiger anzusehen ist. Albumin weist im Gegensatz zu Gelatine eine definierte Proteinsequenz bzw. -struktur auf und kann rekombinant hergestellt werden. Es verfügt gegenüber vielen Arzneistoffen über gute Adsorptionseigenschaften und als Hauptbestandteil des Blutes interagiert es weniger mit anderen Serumbestandteilen, so dass die Erkennung durch das RES herabgesetzt und die Zirkulation im Körper verlängert ist. Die Herstellung der HSA-Matrix, den unmodifizierten Nanopartikeln, erfolgt in einem einstufigen Herstellungsverfahren, zusätzlich verfügen die Partikel nach der Quervernetzung über eine Eigenfluoreszenz, die eine systemimmanente Detektionsmöglichkeit für FACS- und CLSM-Untersuchungen darstellt.

6. Literatur

1. **Agrawal, S., W. Tan, Q. Cai, X. Xie, and R. Zhang.** 1997. In vivo pharmacokinetics of phosphorothioate oligonucleotides containing contiguous guanosines. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**:245-9.
2. **Akasaka, Y., H. Ueda, K. Takayama, Y. Machida, and T. Nagai.** 1988. Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies. *Drug Des Deliv* **3**:85-97.
3. **Allemann, E., J. C. Leroux, R. Gurny, and E. Doelker.** 1993. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm Res* **10**:1732-7.
4. **Antopolsky, M., E. Azhayeva, U. Tengvall, S. Auriola, I. Jaaskelainen, S. Ronkko, P. Honkakoski, A. Urtti, H. Lonnberg, and A. Azhayev.** 1999. Peptide-oligonucleotide phosphorothioate conjugates with membrane translocation and nuclear localization properties. *Bioconjug Chem* **10**:598-606.
5. **Arnedo, A., S. Espuelas, and J. M. Irache.** 2002. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm* **244**:59-72.
6. **Arnedo, A., J. M. Irache, G. Gonzalez Gaitano, M. Valganon, and S. Espuelas.** 2003. Bovine serum albumin modified the intracellular distribution and improved the antiviral activity of an oligonucleotide. *J Drug Target* **11**:197-204.
7. **Arnedo, A., J. M. Irache, M. Merodio, and M. S. Espuelas Millan.** 2004. Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J Control Release* **94**:217-27.
8. **Bauer K., F. K. H., Führer C.** 1999. Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, vol. 6. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
9. **Bayer, E. A., H. Ben-Hur, and M. Wilchek.** 1986. A sensitive enzyme assay for biotin, avidin, and streptavidin. *Anal Biochem* **154**:367-70.
10. **Bender, A. R., H. von Briesen, J. Kreuter, I. B. Duncan, and H. Ruebsamen-Waigmann.** 1996. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1467-71.
11. **Birrenbach, G., and P. P. Speiser.** 1976. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J Pharm Sci* **65**:1763-6.
12. **Bonen, M. R., A. A. Garcia, and S. A. Hoffman.** 2001. A comparison of silver ion to streptavidin coated microplates. *J Microbiol Methods* **44**:113-20.
13. **Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr.** 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7297-301.
14. **Buschle, M., M. Cotten, H. Kirlappos, K. Mechtler, G. Schaffner, W. Zauner, M. L. Birnstiel, and E. Wagner.** 1995. Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum Gene Ther* **6**:753-61.
15. **Butler, J. E.** 2000. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods* **22**:4-23.
16. **Chen, C. Q., W. Lin, A. G. Coombes, S. S. Davis, and L. Illum.** 1994. Preparation of human serum albumin microspheres by a novel acetone-heat denaturation method. *J Microencapsul* **11**:395-407.
17. **Chen, S. H., M. Qian, J. M. Brennan, and J. M. Gallo.** 1997. Determination of antisense phosphorothioate oligonucleotides and catabolites in biological fluids and tissue extracts using anion-exchange high-performance liquid chromatography and capillary gel electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **692**:43-51.

18. **Cheung, C. Y., N. Murthy, P. S. Stayton, and A. S. Hoffman.** 2001. A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconj Chem* **12**:906-10.
19. **Coester, C., J. Kreuter, H. von Briesen, and K. Langer.** 2000. Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA). *Int J Pharm* **196**:147-9.
20. **Coester, C. J., K. Langer, H. van Briesen, and J. Kreuter.** 2000. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul* **17**:187-93.
21. **Crooke, S. T.** 1992. Oligonucleotide therapy. *Curr Opin Biotechnol* **3**:656-61.
22. **Crosasso, P., P. Brusa, F. Dosio, S. Arpicco, D. Pacchioni, F. Schuber, and L. Cattell.** 1997. Antitumoral activity of liposomes and immunoliposomes containing 5-fluorouridine prodrugs. *J Pharm Sci* **86**:832-9.
23. **de Diesbach, P., F. N'Kuli, C. Berens, E. Sonveaux, M. Monsigny, A. C. Roche, and P. J. Courtoy.** 2002. Receptor-mediated endocytosis of phosphodiester oligonucleotides in the HepG2 cell line: evidence for non-conventional intracellular trafficking. *Nucleic Acids Res* **30**:1512-21.
24. **Dean, N. M., and C. F. Bennett.** 2003. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* **22**:9087-96.
25. **Deas, O., E. Angevin, C. Cherbonnier, A. Senik, B. Charpentier, J. P. Levillain, E. Oosterwijk, F. Hirsch, and A. Durrbach.** 2002. In vivo-targeted gene delivery using antibody-based nonviral vector. *Hum Gene Ther* **13**:1101-14.
26. **Derossi, D., S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, and A. Prochiantz.** 1996. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* **271**:18188-93.
27. **Derossi, D., G. Chassaing, and A. Prochiantz.** 1998. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* **8**:84-7.
28. **Deshpande, D., D. Toledo-Velasquez, D. Thakkar, W. Liang, and Y. Rojanasakul.** 1996. Enhanced cellular uptake of oligonucleotides by EGF receptor-mediated endocytosis in A549 cells. *Pharm Res* **13**:57-61.
29. **Digenis, G. A., T. B. Gold, and V. P. Shah.** 1994. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *J Pharm Sci* **83**:915-921.
30. **Dinauer, N., D. Lochmann, I. Demirhan, A. Bouazzaoui, A. Zimmer, A. Chandra, J. Kreuter, and H. von Briesen.** 2004. Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation. *J Control Release* **96**:497-507.
31. **Dokka, S., D. Toledo-Velasquez, X. Shi, L. Wang, and Y. Rojanasakul.** 1997. Cellular delivery of oligonucleotides by synthetic import peptide carrier. *Pharm Res* **14**:1759-64.
32. **Dosio, F., S. Arpicco, P. Brusa, B. Stella, and L. Cattell.** 2001. Poly(ethylene glycol)-human serum albumin-paclitaxel conjugates: preparation, characterization and pharmacokinetics. *J Control Release* **76**:107-17.
33. **Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky, and J. Barsoum.** 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:664-8.
34. **Fischer, D., T. Bieber, S. Brusselbach, H. Elsasser, and T. Kissel.** 2001. Cationized human serum albumin as a non-viral vector system for gene delivery? Characterization of complex formation with plasmid DNA and transfection efficiency. *Int J Pharm* **225**:97-111.
35. **Foley, G. E., H. Lazarus, S. Farber, B. G. Uzman, B. A. Boone, and R. E. McCarthy.** 1965. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* **18**:522-9.

36. **Furumoto, K., K. Ogawara, S. Nagayama, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, and T. Kimura.** 2002. Important role of serum proteins associated on the surface of particles in their hepatic disposition. *J Control Release* **83**:89-96.
37. **Gallo, J. M., C. T. Hung, and D. G. Perrier.** 1984. Analysis of albumin microsphere preparation. *Int J Pharm* **22**:63-74.
38. **Geselowitz, D. A., and L. M. Neckers.** 1995. Bovine serum albumin is a major oligonucleotide-binding protein found on the surface of cultured cells. *Antisense Res Dev* **5**:213-7.
39. **Gessner, A., R. Waicz, A. Lieske, B. Paulke, K. Mader, and R. H. Muller.** 2000. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm* **196**:245-9.
40. **Getz, E. B., M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, and P. R. Selvin.** 1999. A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem* **273**:73-80.
41. **Glennie, M. J., D. M. Brennand, F. Bryden, H. M. McBride, F. Stirpe, A. T. Worth, and G. T. Stevenson.** 1988. Bispecific F(ab' gamma)2 antibody for the delivery of saporin in the treatment of lymphoma. *J Immunol* **141**:3662-70.
42. **Gruber, H. J., G. Kada, M. Marek, and K. Kaiser.** 1998. Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids. *Biochim Biophys Acta* **1381**:203-12.
43. **Guillem, V. M., M. Tormo, I. Moret, I. Benet, J. Garcia-Conde, A. Crespo, and S. F. Alino.** 2002a. Targeted oligonucleotide delivery in human lymphoma cell lines using a polyethyleneimine based immunopolyplex. *J Control Release* **83**:133-46.
44. **Guillem, V. M., M. Tormo, F. Revert, I. Benet, J. Garcia-Conde, A. Crespo, and S. F. Alino.** 2002b. Polyethyleneimine-based immunopolyplex for targeted gene transfer in human lymphoma cell lines. *J Gene Med* **4**:170-82.
45. **Gupta, P. K., and C. T. Hung.** 1989. Albumin microspheres. I: Physico-chemical characteristics. *J Microencapsul* **6**:427-62.
46. **Habeeb, A. F.** 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem* **14**:328-336.
47. **Han, J. C., and G. Y. Han.** 1994. A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal Biochem* **220**:5-10.
48. **Harashima, H., K. Sakata, K. Funato, and H. Kiwada.** 1994. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm Res* **11**:402-6.
49. **Huang, A., Y. S. Tsao, S. J. Kennel, and L. Huang.** 1982. Characterization of antibody covalently coupled to liposomes. *Biochim Biophys Acta* **716**:140-50.
50. **Huang, H. H.** 1980. Detection and differentiation of cross-link formation in an eucaryotic DNA population. *J Theor Biol* **87**:597-608.
51. **Hughes, J. A., A. I. Aronsohn, A. V. Avrutskaya, and R. L. Juliano.** 1996. Evaluation of adjuvants that enhance the effectiveness of antisense oligodeoxynucleotides. *Pharm Res* **13**:404-10.
52. **Illum, L., and S. S. Davis.** 1984. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Ploxamer 338). *FEBS Lett* **167**:79-82.
53. **Illum, L., P. D. Jones, R. W. Baldwin, and S. S. Davis.** 1984. Tissue distribution of poly(hexyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles coated with monoclonal antibodies in mice bearing human tumor xenografts. *J Pharmacol Exp Ther* **230**:733-6.
54. **Jahrsdorfer, B., R. Jox, L. Muhlenhoff, K. Tschoep, A. Krug, S. Rothenfusser, G. Meinhardt, B. Emmerich, S. Endres, and G. Hartmann.** 2002. Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol* **72**:83-92.

55. **Jansen, B., and U. Zangemeister-Wittke.** 2002. Antisense therapy for cancer—the time of truth. *Lancet Oncol* **3**:672-83.
56. **Jelinkova, M., J. Strohalm, D. Plocova, V. Subr, M. St'astny, K. Ulbrich, and B. Rihova.** 1998. Targeting of human and mouse T-lymphocytes by monoclonal antibody-HPMA copolymer-doxorubicin conjugates directed against different T-cell surface antigens. *J Control Release* **52**:253-70.
57. **Jose, E. S., and B. Alarcon.** 1999. Receptor engagement transiently diverts the T cell receptor heterodimer from a constitutive degradation pathway. *J Biol Chem* **274**:33740-6.
58. **Kada, G., H. Falk, and H. J. Gruber.** 1999a. Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate. *Biochim Biophys Acta* **1427**:33-43.
59. **Kada, G., K. Kaiser, H. Falk, and H. J. Gruber.** 1999b. Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta* **1427**:44-8.
60. **Kaul, G., and M. Amiji.** 2002. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm Res* **19**:1061-7.
61. **Kircheis, R., A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger, and E. Wagner.** 1997. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* **4**:409-18.
62. **Klausner, R. D., J. Lippincott-Schwartz, and J. S. Bonifacino.** 1990. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol* **6**:403-31.
63. **Klegerman, M. E., A. J. Hamilton, S. L. Huang, S. D. Tiukinhoy, A. A. Khan, R. C. MacDonald, and D. D. McPherson.** 2002. Quantitative immunoblot assay for assessment of liposomal antibody conjugation efficiency. *Anal Biochem* **300**:46-52.
64. **Kohler, G., and C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-7.
65. **Koval, M., K. Preiter, C. Adles, P. D. Stahl, and T. H. Steinberg.** 1998. Size of IgG-opsonized particles determines macrophage response during internalization. *Exp Cell Res* **242**:265-73.
66. **Kramer, P. A.** 1974. Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *J Pharm Sci* **63**:1646-1647.
67. **Krangel, M. S.** 1987. Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J Exp Med* **165**:1141-59.
68. **Kreuter, J.** 1994. Colloidal Drug Delivery Systems/ Kapitel 5: Nanopartikel. 219ff.
69. **Kreuter, J.** 1983. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm Acta Helv* **58**:242-50.
70. **Kreuter, J.** 1991. Nanoparticle-based drug delivery systems. *J Control Release* **16**:169-176.
71. **Kreuter, J., and P. P. Speiser.** 1976. New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infect Immun* **13**:204-10.
72. **Kuhn, H., V. V. Demidov, P. E. Nielsen, and M. D. Frank-Kamenetskii.** 1999. An experimental study of mechanism and specificity of peptide nucleic acid (PNA) binding to duplex DNA. *J Mol Biol* **286**:1337-45.
73. **Lackey, C. A., O. W. Press, A. S. Hoffman, and P. S. Stayton.** 2002. A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjug Chem* **13**:996-1001.
74. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
75. **Langer, K., S. Balthasar, V. Vogel, N. Dinauer, H. von Briesen, and D. Schubert.** 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm* **257**:169-80.

76. **Langer, K., C. Coester, C. Weber, H. von Briesen, and J. Kreuter.** 2000. Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *Eur J Pharm Biopharm* **49**:303-7.
77. **Lauritsen, J. P., M. D. Christensen, J. Dietrich, J. Kastrup, N. Odum, and C. Geisler.** 1998. Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J Immunol* **161**:260-7.
78. **Lebedeva, I., L. Benimetskaya, C. A. Stein, and M. Vilenchik.** 2000. Cellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm* **50**:101-19.
79. **Lee, H., T. H. Kim, and T. G. Park.** 2002. A receptor-mediated gene delivery system using streptavidin and biotin-derivatized, pegylated epidermal growth factor. *J Control Release* **83**:109-19.
80. **Leeds, J. M., M. J. Graham, L. Truong, and L. L. Cummins.** 1996. Quantitation of phosphorothioate oligonucleotides in human plasma. *Anal Biochem* **235**:36-43.
81. **Legendre, V., A. Guimezanes, M. Buferne, M. Barad, A. M. Schmitt-Verhulst, and C. Boyer.** 1999. Antigen-induced TCR-CD3 down-modulation does not require CD3delta or CD3gamma cytoplasmic domains, necessary in response to anti-CD3 antibody. *Int Immunol* **11**:1731-8.
82. **Leserman, L. D., J. Barbet, F. Kourilsky, and J. N. Weinstein.** 1980a. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* **288**:602-4.
83. **Leserman, L. D., J. N. Weinstein, R. Blumenthal, and W. D. Terry.** 1980b. Receptor-mediated endocytosis of antibody-opsonized liposomes by tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:4089-93.
84. **Leserman, L. D., J. N. Weinstein, J. J. Moore, and W. D. Terry.** 1980c. Specific interaction of myeloma tumor cells with hapten-bearing liposomes containing methotrexate and carboxyfluorescein. *Cancer Res* **40**:4768-74.
85. **Letourneur, F., and R. D. Klausner.** 1992a. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* **255**:79-82.
86. **Letourneur, F., and R. D. Klausner.** 1992b. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**:1143-57.
87. **Lewis, G. D., I. Figari, B. Fendly, W. L. Wong, P. Carter, C. Gorman, and H. M. Shepard.** 1993. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* **37**:255-63.
88. **Li, Y., Y. Pei, X. Zhang, Z. Gu, Z. Zhou, W. Yuan, J. Zhou, J. Zhu, and X. Gao.** 2001. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release* **71**:203-11.
89. **Lin, W., M. C. Garnett, E. Schacht, S. S. Davis, and L. Illum.** 1999. Preparation and in vitro characterization of HSA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* **189**:161-70.
90. **Liu, H., M. Rhodes, D. L. Wiest, and D. A. Vignali.** 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* **13**:665-75.
91. **Livnah, O., E. A. Bayer, M. Wilchek, and J. L. Sussman.** 1993. The structure of the complex between avidin and the dye, 2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid (HABA). *FEBS Lett* **328**:165-8.
92. **Longo, W. E., and E. P. Goldberg.** 1985. Hydrophilic albumin microspheres. *Methods in Enzym* **112**:18-26.
93. **Longo, W. E., H. Iwata, T. A. Lindheimer, and E. P. Goldberg.** 1982. Preparation of hydrophilic albumin microspheres using polymeric dispersing agents. *J Pharm Sci* **71**:1323-8.
94. **Luton, F., M. Buferne, V. Legendre, E. Chauvet, C. Boyer, and A. M. Schmitt-Verhulst.** 1997. Role of CD3gamma and CD3delta cytoplasmic

- domains in cytolytic T lymphocyte functions and TCR/CD3 down-modulation. *J Immunol* **158**:4162-70.
95. **Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori.** 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**:271-284.
96. **Marty, J. J., R. C. Oppenheim, and P. Speiser.** 1978. Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv* **53**:17-23.
97. **Maruyama, K., T. Takizawa, T. Yuda, S. J. Kennel, L. Huang, and M. Iwatsuru.** 1995. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* **1234**:74-80.
98. **Mastrobattista, E., G. A. Koning, L. Bloois Lv, A. C. Filipe, W. Jiskoot, and G. Storm.** 2002. Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *J Biol Chem* **20**:20.
99. **McKeon, J., M. J. Cho, and M. G. Khaledi.** 2001. Quantitation of intracellular concentration of a delivered morpholino oligomer by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence: correlation with upregulation of luciferase gene expression. *Anal Biochem* **293**:1-7.
100. **Merodio, M., A. Arnedo, M. J. Renedo, and J. M. Irache.** 2001. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur J Pharm Sci* **12**:251-9.
101. **Merodio, M., M. S. Espuelas, M. Mirshahi, A. Arnedo, and J. M. Irache.** 2002. Efficacy of ganciclovir-loaded nanoparticles in human cytomegalovirus (HCMV)-infected cells. *J Drug Target* **10**:231-8.
102. **Mizoue, T., T. Horibe, K. Maruyama, T. Takizawa, M. Iwatsuru, K. Kono, H. Yanagie, and F. Moriyasu.** 2002. Targetability and intracellular delivery of anti-BCG antibody-modified, pH-sensitive fusogenic immunoliposomes to tumor cells. *Int J Pharm* **237**:129-37.
103. **Morimoto, Y., and S. Fujimoto.** 1985. Albumin microspheres as drug carriers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **2**:19-63.
104. **Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
105. **Mukherjee, S., R. N. Ghosh, and F. R. Maxfield.** 1997. Endocytosis. *Physiol Rev* **77**:759-803.
106. **Niedergang, F., A. Dautry-Varsat, and A. Alcover.** 1997a. Peptide antigen or superantigen-induced down-regulation of TCRs involves both stimulated and unstimulated receptors. *J Immunol* **159**:1703-10.
107. **Niedergang, F., E. San Jose, B. Rubin, B. Alarcon, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover.** 1997b. Differential cytosolic tail dependence and intracellular fate of T-cell receptors internalized upon activation with superantigen or phorbol ester. *Res Immunol* **148**:231-45.
108. **Nielsen, P. E., M. Egholm, R. H. Berg, and O. Buchardt.** 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**:1497-500.
109. **Nobs, L., F. Buchegger, R. Gurny, and E. Allemann.** 2003. Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods. *Int J Pharm* **250**:327-37.
110. **O'Neill, M. M., C. A. Kennedy, R. W. Barton, and R. J. Tatake.** 2001. Receptor-mediated gene delivery to human peripheral blood mononuclear cells using anti-CD3 antibody coupled to polyethylenimine. *Gene Ther* **8**:362-8.
111. **Pagnan, G., P. G. Montaldo, F. Pastorino, L. Raffaghello, M. Kirchmeier, T. M. Allen, and M. Ponzoni.** 1999. GD2-mediated melanoma cell targeting and cytotoxicity of liposome-entrapped fenretinide. *Int J Cancer* **81**:268-74.

112. **Pasqualini, R., G. Plassio, and S. Sosi.** 1969. The preparation of albumin microspheres. *J Nucl Biol Med* **13**:80-4.
113. **Pooga, M., U. Soomets, M. Hallbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hokfelt, T. Bartfai, and U. Langel.** 1998. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* **16**:857-61.
114. **Rajur, S. B., C. M. Roth, J. R. Morgan, and M. L. Yarmush.** 1997. Covalent protein-oligonucleotide conjugates for efficient delivery of antisense molecules. *Bioconjug Chem* **8**:935-40.
115. **Rao, S. V., K. W. Anderson, and L. G. Bachas.** 1997. Determination of the extent of protein biotinylation by fluorescence binding assay. *Bioconjug Chem* **8**:94-8.
116. **Reilly, R. M., J. Sandhu, T. M. Alvarez-Diez, S. Gallinger, J. Kirsh, and H. Stern.** 1995. Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. *Clin Pharmacokinet* **28**:126-42.
117. **Renneisen, K., L. Leserman, E. Matthes, H. C. Schroder, and W. E. Muller.** 1990. Inhibition of expression of human immunodeficiency virus-1 in vitro by antibody-targeted liposomes containing antisense RNA to the env region. *J Biol Chem* **265**:16337-42.
118. **Rhaese, S., H. von Briesen, H. Ruebsamen-Waigmann, J. Kreuter, and K. Langer.** 2003. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. *J Control Release* **92**:199-208.
119. **Rhodes, B. A., I. Zolle, J. W. Buchanan, and H. N. Wagner, Jr.** 1969. Radioactive albumin microspheres for studies of the pulmonary circulation. *Radiology* **92**:1453-60.
120. **Rolland, A., D. Bourel, B. Genetet, and R. Le Verge.** 1987. Monoclonal antibodies covalently coupled to polymethacrylic nanoparticles: in vitro specific targeting to human T lymphocytes. *Int J Pharm* **39**:173-180.
121. **Rolland, A., G. Merdrignac, J. Gouranton, D. Bourel, R. Le Verge, and B. Genetet.** 1987. Flow cytometric quantitative evaluation of phagocytosis by human mononuclear and polymorphonuclear cells using fluorescent nanoparticles. *J Immunol Methods* **96**:185-93.
122. **Roser, M., and T. Kissel.** 1993. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. *Eur J Biopharm* **39**:8-12.
123. **Roth, T. F., and K. R. Porter.** 1964. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *J Cell Biol* **20**:313-32.
124. **Sato, Y., K. Kaneko, K. Mikami, M. Mizugaki, and Y. Suzuki.** 1999. Isolation of bovine serum albumin fragment P-9 and P-9-mediated fusion of small unilamellar vesicles. *Biol Pharm Bull* **22**:1360-5.
125. **Schaffar, L., A. Dallanegra, J. P. Breittmayer, S. Carrel, and M. Fehlmann.** 1988. Monoclonal antibody internalization and degradation during modulation of the CD3/T-cell receptor complex. *Cell Immunol* **116**:52-9.
126. **Schlingensiepen R.W., B. e. a.** 1997. Antisense-From technology to therapy-Lab manual and textbook, vol. 6. Blackwell Science.
127. **Schmajuk, G., H. Sierakowska, and R. Kole.** 1999. Antisense oligonucleotides with different backbones. Modification of splicing pathways and efficacy of uptake. *J Biol Chem* **274**:21783-9.
128. **Schneider, U., H. U. Schwenk, and G. Bornkamm.** 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **19**:621-6.
129. **Shaw, J. P., K. Kent, J. Bird, J. Fishback, and B. Froehler.** 1991. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Res* **19**:747-50.
130. **Shen, D. F., A. Huang, and L. Huang.** 1982. An improved method for covalent attachment of antibody to liposomes. *Biochim Biophys Acta* **689**:31-7.

131. **Singh, D., R. Kiarash, K. Kawamura, E. C. LaCasse, and J. Garipey.** 1998. Penetration and intracellular routing of nucleus-directed peptide-based shuttles (oligomers) in eukaryotic cells. *Biochem* **37**:5798-809.
132. **Smirnov, V. N., S. P. Domogatsky, V. V. Dolgov, V. B. Hvatov, A. L. Klibanov, V. E. Koteliansky, V. R. Muzykantov, V. S. Repin, G. P. Samokhin, B. V. Shekhonin, and et al.** 1986. Carrier-directed targeting of liposomes and erythrocytes to denuded areas of vessel wall. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:6603-7.
133. **Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan.** 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**:1409-16.
134. **Srinivasan, S. K., H. K. Tewary, and P. L. Iversen.** 1995. Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res Dev* **5**:131-9.
135. **Stayton, P. S., A. S. Hoffman, N. Murthy, C. Lackey, C. Cheung, P. Tan, L. A. Klumb, A. Chilkoti, F. S. Wilbur, and O. W. Press.** 2000. Molecular engineering of proteins and polymers for targeting and intracellular delivery of therapeutics. *J Control Release* **65**:203-20.
136. **Stolnik, S., B. Daudali, A. Arien, J. Whetstone, C. R. Heald, M. C. Garnett, S. S. Davis, and L. Illum.** 2001a. The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers. *Biochim Biophys Acta* **1514**:261-79.
137. **Stolnik, S., C. R. Heald, J. Neal, M. C. Garnett, S. S. Davis, L. Illum, S. C. Purkis, R. J. Barlow, and P. R. Gellert.** 2001b. Polylactide-poly(ethylene glycol) micellar-like particles as potential drug carriers: production, colloidal properties and biological performance. *J Drug Target* **9**:361-78.
138. **Tachibana, R., H. Harashima, M. Shono, M. Azumano, M. Niwa, S. Futaki, and H. Kiwada.** 1998. Intracellular regulation of macromolecules using pH-sensitive liposomes and nuclear localization signal: qualitative and quantitative evaluation of intracellular trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* **251**:538-44.
139. **Tazzari, P. L., L. Polito, A. Bolognesi, M. P. Pistillo, P. Capanni, G. L. Palmisano, R. M. Lemoli, A. Curti, L. Biancone, G. Camussi, R. Conte, G. B. Ferrara, and F. Stirpe.** 2001. Immunotoxins containing recombinant anti-CTLA-4 single-chain fragment variable antibodies and saporin: in vitro results and in vivo effects in an acute rejection model. *J Immunol* **167**:4222-4229.
140. **Thomas, M., I. W. Kellaway, and B. E. Jones.** 1992. A study by photon correlation spectroscopy of the influence of gelatin source, ionic strength and temperature on the gelation process. *Int J Pharm* **83**:139-45.
141. **Torchilin, V. P.** 2000. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* **11 Suppl 2**:S81-91.
142. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
143. **Trubetskaya, O. V., V. S. Trubetskoy, S. P. Domogatsky, A. V. Rudin, N. V. Popov, S. M. Danilov, M. N. Nikolayeva, A. L. Klibanov, and V. P. Torchilin.** 1988. Monoclonal antibody to human endothelial cell surface internalization and liposome delivery in cell culture. *FEBS Lett* **228**:131-4.
144. **Truong-Le, V. L., S. M. Walsh, E. Schweibert, H. Q. Mao, W. B. Guggino, J. T. August, and K. W. Leong.** 1999. Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. *Arch Biochem Biophys* **361**:47-56.
145. **Turner, C., N. Weir, C. Catterall, T. S. Baker, B. Carrington, and M. N. Jones.** 2002. The transfection of Jurkat T-leukemic cells by the use of pH-sensitive immunoliposomes. *J Liposome Res* **12**:311-34.
146. **v Essen, M., C. Menne, B. L. Nielsen, J. P. Lauritsen, J. Dietrich, P. S. Andersen, K. Karjalainen, N. Odum, and C. Geisler.** 2002. The CD3 gamma

- leucine-based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down-regulation. *J Immunol* **168**:4519-23.
147. **Vaerman, J. L., P. Moureau, F. Deldime, P. Lewalle, C. Lammineur, F. Morschhauser, and P. Martiat.** 1997. Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides. *Blood* **90**:331-9.
 148. **Valimaa, L., K. Pettersson, M. Vehniainen, M. Karp, and T. Lovgren.** 2003. A high-capacity streptavidin-coated microtitration plate. *Bioconjug Chem* **14**:103-11.
 149. **Vezi, W. R., and A. T. Florence.** 1980. In vitro heterogeneous degradation of poly(n-alkyl alpha-cyanoacrylates). *J Biomed Mater Res* **14**:93-106.
 150. **Vitetta, E. S., K. A. Krolick, M. Miyama-Inaba, W. Cushley, and J. W. Uhr.** 1983. Immunotoxins: a new approach to cancer therapy. *Science* **219**:644-50.
 151. **Vives, E., P. Brodin, and B. Lebleu.** 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **272**:16010-7.
 152. **Wagner, E.** 1999. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **38**:279-289.
 153. **Walder, R. Y., and J. A. Walder.** 1988. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5011-5.
 154. **Wartlick, H., B. Spankuch-Schmitt, K. Strebhardt, J. Kreuter, and K. Langer.** 2004. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J Control Release* **96**:483-95.
 155. **Weber, C.** 2001. Entwicklung und Charakterisierung nanopartikulärer Arzneiträgersysteme auf Proteinbasis.
 156. **Weber, C., C. Coester, J. Kreuter, and K. Langer.** 2000a. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm* **194**:91-102.
 157. **Weber, C., S. Reiss, and K. Langer.** 2000b. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. *Int J Pharm* **211**:67-78.
 158. **Weiner, G. J.** 2000. The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* **68**:455-63.
 159. **Weinstein, J. N., R. L. Magin, M. B. Yatvin, and D. S. Zaharko.** 1979. Liposomes and local hyperthermia: selective delivery of methotrexate to heated tumors. *Science* **204**:188-91.
 160. **Weissig, V., K. R. Whiteman, and V. P. Torchilin.** 1998. Accumulation of protein-loaded long-circulating micelles and liposomes in subcutaneous Lewis lung carcinoma in mice. *Pharm Res* **15**:1552-6.
 161. **Wickham, T. J., G. M. Lee, J. A. Titus, G. Sconocchia, T. Bakacs, I. Kovesdi, and D. M. Segal.** 1997. Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *J Virol* **71**:7663-9.
 162. **Widder, K. J., and A. E. Senyei.** 1983. Magnetic microspheres: a vehicle for selective targeting of drugs. *Pharmacol Ther* **20**:377-95.
 163. **Williams, A. S., J. P. Camilleri, R. M. Goodfellow, and B. D. Williams.** 1996. A single intra-articular injection of liposomally conjugated methotrexate suppresses joint inflammation in rat antigen-induced arthritis. *Br J Rheumatol* **35**:719-24.
 164. **Wojda, U., and J. L. Miller.** 2000. Targeted transfer of polyethylenimine-avidin-DNA bioconjugates to hematopoietic cells using biotinylated monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* **89**:674-81.
 165. **Zamecnik, P. C., and M. L. Stephenson.** 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:280-4.

166. **Zauner, W., N. A. Farrow, and A. M. Haines.** 2001. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release* **71**:39-51.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Sabine Balthasar
Adresse Feldbergstrasse 17
65779 Kelkheim
Geburtsdatum 17. November 1969 in Düsseldorf

Schulbildung

1976-1980 Grundschule in Düsseldorf
1980-1989 Suitbertus Gymnasium in Düsseldorf

Berufsausbildung

10 / 1989-09 / 1991 PTA Schule in Duisburg
10/ 1991-03 / 1992 Praktikum in der Krankenhausapotheke des
Universitätsklinikums in Düsseldorf
02. April 1992 Abschlussprüfung zur pharmazeutisch technischen
Assistentin

Berufstätigkeit

04 / 1992-09 / 1992 PTA in der Swidbert Apotheke in Düsseldorf

Studium

10 / 1992-04 / 1997 Pharmazie an der Goethe Universität in Frankfurt
als PTA in der Sonnenring Apotheke in Frankfurt
Praktikum
05 / 1997-10 / 1997 STADA GmbH, Research & Development in Bad
Vilbel
11 / 1997-04 / 1998 Konstabler Apotheke in Frankfurt
27. Mai 1998 Erteilung der Approbation

Berufstätigkeit

06 / 1998-03 / 2004 als Apothekerin in der Dreilinden Apotheke in Bad Soden

10 / 2000-03 / 2004 Doktorandin im Institut für pharmazeutische Technologie an der Goethe Universität in Frankfurt