

# Entwicklung und Charakterisierung nanopartikulärer Arzneiträgersysteme auf Proteinbasis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von

Carolin Helene Sigrig Weber  
(Langenhagen/Hannover)

Frankfurt am Main, 2001

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Kreuter

2. Gutachter: PD. Dr. A. Zimmer

Datum der Disputation: 5. Juni 2001

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main erstellt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, unter seiner Anleitung meine Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Klaus Langer, der durch den Aufbau der Arbeitsgruppe zur Entwicklung proteinbasierter Arzneiträgersysteme und die Auswahl meines Dissertationsthemas die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte. Neben seiner umfassenden wissenschaftlichen Betreuung unterstützte er mich stets durch Hilfestellung in allen wissenschaftlichen und technischen Belangen sowie durch ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte auch ganz herzlich den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Herrn Martin Michaelis, Frau Stephanie Reiss, Herrn Conrad Coester und Frau Sabine Balthasar für die gute Zusammenarbeit und ihre Unterstützung meiner Forschungsarbeiten durch wertvolle Anregungen, ihre stete Ansprechbarkeit, Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei der Lösung von Problemen.

Frau Stephanie Reiss möchte ich insbesondere für die Durchführung der MTT-Tests, der Probenbereitung für CLSM-Untersuchungen sowie der Unterstützung bei der Durchführung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und CLSM-Untersuchungen ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Martin Michaelis für die Vermittlung der Antigenitäts- und Toxizitätsuntersuchungen am Institute of Animal Physiology and Genetic an der Academy of Science of the Czech Republic in Libichov.

Herrn Dr. Hagen von Briesen, Frau Karin Becker und Herrn Norbert Dinauer danke ich herzlich für die Durchführung der Zellkulturexperimente am Georg-Speyer Haus in

Frankfurt, und damit für die wertvolle Hilfestellung bei der Testung und Weiterentwicklung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Trägersystems. Danken möchte ich in diesem Zusammenhang auch Herrn Christoph Königs für die Durchführung der FACS-Analysen, die zur Auswertung der Zellkulturexperimente herangezogen wurden.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Josef Matousek für die In-vivo-Testung des entwickelten Trägersystems auf Antigenität und Toxizität am Institute of Animal Physiology and Genetic an der Academy of Science of the Czech Republic in Libichov.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Technologie für die erfolgreiche wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der studentischen Praktika bedanken.

Schließlich möchte ich auch ganz herzlich bei meiner Familie für die finanzielle und moralische Unterstützung während der Promotionszeit sowie für ihre tatkräftige Hilfe bei der Fertigstellung meiner Arbeit danken.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Nanopartikel	3
2.1.1	Definition	3
2.1.2	Allgemeines	3
2.1.3	Körperverteilung	5
2.1.4	Ausgangsmaterialien	6
2.2	Proteinbasierte Nanopartikel	7
2.2.1	Ausgangsmaterialien für proteinbasierte Nanopartikel	8
2.2.1.1	Humanes Serumalbumin (HSA)	8
2.2.1.2	Gelatine	12
2.2.2	Herstellungsmethoden proteinbasierter Nanopartikel	13
2.2.2.1	Herstellung in Zweiphasensystemen	13
2.2.2.2	Herstellung durch Desolvatation	15
2.3	Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln	17
2.3.1	Ziel der Oberflächenmodifikation	17
2.3.2	Oberflächenmodifikation bei Acrylat-Nanopartikeln	18
2.3.3	Oberflächenaktivierung proteinbasierter Nanopartikel durch Einführung bzw. Aktivierung funktioneller Gruppen	19
2.3.3.1	Bildung von Säureamidbindungen	20
2.3.3.2	Bildung von Esterbindungen	23
2.3.3.3	Einführung oberflächenständiger Aldehydgruppen	24
2.3.3.4	Einführung von Carboxylgruppen	25
2.3.3.5	Einführung chelatisierender kovalent gebundener Gruppen	25
2.3.3.6	Modifikation mit Bromoacetylbromid	26

2.3.4 Oberflächenaktivierung proteinbasierter Nanopartikel durch Einführung von Spacern	27
2.3.4.1 Aminoreaktive Gruppen	28
2.3.4.2 SH-selektive Gruppen	31
2.3.5 Weitere Möglichkeiten der Arzneistoffkopplung/Proteinkonjugation	33
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1 Evaluierung der Herstellungsmethode und Charakterisierung der resultierenden Nanopartikel	35
3.1.1 Herstellung von Protein-Nanopartikeln	35
3.1.1.1 Chemikalien und Geräte	35
3.1.1.2 Herstellung von HSA-Nanopartikeln	35
3.1.1.3 Herstellung von Gelatine A-Nanopartikeln	36
3.1.1.4 Herstellung von Gelatine B-Nanopartikeln	36
3.1.1.5 Waschen der Nanopartikel	36
3.1.2 Physikalische Charakterisierung der Nanopartikel	37
3.1.2.1 Geräte	37
3.1.2.2 Bestimmung des Nanopartikelgehaltes	37
3.1.2.3 Bestimmung der Partikelgröße	37
3.1.2.4 Bestimmung des Zetapotentials	38
3.1.2.5 Bestimmung der Partikeldichte	38
3.1.3 Evaluierung des Desolvationsprozesses von HSA	39
3.1.3.1 Chemikalien und Geräte	39
3.1.3.2 Desolvation von HSA mit verschiedenen Ethanolvolumina	39
3.1.3.3 Desolvation bei verschiedenen Temperaturen	40
3.1.3.4 Bestimmung des Anteils an gelöstem nichtdesolvatisierten HSA nach der Desolvation	40
3.1.4 Evaluierung der Quervernetzung	40
3.1.4.1 Chemikalien und Geräte	40
3.1.4.2 Bestimmung freier Aminogruppen an der Partikeloberfläche	41
3.1.4.3 Quervernetzung der HSA-Nanopartikel	41
3.1.4.4 Quervernetzung der Gelatine-Nanopartikel	42
3.1.5 Quantitative Bestimmung der Carboxylgruppen	43

3.1.5.1	Chemikalien und Geräte	43
3.1.5.2	Bindung von Norephedrin	44
3.1.5.3	Bindung von Glycinmethylester	44
3.1.5.4	Bestimmung von Sulfo-NHS-Estern (N-Hydroxysulfosuccinimidester)	45
3.1.5.5	Bindung von Cystamin	46
3.2	Einführung von Sulfhydrylgruppen an die HSA-Nanopartikeloberfläche	46
3.2.1	Bestimmung reaktiver Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche	46
3.2.1.1	Chemikalien und Geräte	46
3.2.1.2	Quantitative Bestimmung	46
3.2.2	Einführung von Thiolgruppen durch Reduktion von Disulfidbrücken	47
3.2.2.1	Chemikalien und Geräte	47
3.2.2.2	Einführung von Sulfhydrylgruppen mit Clelands Reagenz	47
3.2.2.3	Evaluierung der DTT-Konzentration	47
3.2.2.4	Beendigung der Clelands Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten	48
3.2.2.5	Standardvorschrift	48
3.2.3	Quenchen freier Glutaraldehydgruppen	48
3.2.3.1	Chemikalien und Geräte	48
3.2.3.2	Mit L-Cystein	48
3.2.3.3	Mit Cystamin	49
3.2.4	Modifikation der Carboxylgruppen	50
3.2.4.1	Chemikalien und Geräte	50
3.2.4.2	Kopplung von Cystamin mit EDC	50
3.2.4.3	Kopplung von L-Cystein mit EDC	51
3.2.5	Modifikation der Aminogruppen mit Trauts Reagenz	52
3.2.5.1	Chemikalien und Geräte	52
3.2.5.2	Evaluierung der 2-Iminothiolankonzentration	52
3.2.5.3	Evaluierung der Reaktionszeit	52
3.2.5.4	Standardvorschrift	52
3.2.6	Untersuchung der Lagerstabilität der eingeführten Sulfhydrylgruppen	53
3.2.7	Untersuchung der Cytotoxizität mit MTT-Test	53
3.2.7.1	Chemikalien und Geräte	53
3.2.7.2	Durchführung	53
3.2.8	Mukoadhäsion der SH-modifizierten Nanopartikel	54

3.2.8.1	Chemikalien und Geräte	54
3.2.8.2	Durchführung	54
3.3	Veränderung der Oberflächenladung	55
3.3.1	Herstellung positiv geladener Nanopartikel	55
3.3.1.1	Chemikalien	55
3.3.1.2	Modifikation mit EDC	55
3.3.1.3	Modifikation mit EDC und Cholamin	56
3.3.1.4	Modifikation mit EDC und Cystamin	56
3.3.1.5	Umsetzung mit EDC und Cystamin bzw. PEG 400 für Zellkulturexperimente	57
3.3.2	Maskierung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche	57
3.3.2.1	Chemikalien	57
3.3.2.2	Umsetzung mit Acetanhydrid	57
3.3.2.3	Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid	58
3.3.2.4	Umsetzung mit DTPA-Anhydrid	58
3.3.2.5	Umsetzung mit Jodessigsäure	58
3.4	Bindung verschiedener (funktioneller) Proteine an die Partikeloberfläche	59
3.4.1	Evaluierung der Bindung von Modellproteinen mit Sulfo-MBS	59
3.4.1.1	Chemikalien und Geräte	59
3.4.1.2	Analyse der Bindungsrate	60
3.4.1.3	Bindung von HSA als Modellprotein mit Sulfo-MBS	61
3.4.1.4	Bindung von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht	64
3.4.2	Bindung von HSA mit verschiedenen Crosslinkern	65
3.4.2.1	Chemikalien und Geräte	65
3.4.2.2	Bindung von HSA mit Sulfo-SMCC und Sulfo-MBS	66
3.4.2.3	Bindung von HSA mit DTSSP	66
3.4.2.4	Bindung von HSA mit DTBP	67
3.4.2.5	Bindung von HSA mit SAND	67
3.4.3	Bindung von Enzymen	67
3.4.3.1	Chemikalien und Geräte	67
3.4.3.2	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase	68
3.4.3.3	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der $\beta$ -Galaktosidase	68
3.4.3.4	Bindung der alkalischen Phosphatase (Verschnitt) mit Sulfo-MBS an HSA-Nanopartikel	69
3.4.3.5	Bindung der reinen alkalischen Phosphatase	69



---

3.4.3.6	Bindung der $\beta$ -Galaktosidase	70
3.4.4	Bindung von Antikörpern	71
3.4.4.1	Chemikalien und Geräte	71
3.4.4.2	Bindung der Antikörper über Biotin-Avidin-Bindung	72
3.4.4.3	Antigentitätstest	73
3.4.4.4	Zellkulturexperimente	73
3.4.4.5	Adhäsionsversuche mit oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln	76
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Evaluierung der Herstellungsmethode von HSA-Nanopartikeln und Charakterisierung des resultierenden partikulären Systems	77
4.1.1	Evaluierung des Desolvatationsprozesses von HSA-Nanopartikeln	77
4.1.1.1	Die BCA-Reaktion	78
4.1.1.2	Der Anteil an nichtdesolvatisiertem HSA im Desolvatationsmedium	79
4.1.1.3	Einfluß des Ethanolvolumens auf die Partikelgröße und die Partikelanzahl	80
4.1.1.4	Thermodynamische Kontrolle der Desolvatation	82
4.1.2	Evaluierung der Quervernetzung von HSA-Nanopartikeln	83
4.1.2.1	Bestimmung der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche	84
4.1.2.2	Aufreinigung der Nanopartikel	88
4.1.2.3	Quervernetzung der Nanopartikel mit Glutaraldehyd	89
4.1.2.4	Stabilisierung der HSA-Nanopartikel durch Hitzedenaturierung	96
4.1.2.5	Evaluierung der Quervernetzung von Gelatine-Nanopartikeln - ein Vergleich	100
4.1.3	Physikalische Parameter der HSA-Nanopartikel	104
4.1.3.1	Größe und Zetapotential	104
4.1.3.2	Partikeldichte	105
4.1.4	Bestimmung funktioneller Gruppen an der HSA-Nanopartikeloberfläche	106
4.1.4.1	Bestimmung der Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche	106
4.1.4.2	Bestimmung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche	109
4.2	Einführung von Sulfhydrylgruppen an die Oberfläche von HSA-Nanopartikeln	110
4.2.1	Bestimmung der reaktiven Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche	110
4.2.2	Einführung von Thiolgruppen durch Reduktion von Disulfidbrücken	112
4.2.2.1	Evaluierung der DTT-Konzentration	113

4.2.2.2	Beendigung der Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten	114
4.2.3	Quenching freier Glutaraldehydgruppen	115
4.2.3.1	Quenching mit L-Cystein	116
4.2.3.2	Quenching mit Cystamin	117
4.2.4	Modifikation der Carboxylgruppen	119
4.2.4.1	Kopplung von Cystamin mit EDC	120
4.2.4.2	Kopplung von L-Cystein mit EDC	124
4.2.5	Modifikation der Aminogruppen mit Trauts Reagenz	125
4.2.5.1	Evaluierung der Reaktionszeit	127
4.2.5.2	Evaluierung der 2-Iminothiolankonzentration	128
4.2.6	Einfluß der SH-Modifikation auf Partikelgröße und Zetapotential	129
4.2.7	Stabilität der SH-modifizierten Nanopartikel in verschiedenen Medien	130
4.2.8	Untersuchung der Lagerstabilität der eingeführten Sulfhydrylgruppen	131
4.2.9	Untersuchung der Zytotoxizität mit MTT-Test	135
4.2.9.1	Der MTT-Test	135
4.2.9.2	Zellviabilität SH-modifizierter HSA-Nanopartikel	135
4.2.10	Mukoadhäsion der SH-modifizierten HSA-Nanopartikel	136
4.2.10.1	Mucin	137
4.2.10.2	Ergebnis der Mucinbindung	138
4.2.11	Vergleich der verschiedenen Methoden zur SH-Gruppeneinführung	138
4.3	Einführung funktioneller Gruppen zur Modifikation der Oberflächenladung	140
4.3.1	Herstellung von Nanopartikeln mit positivem Zetapotential	140
4.3.1.1	Modifikation von HSA-Nanopartikeln mit EDC	141
4.3.1.2	Modifikation von HSA-Nanopartikeln mit EDC und Cystamin bzw. EDC und Cholamin	141
4.3.1.3	Modifikation von Gelatine-Nanopartikeln mit EDC und Cholamin	143
4.3.1.4	Modifikation von HSA-Nanopartikeln mit EDC und PEG 400	143
4.3.2	Maskierung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche	144
4.3.3	Einfluß der Oberflächenmodifikation auf die Zelladhäsion	147
4.3.3.1	Screening verschieden oberflächenmodifizierter HSA-Nanopartikel	148
4.3.3.2	Jodessigsäure-modifizierte HSA-Nanopartikel	151

4.4	Bindung funktioneller Proteine an die Partikeloberfläche	155
4.4.1	Evaluierung der Sulfo-MBS-Bindung von Modellproteinen	155
4.4.1.1	Evaluierung der größenausschlußchromatographischen Aufreinigung aktivierter Proteine am Beispiel des HSAs	156
4.4.1.2	Bindung von HSA als Modellprotein	157
4.4.1.3	Bindung von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht	166
4.4.2	Bindung von HSA mit verschiedenen Crosslinkern	167
4.4.3	Bindung von Enzymen	169
4.4.3.1	Bindung der alkalischen Phosphatase (Verschnitt)	170
4.4.3.2	Bindung der reinen alkalischen Phosphatase	172
4.4.3.3	Bindung der $\beta$ -Galaktosidase	174
4.4.4	Bindung von biotinylierten Antikörpern an Avidin-konjugierte Nanopartikel	175
4.4.4.1	Die Biotin-Avidin-Bindung	176
4.4.4.2	Bindung des Fluorescein-NeutrAvidins™ (FNA)	178
4.4.4.3	Targeting primärer, humaner Lymphozyten	178
4.4.4.4	Antigenitäts- und Toxizitätsuntersuchungen	184
4.5	Schlußfolgerung	185
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>187</b>
5.1	Evaluierung des Herstellungsprozesses und Charakterisierung des resultierenden partikulären Systems	187
5.2	Einführung von Sulfhydrylgruppen an die Partikeloberfläche	188
5.3	Oberflächenmodifikationen	189
5.4	Bindung funktioneller Proteine	189
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>191</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>209</b>



## Verwendete Abkürzungen

CLSM	Confocal laser scanning microscopy
DMEM	Dulbeco's modified eagle's medium
DTBP	Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat x HCl
DTSSP	3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat]
DTT	Dithiotreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FNA	Fluorescein-NeutrAvidin™
GA	Glutaraldehyd
GPC	Gelpermeationschromatographie
HSA	Humanes Serumalbumin
JE	Jodessigsäure
NP	Nanopartikel
MPS	Mononukleäres Phagozytierendes System
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PBS	Phosphate buffered saline
RT	Raumtemperatur
SAND	Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'- dithiopropionat
S.D.	Standardabweichung
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
Sulfo-MBS	Sulfo-m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
Sulfo-SMCC	Sulfo-Succinimidyl-4-N-maleimidomethyl-cyclohexan-1-carboxylat
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure



# 1 Einleitung

Drug-Targeting ist seit vielen Jahren eines der Hauptarbeitsfelder auf dem Gebiet der Arzneiträgerentwicklung. Bereits Paul Ehrlich strebte mit seinen "magic bullets" nach diesem Ziel. Zahlreiche Strategien zur Lösung dieses Problems wurden verfolgt, angefangen von löslichen Konjugaten bis hin zu kolloidalen Trägersystemen, zu denen neben den Liposomen und Nanosuspensionen auch die Nanopartikel gezählt werden.

Aus diesem Grund haben Nanopartikel im Laufe der letzten Jahrzehnte zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sie eine Modifikation der Körperverteilung von Arzneistoffen und damit ein Drug-Targeting ermöglichen (Kreuter 1983a, b). Daneben führen sie zu einer verbesserten zellulären Aufnahme vieler Arzneistoffe (Schäfer et al. 1994) und reduzieren toxische Nebenreaktionen im Vergleich zum ungebundenen Wirkstoff wie beispielsweise bei der Applikation von Methotrexat (Narayani and Rao 1993). Doch auch die Entwicklung löslicher Trägersysteme aus der Verknüpfung von löslichen Proteinen wie dem humanen Serumalbumin oder von Antikörpern mit einem Arzneistoff wie beispielsweise Doxorubicin (Sezaki and Hashida 1984, Kratz et al. 1999, DeFeo-Jones et al. 2000) zeigte gute Erfolge hinsichtlich des Targetings.

Proteinbasierte Nanopartikel vereinigen nun die Vorteile der kolloidalen partikulären Trägersysteme mit den Vorteilen der löslichen Protein-Arzneistoff-Konjugate. Sie sind außerdem biodegradierbar und nach bisherigen Erfahrungen nicht antigen (Rubino et al. 1993), sowie einfach und kontrollierbar herzustellen (MacAdam et al. 1997). Die definierte Struktur prädestiniert humanes Serumalbumin als Ausgangsmaterial für die Entwicklung eines proteinbasierten Trägersystems. Vielfältige Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation und damit der kovalenten Arzneistoffbindung an diese Partikelsysteme sind aufgrund der Proteinstruktur gegeben.

Die Arzneistoffbeladung kolloidaler Trägersysteme kann durch Einschluß des Wirkstoffs in die Partikelmatrix, aber auch durch Adsorption oder kovalente Bindung an die Partikeloberfläche erfolgen (Kreuter 1994). Bei der Bindung von Steuersubstanzen für das Drug-Targeting, wie beispielsweise Lektinen oder Antikörpern (Douglas et al. 1987), bieten sich lediglich die Möglichkeiten der

Adsorption und der kovalenten Bindung. Doch zeigten die Resultate vergangener Experimente die Ineffizienz adsorptiver Beladung, da die Substanz durch Bestandteile des Zellkulturmediums oder des Plasmas wieder von der Partikeloberfläche verdrängt wurde und somit ein effektives Targeting nicht möglich war (Illum et al. 1983, Langer et al. 1997). Dementsprechend erzielten Irache et al. (1994) durch die kovalente Bindung von Lektinen an die Partikel effektiveres Targeting als durch eine adsorptive Bindung. Aus diesen Gründen erscheint die kovalente Bindung solcher Strukturen an die Partikeloberfläche am erfolgversprechendsten, Erhalt der Funktionalität bei der kovalenten Bindung vorausgesetzt.

Bis heute fehlt jedoch eine systematische Charakterisierung dieser proteinbasierten Nanopartikel und der Modifikationsmöglichkeiten der Partikeloberfläche, die eine kovalente Verknüpfung anderer, möglicherweise peptidischer Strukturen ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Herstellungsprozeß von Nanopartikeln aus humanem Serumalbumin evaluiert sowie verfügbare funktionelle Gruppen an der Partikeloberfläche quantifiziert werden. Durch die Einführung von Thiolgruppen mit Hilfe verschiedener Methoden soll die Bindung von Proteinen wie Enzymen oder Antikörpern mit bifunktionalen Crosslinkern an die Oberfläche des Partikelsystems unter Erhalt der Funktionalität der gebundenen Proteine ermöglicht werden. Durch die Bindung von Antikörpern soll eine spezifische Zellbindung, also ein Drug-Targeting, erreicht werden.



## **2 Theoretischer Teil**

### **2.1 Nanopartikel**

#### **2.1.1 Definition**

Nanopartikel sind feste, kolloide Teilchen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 1000 nm, die als Trägersysteme für Arzneistoffe oder Impfstoffe verwendet werden können (Kreuter 1983a, Allémann et al. 1993, Kreuter 1994). Sie bestehen aus Makromolekülen, in denen unter Umständen ein Wirkstoff oder ein anderes biologisch aktives Material eingeschlossen, verkapselt oder gelöst sein kann, oder an die dieser Stoff adsorptiv oder kovalent gebunden wurde (Kreuter 1991, 1994). Zu den Nanopartikeln werden neben den Nanopellets auch die Nanokapseln und manchmal als Mikrosphären bezeichnete Partikel mit einem Durchmesser unter 1µm gezählt (Birrenbach and Speiser 1976).

#### **2.1.2 Allgemeines**

In den 40iger Jahren wurden erstmals Mikroaggregate und Mikropartikel zur Diagnose am Menschen verwendet, insbesondere zur Diagnose von Fehlfunktionen der Organe und der Messung des Blutflusses. 1956 wurden die ersten biodegradierbaren Mikropartikel entwickelt. Es handelte sich hierbei um Albumin-Mikroaggregate. Einen Überblick über die ersten Entwicklungen auf diesem Gebiet der Arzneiträgerentwicklung gaben Gupta und Hung (1989)

Die Idee, Nanopartikel speziell aus Proteinen als Arzneiträgersysteme einzusetzen und damit ein „ideales Trägersystem“ zu schaffen, wird seit 1974 verfolgt (Kramer 1974, Gupta and Hung 1989). Die Anforderungen an ein ideales Trägersystem sind u.a. eine einfache Herstellung und Handhabung, problemlose Lagerung über einen längeren Zeitraum, hohe Beladungskapazität für eine Vielzahl an Arzneistoffen, der Schutz der Ladung vor Abbau und Akkumulation des Wirkstoffes, sowie der Verbleib am gewünschten Wirkort. Daneben sollte das Trägersystem untoxisch, biodegradierbar und nicht allergen sein und den Arzneistoff in aktiver Form mit gewünschter

Geschwindigkeit und in therapeutischer Konzentration in die Zielzellen freisetzen (Douglas et al. 1987).

Da Nanopartikel hinsichtlich dieser Anforderungen gegenüber herkömmlichen Arzneiformen entscheidende Vorteile bieten, haben kolloidale Systeme zunehmend an Bedeutung gewonnen (Gupta and Hung 1989). Sie eignen sich sowohl zur intravenösen, intramuskulären und subkutanen Applikation als auch zur oralen und dermalen Applikation und zur Anwendung am Auge (Cappel and Kreuter 1991, Kreuter 1991, 1994), außerdem können sie die Bioverfügbarkeit einiger schwer absorbierbarer Arzneistoffe verbessern.

Neben einer kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung ermöglichen Nanopartikel ein sogenanntes Drug-Targeting. Als Drug-Targeting wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem der Arzneistofftransport mit einer hohen Selektivität zu einem bestimmten Zielorgan oder -gewebe erfolgt (Akasaka et al. 1988). Das Drug-Targeting läßt sich in drei verschiedene Klassen unterteilen. Zum einen gibt es das sogenannte passive Targeting, was aufgrund der Körperverteilung in einer Aufnahme der Partikel durch das Mononukleäre Phagozytierende System (= MPS; oder auch Reticuloendotheliales System = RES) resultiert. Ein therapeutisches Ziel bei der Nutzung dieses Aufnahmeweges könnte eine Aktivierung der Makrophagen oder die Bekämpfung von Infektionen des MPS sein (Douglas et al. 1987). Daneben unterscheidet man das physikalische Targeting, bei welchem die Arzneistoff-Freisetzung bzw. das Targeting durch externe Einwirkung erzielt wird. Dazu zählt u.a. die Einwirkung von Magnetfeldern auf magnetische Nanopartikel zur lokalen Akkumulation der Nanopartikel in Tumorgewebe (Widder 1978, 1979, 1983a, 1983b). Am erfolgreichsten erscheint das aktive Drug-Targeting (Douglas et al. 1987). Hierbei werden Liganden wie Zuckerketten, Lektine, Hormone oder Antikörper an die Partikeloberfläche gebunden, um somit eine zellspezifische Bindung des Trägersystems zu erreichen. Besonders auf dem Gebiet der Lektin-Bindung (Irache et al. 1994, Hussain et al. 1997, Ezpeleta et al. 1999) und des antikörperinduzierten Targetings (Leserman et al. 1980, Akasaka et al. 1988, Kreuter 1994) wurden große Fortschritte erzielt.

### 2.1.3 Körperverteilung

Die Verteilung der Nanopartikel im Körper wird hauptsächlich von ihrer Größe und ihrer Oberflächenbeschaffenheit wie Ladung und Hydrophilie beeinflusst (Gupta and Hung 1989, Lin et al. 1999). Die kleinsten Kapillaren des menschlichen Körpers haben einen Durchmesser von 7  $\mu\text{m}$ , weshalb nur Partikel  $< 7\mu\text{m}$  im Blutkreislauf zirkulieren können. Größere Teilchen oder Aggregate werden von den arteriellen Lungenkapillaren nach der i.v.-Injektion herausfiltriert (Douglas et al. 1987). Die im Blut zirkulierenden Partikel werden von den Zellen des MPS aufgenommen und abgebaut, da dem MPS als Hauptaufgabe die Entfernung von Fremdpartikeln aus dem Blut zukommt (Gupta and Hung 1989). Besonders reich an Zellen des MPS sind Leber, Milz, Lunge und Knochenmark.

Die Aufnahme durch das MPS wird durch die Anlagerung von Blutbestandteilen an die Partikel direkt nach der Injektion begünstigt. Bei den sich anlagernden Blutbestandteilen handelt es sich vor allem um Opsonine, Fibrin und Fibrinogen (Kreuter 1983b). Insbesondere die Opsonine bedingen hierbei eine Erkennung bzw. Nichterkennung des Trägersystems durch die Makrophagen (Lin et al. 1999). In welchem Umfang sich die Blutbestandteile an der Partikeloberfläche anlagern — und damit das Ausmaß der Aufnahme durch das MPS bestimmen — hängt von den Oberflächeneigenschaften des Partikelsystems ab (Kreuter 1994, Lück et al. 1998). Illum und Davis (1984) führten durch Erhöhung der Hydrophilie von Polystyrol-Partikeln mit Poloxamer bzw. Poloxamin eine verminderte phagozytische Aufnahme durch das MPS herbei. Neben der Hydrophilie der Oberfläche hat auch die Oberflächenladung einen Einfluß. Partikel mit einem Zetapotential nahe Null bzw. einem niedrigen Zetapotential werden in wesentlich geringerem Umfang vom MPS phagozytiert als geladene Nanopartikel, vor allem im Vergleich mit Nanopartikeln mit positiver Oberflächenladung (Gupta and Hung 1989, Lin et al. 1999). Die Phagozytose durch das MPS erschwert das Drug-Targeting erheblich, es sei denn, die Organe des MPS sind Ziele des Targetings. Durch gezielte Veränderung der Oberflächeneigenschaften wurde versucht, die Aufnahme durch das MPS zu vermindern, beispielsweise durch den Überzug der Partikel mit oberflächenaktiven

Stoffen wie Poloxamer 338 und Poloxamin 906 (Kreuter 1991) oder durch Adsorption von Glykoproteinen und Albumin (Kreuter 1983b). Die Aufnahme in die Leber konnte damit auf die Hälfte gesenkt werden. Doch nicht nur die Aufnahme der Partikel durch das MPS wird durch die physikochemischen Eigenschaften der Partikel beeinflusst. Auch die Aufnahme der Partikel aus dem Gastrointestinaltrakt ist von der Ladung und der Beschaffenheit der Polymermatrix sowie der Partikelgröße abhängig (Desai et al. 1996, Jung et al. 2000). Ähnliches gilt für die Aufnahme von Nanopartikeln aus dem arteriellen Blutkreislauf (Labhasetwar et al. 1998, Song et al. 1998).

### 2.1.4 Ausgangsmaterialien

Die Ausgangsmaterialien für die Herstellung von Nanopartikeln können in drei große Substanzklassen untergliedert werden.

Tabelle 1: Übersicht über die Ausgangsmaterialien zur Herstellung von Nanopartikeln

Nanopartikelmatrix bestehend aus:	Literatur
<b>Gruppe I</b>	
Polymethylmethacrylat	Kreuter and Speiser 1976 Berg et al. 1979
Polyalkylcyanoacrylat	Couvreux et al. 1982
Polystyrol	Shahar et al. 1986
Polyvinylpyridin	Rembaum et al. 1979
Polyacrolein	Chang et al. 1985
Polyglutaraldehyd	Margel et al. 1979
Polyalkylmethylidenmaloneat	DeKeyser et al. 1991
Polyacrylamid	Birrenbach and Speiser 1976
Poly(N,N'-L-Lysindiyli-terephthaloyl)	Arakawa and Kondo 1980
Poly-ε-caprolacton	Marchal-Heussler et al. 1993
Polyhydroxybutyrat	Koosha et al. 1987
<b>Gruppe II</b>	
Polymilchsäure	Gurny et al. 1981
Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer	Marchal-Heussler et al. 1993
<b>Gruppe III</b>	
Ethylcellulose	Bodmeier and Chen 1990
Chitosan	Hassan et al. 1992
Gelatine	Marty et al. 1978
HSA	Marty et al. 1978
Casein	Marty et al. 1978
Alginate	Aynie et al. 1999

Gruppe I besteht aus verschiedenen synthetischen Monomeren, die mit Hilfe eines Polymerisationsprozesses in eine nanopartikuläre Form überführt werden (echte Latices). Gruppe II beinhaltet synthetische Makromoleküle, die in einem wässrigen oder organischen Lösungsmittel dispergiert oder gelöst werden und durch physikalische Einwirkung in eine Nanopartikelpräparation überführt werden (Pseudolatices). Gruppe III ist der Gruppe II sehr ähnlich und unterscheidet sich lediglich durch den Einsatz natürlicher Makromoleküle anstelle der synthetischen Ausgangsmaterialien. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 gegeben.

## **2.2 Proteinbasierte Nanopartikel**

Die Experimente zur Entwicklung nanopartikulärer Trägersysteme erstreckten sich in den letzten zwei Jahrzehnten hauptsächlich auf die Untersuchung von Nanopartikeln aus synthetischen Polymeren, wie den Polyacrylat- und den Polystyrol-Nanopartikeln. Der Nachteil dieser Ausgangsmaterialien liegt in der Stabilität des Trägersystems. Eine Biodegradation ist in einem überschaubaren Zeitraum nicht möglich, d.h. die Polymere werden nur sehr langsam wieder eliminiert, was zu dem Problem der Akkumulation im Körper bei mehrfacher Gabe führt.

Eine Ausnahme bilden dabei die sehr schnell abbaubaren Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel, doch möglicherweise entsteht bei ihrem Abbau Formaldehyd als toxisches Produkt (Vezin and Florence 1980, Lenaerts et al. 1984). Das Problem der Biodegradation und der Entstehung toxischer Nebenprodukte stellt sich bei proteinbasierten Trägersystemen nicht. Albumin-Nano- und -Mikropartikel werden von den körpereigenen Enzymen angegriffen und innerhalb von 7 Tagen in Makrophagen vollständig abgebaut (Morimoto and Fujimoto 1985, Schäfer et al. 1994), weshalb sie eine interessante Alternative zu den herkömmlichen Trägersystemen darstellen. Die aufgrund der Proteinstruktur erwartete Antigenität der Partikel hat sich in der Vergangenheit nicht bestätigt (Lee et al. 1981, Morimoto and Fujimoto 1985, Arshady 1990, Rubino et al. 1993). Einen weiteren Vorteil bringt die Peptidstruktur der Partikelmatrix mit sich. Durch die Verfügbarkeit der funktionellen Gruppen der Proteinseitenketten an der Partikeloberfläche bieten sich vielfältige

Möglichkeiten, Arzneistoffe, Linker oder andere Strukturen kovalent an die Oberfläche zu binden.

## **2.2.1 Ausgangsmaterialien für proteinbasierte Nanopartikel**

Proteine wie humanes und bovines Serumalbumin, Gelatine und Casein eignen sich als natürlich vorkommende, peptidische Makromoleküle zur Herstellung von proteinbasierten Nanopartikeln (Allémann et al. 1993, Kreuter 1994). Da Casein im Vergleich zu den anderen Proteinen im Bereich der kolloidalen Trägersysteme nur von untergeordneter Bedeutung ist, soll hier auf eine nähere Charakterisierung verzichtet werden.

### **2.2.1.1 Humanes Serumalbumin (HSA)**

Humanes Serumalbumin ist als einer der Hauptbestandteile der Plasmaproteine ein im Laufe der Jahre sehr intensiv untersuchtes und damit sehr gut definiertes Protein. Einen Überblick über die herausragendsten Eigenschaften der Albumine gaben Carter und Ho (1994) und Curry et al. (1998).

Albumin wurde bereits 1939 als Grundbestandteil des Blutes identifiziert. Die Konzentration des Serumalbumins liegt im Blut zwischen 4 und 5 g/100 mL und trägt zu 80 % zum kolloidosmotischen Druck des Blutes bei. Es ist unter anderem verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes und kommt nahezu in jedem Gewebe und jeder Körperflüssigkeit vor. Der Begriff Albumin umfaßt mehrere Proteine, die sich sowohl funktionell als auch strukturell vom Serumalbumin unterscheiden, wie beispielsweise das Ovalbumin oder das Prealbumin.

#### *2.2.1.1.1 Funktionen des Albumins*

Aus der Fähigkeit des Albumins, reversibel eine Vielzahl von Liganden zu binden, lassen sich die Aufgaben des Albumins im Körper ableiten. Es dient primär als Carrier für Fettsäuren. Außerdem fängt es freie Sauerstoffradikale ab und inaktiviert toxische, lipophile Metaboliten wie Bilirubin. Aufgrund seiner Struktur kann es kovalente

Bindungen mit Pyridoxalphosphat, Cystein, Glutathion und verschiedenen Metallen eingehen, und es fungiert als Carrier und Speicher für NO.

#### 2.2.1.1.2 Primärstruktur

Charakteristisch für das Albumin ist seine Struktur. Humanes Serumalbumin besteht aus 585 Aminosäuren mit einem ungewöhnlich hohen Anteil an Cystein und geladenen Aminosäuren und einem auffallend geringen Anteil an Tryptophan, Glycin und Methionin. Die Zusammensetzung des HSAs ist im einzelnen in Tabelle 2 aufgeführt. Albumin besitzt keinen Angriffspunkt für eine enzymatische Glykosylierung und lediglich eine freie SH-Gruppe (Cys 34). Im Blut liegen 30 % dieser freien SH-Gruppen durch Cystein oder Glutathion oxidiert vor. Einige Albuminzubereitungen enthalten bis zu 20 % dimerisiertes Albumin. Der Anteil des Dimers steigt mit zunehmendem Alter des Proteins, es sein denn, Cys 34 wird zuvor mit Cystein oder Glutathion blockiert.

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung des Humanen Serumalbumins  
(Quelle: Swiss-Prot P02768; <http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-ful>)

Aminosäure	Moleküle / HSA-Molekül	Aminosäure	Moleküle / HSA-Molekül
Ala	62	Leu	61
Arg	24	Lys	59
Asn	17	Met	6
Asp	36	Phe	31
Cys	35	Pro	24
Gln	20	Ser	24
Glu	62	Thr	28
Gly	12	Trp	1
His	16	Tyr	18
Ile	8	Val	41

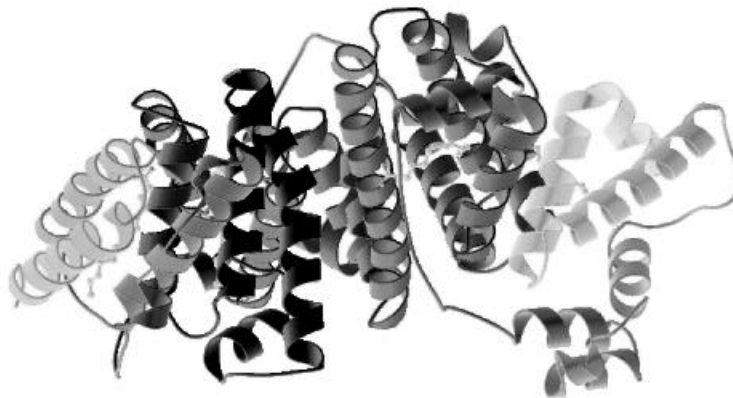
#### 2.2.1.1.3 Sekundär- und Tertiärstruktur

Eine Gemeinsamkeit aller Serumalbumine liegt in der einzigartigen Anordnung von durch Disulfidbrücken stabilisierten Double-Loops, die sich dreifach wiederholen, also

eine "Triplett-Struktur" ausbilden. Säugetieralbumine haben neun dieser Double-Loops, die durch 17 Disulfidbrücken stabilisiert werden. Jeweils drei Loops bilden eine Domäne. Kristallstrukturanalysen ergaben, daß sich jede Domäne in 2 Unterdomänen A und B aufteilen läßt.

Serumalbumin besteht also aus drei homologen Domänen I, II und III. Die Subdomänen A und B sind überwiegend helikaler Struktur und sehr stark über mehrere Disulfidbrücken quervernetzt. Jede Domäne kann in 10 helikale Segmente aufgeteilt werden, und dieses helikale Muster ist in allen Domänen gleich. Die Subdomänen lagern sich aufgrund hydrophober Interaktionen der Helices zusammen. Die Disulfidbrücken befinden sich ausschließlich zwischen diesen helikalen Abschnitten. Albumin scheint damit das einzige Protein zu sein, dessen gesamte räumliche Anordnung bzw. Proteinfaltung auf Disulfidbrücken zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Struktur ist die Bildung gemischter Disulfide praktisch nicht möglich, da die Albuminstruktur den Großteil der Disulfidbindungen schützt bzw. praktisch nicht mit dem Lösungsmittel in Kontakt treten läßt.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des humanen Serumalbumins (Quelle: Protein 1BJ5; <http://www.rcsb.org/pdb/>)



Neuere Untersuchungen ergaben für Albumin ein herz- oder U-förmiges Gebilde mit Abmessungen von  $80 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$  und einem Isoelektrischen Punkt von 5,3. Bei neutralem pH-Wert ist das Molekül stark negativ geladen, wobei die Ladung asymmetrisch verteilt ist. Diese Ladungasymmetrie ist in der Primärstruktur allerdings nicht zu beobachten. Das Molekulargewicht des humanen Serumalbumins liegt bei 65 kDa.



#### 2.2.1.1.4 Konformationsänderung

Konformationsänderungen des Albumins lassen sich bei Änderung des pH-Wertes und bei Interaktionen mit Fettsäuren beobachten. Fünf verschiedene Konformationen des Albumins zeigen sich bei folgenden unterschiedlichen pH-Werten:  $\text{pH} < 4$ ;  $\text{pH} = 4$ ;  $\text{pH} = 7$ ;  $\text{pH} > 8$  über einen kurzen Zeitraum und  $\text{pH} > 8$  über einen längeren Zeitraum. Bei  $\text{pH} 4$  kommt es zu einer abrupten Öffnung des Moleküls durch Entfaltung der Domäne III vom Rest des Moleküls. Als Folge dieser Strukturveränderung erhöht sich die Viskosität der Lösung sehr stark, die Löslichkeit nimmt deutlich ab, und es kommt zu einem signifikanten Verlust an helikaler Struktur. Bei Neutralisation erfolgt eine vollständige Rückbildung der Struktur. Ob diese Konformationsänderung von physiologischer Bedeutung ist, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Allerdings sollte die Tatsache nicht außer acht gelassen werden, daß an den Oberflächen einiger Gewebe sehr niedrige pH-Werte gemessen wurden.

#### 2.2.1.1.5 Ligandenbindung

Das Albuminmolekül weist an seiner Oberfläche mehrere spezifische Bindungsstellen auf. Hierbei handelt es sich um Bindungsstellen für kleine heterozyklische oder aromatische Carbonsäuren, Bindungsstellen für langkettige Fettsäuren sowie Metallbindungsstellen. Die Bindungsstellen für kleine heterozyklische oder aromatische Carbonsäuren sind spezielle Einbuchtungen in den Unterdomänen IIA und IIIA. Prinzipiell ist der Transport von sechs Fettsäuren pro Albuminmolekül möglich, wobei in der Regel nur ein bis zwei transportiert werden. Albumin hat zwei high-affinity-Bindungsstellen und vier mit niedrigerer Affinität. Als Bindungsstellen für Metalle bieten sich sowohl die freien SH-Gruppen am Cys 34 als auch der N-Terminus des Proteins an. Durch kovalente Bindung mit der Thiolgruppe ( $\text{Au}^{1+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ ) bzw. Komplexierung mit den drei letzten Aminosäuren des N-Terminus ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) können so Metallionen transportiert werden.

### **2.2.1.2 Gelatine**

Ein weiterer Ausgangsstoff zur Herstellung proteinbasierter Nanopartikel ist Gelatine. Gelatine ist im Gegensatz zu HSA kein Protein definierter Zusammensetzung oder Struktur, sondern ein Gemisch verschiedenster Proteinketten.

#### *2.2.1.2.1 Gewinnung*

Gelatine wird aus tierischen Häuten, Knochen oder Schweineschwarten durch hydrolytischen Abbau des enthaltenen Kollagens gewonnen. Dieser hydrolytische Abbau kann durch einen sauren oder basischen Aufschluß erfolgen, wobei man durch die Anwendung des sauren Verfahrens die sogenannte Gelatine A (Acid) erhält und durch Anwendung des alkalischen Aufschlusses die sogenannte Gelatine B (Base). Der Isoelektrische Punkt (IEP) der Gelatine A liegt im leicht basischen Bereich zwischen pH 7,0 und 8,5, der IEP der Gelatine B dagegen aufgrund der Spaltung der Amid-Seitengruppen des Glutamins und Asparagins in freie Carboxylgruppen im sauren pH-Bereich zwischen 4,5 und 5,0.

#### *2.2.1.2.2 Zusammensetzung*

Bedingt durch das Herstellungsverfahren und die unterschiedliche Beschaffenheit der Ausgangsmaterialien ist Gelatine kein Protein definierter Struktur, so daß Angaben über die Zusammensetzung nur grobe Anhaltspunkte sein können.

Gelatine ist ein Polypeptid, das zu mindestens 95 % aus Aminosäuren besteht. Das mittlere Molekulargewicht der Gelatinemoleküle liegt unterhalb von 100 kDa (Saddler and Horsey 1987). Eine definierte Primärstruktur der Gelatine gibt es nicht, die Verknüpfung der Aminosäuren ist nicht bekannt. Gelatine setzt sich aus 27-33 % Glycin, etwa 33 % Prolin und Hydroxyprolin, aus 12-19 % sauren Aminosäuren wie Glutamin- und Asparaginsäure, 7,5 –15 % basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin und etwa 6 % Leucin, Isoleucin, Methionin und Valin zusammen (Bauer et al. 1993, Digenis et al. 1994, Bohidar 1998). Trotz der undefinierten Struktur ermittelte Bohidar (1998) aus diesen Daten ein sich wiederholendes, grob gefaßtes Strukturelement mit einem mittleren Monomergewicht von  $(110\text{g/mol})_n$  bei  $n \approx 1200$

bei 60°C und  $n \approx 3700$  bei 35°C. Wie dieses Ergebnis zeigt, nimmt das mittlere Molekulargewicht der Gelatine in Lösung mit steigender Temperatur deutlich ab (Bohidar 1998).

## **2.2.2 Herstellungsmethoden proteinbasierter Nanopartikel**

Bei der Herstellung proteinbasierter Nanopartikel lassen sich grundsätzlich zwei Herstellungsverfahren unterscheiden. Bei der einen Methode erfolgt die Partikelbildung in Emulsion, das heißt in einem Zweiphasensystem. Die andere Methode erzielt die Partikelbildung durch Desolvatation. In der Literatur werden zahlreiche Modifikationen dieser Herstellungsmethoden beschrieben, wobei oftmals mehr oder weniger ausgeprägte Veränderungen vorgenommen werden, um die Partikeleigenschaften für die jeweilige Zielsetzung zu optimieren. Die im folgenden beschriebenen Methoden beinhalten auch die Herstellung von Mikropartikeln, da sich die Methoden der Nanopartikelherstellung und der Mikropartikelherstellung in weiten Bereichen decken.

### **2.2.2.1 Herstellung in Zweiphasensystemen**

Die Herstellung von Proteinpartikeln in Zweiphasensystemen erfolgt grundsätzlich nach folgendem Schema: das Protein wird in hoher Konzentration in Wasser gelöst und in einer lipophilen äußeren Phase unter Bildung einer W/O-Emulsion dispergiert, wobei die lipophile äußere Phase aus Baumwollsaamenöl (Gallo et al 1984, Kreuter 1992, 1994) oder aus organischen Lösungsmitteln (Longo et al. 1982, Longo and Goldberg 1985, Roser and Kissel 1993, Müller et al. 1996, MacAdam et al. 1997) bestehen kann. Da die Tropfenbildung in einem Zweiphasensystem ein dynamischer Prozeß ist, muß eine homogene Dispergierung der Proteinlösung in der äußeren Phase gewährleistet sein, um später eine enge Partikelgrößenverteilung zu erzielen (Arshady 1990). Zur Härtung der vorliegenden Proteintropfen müssen die Makromoleküle kovalent quervernetzt werden. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen ist eine chemische Quervernetzung unter Zusatz von wäßrigen Aldehydlösungen wie Formaldehyd, Glutaraldehyd (Kreuter 1994) oder 2,3-Butadion (Arshady 1990, Kreuter 1994) möglich, zum anderen können die Partikel durch Einwirkung hoher

Temperaturen (100-180°C) gehärtet werden (Widder et al. 1979, Kreuter 1992, Allémann et al. 1993, Kreuter 1994). Die hierbei auftretende Kondensation von Carboxylgruppen mit Aminogruppen ist irreversibel (Esposito et al. 1996). Nach erfolgter Quervernetzung bzw. Denaturierung werden die Partikel mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln abgetrennt und gewaschen (Kreuter 1994) z.B. mit Aceton (Arshady 1990) oder Ether (Scheffel et al. 1972, Widder et al. 1979, Kreuter 1983, 1991, 1992).

### *2.2.2.1.1 Albumin-Partikel*

Die klassische Herstellung von Albumin-Mikropartikeln erfolgte in einer W/O-Emulsion mit Baumwollsaamenöl als Außenphase. Die Art des verwendeten Öls hat dabei großen Einfluß auf die Partikelgröße, wobei mit Baumwollsaamenöl die kleinsten Partikel erzielt wurden (Gallo et al. 1984, Kreuter 1992, 1994). Die Herstellung von Partikeln im Nanometerbereich wurde durch den Einsatz von Hochleistungshomogenisatoren oder Ultraschall erreicht. Auch die Emulgierzeit und die Ultraschallstärke haben dabei Einfluß auf die Partikelgröße (Kreuter 1994). Bei der Verwendung von Baumwollsaamenöl ist der Zusatz von oberflächenaktiven Stoffen zur Stabilisierung der Emulsion nicht notwendig, da sich diese Systeme selbst stabilisieren (Arshady 1990). Die durch dieses Verfahren hergestellten Partikel weisen eine hydrophobe Oberfläche auf. Grund hierfür ist, daß sich die hydrophoben Regionen des Albumins aufgrund des hydrophoben äußeren Milieus nach außen orientieren und dann durch Quervernetzung in dieser Orientierung fixiert werden. Ein weiterer Grund ist die Adsorption von Öl an die Partikeloberfläche während der Synthese, welches auch durch mehrfaches Waschen nicht entfernt werden kann (MacAdam et al. 1997).

Ziel der Herstellung ist jedoch, möglichst kleine Partikel mit einer hydrophilen Oberfläche herzustellen, denn je kleiner und je hydrophiler die Partikel sind, desto stabiler sind ihre Dispersionen und desto weniger oberflächenaktive Stoffe müssen zugesetzt werden. Auch hinsichtlich der Anwendung als Arzneistoff-Träger sind kleine hydrophile Partikel von Vorteil, da sich hydrophile Oberflächen aufgrund ihrer funktionellen Gruppen wesentlich einfacher modifizieren lassen als hydrophobe. Aus

diesem Grund wurde auf die verschiedensten Arten versucht, die oben beschriebenen Methoden zu modifizieren. Beispielsweise wurde das Öl als äußere Phase durch Gemische aus 1-Butanol und Ölsäure (MacAdam et al. 1997) oder durch organische Polymerlösungen (Longo et al. 1982, Longo and Goldberg 1985, Akasaka et al. 1988, Roser and Kissel 1993, Latha and Jayakrishnan 1995, Müller et al. 1996, MacAdam et al. 1997) ersetzt. Der Quervernetzer wurde im Gegensatz zu den ersten Herstellungsmethoden nicht der inneren Phase zugesetzt sondern der äußeren (Roser and Kissel 1993, Müller et al. 1996). Dies bewirkt eine sehr hohe Aldehydkonzentration an der Partikeloberfläche, im Partikelinneren dagegen befinden sich nur sehr geringe Konzentrationen. Die hohe Aldehydkonzentration an der Oberfläche führt zu einer stärkeren Quervernetzung an der Partikeloberfläche und gleichzeitig zu mehr freien Aldehydgruppen, die als Angriffspunkt zur chemischen Modifikation der Albuminpartikel dienen können. Zur Hydrophilisierung wurden diese freien Aldehydgruppen an der Partikeloberfläche mit 2-Aminoethanol, Aminoessigsäure oder Glycin gequench (Roser and Kissel 1993, MacAdam et al. 1997).

#### *2.2.2.1.2 Gelatine-Partikel*

Die Herstellung der Gelatine-Partikel in Zweiphasensystemen erfolgt prinzipiell wie die Herstellung der Albumin-Partikel (Li et al. 1997, 1998). Auch hier werden mehrere Modifikationen der Methode in der Literatur beschrieben und die Zusammensetzung der lipophilen, äußeren Phase bzw. die Quervernetzung der Partikel verändert (Yoshioka et al. 1981, Tabata and Ikada 1989, Esposito et al. 1996, Nakamura et al. 1998), doch werden in der Literatur weitaus weniger Methoden beschrieben als für Albumin-Partikel.

#### **2.2.2.2 Herstellung durch Desolvatation**

Eine weitere Möglichkeit, Mikro- und Nanopartikel herzustellen, bietet die Desolvatation. Unter Desolvatation versteht man den Entzug von Lösungsmittelmolekülen, so daß sich die Makromoleküle zu Partikeln zusammenlagern. Dies kann auf mehrere Arten erreicht werden, z.B. durch Änderung des pH-Wertes, durch Ladungsveränderung oder durch das sogenannte Aussalzen. Hierbei wird ein Nicht-

Lösungsmittel zugegeben, wodurch der Durchmesser der Hydrathülle der Makromoleküle solange immer weiter abnimmt, bis die Moleküle anfangen zu aggregieren und sich schließlich eine neue feste Phase bildet. Der Desolvationsvorgang wird durch Beobachtung des Trübungsgrades überwacht. Dieser nimmt zunächst mit steigendem Desolvationsgrad ab, da der Durchmesser der Makromoleküle durch den Desolvationsprozeß kleiner wird, steigt dann aber mit Erreichen der Phasentrennung rapide an.

### *2.2.2.2.1 Albumin-Partikel*

Die Desolvation von Albumin wird mit Ammoniumsulfat, Natriumsulfat in Gegenwart von 2 % Polysorbat 20 oder mit Ethanol durchgeführt. Nach erfolgter Desolvatisierung wird eine kleine Menge Resolvatisierungsmittel zugesetzt, bevor es im zweiten Schritt der Herstellung zur Härtung der Partikel kommt. Andernfalls kann Quervernetzung zwischen den Partikeln und damit Aggregation und Flockung auftreten. Zur Härtung wird Glutaraldehyd zugesetzt. Überschüssiger Aldehyd kann mit Natriumsulfit oder Natriumdisulfit entfernt werden (Kreuter 1983a, 1994).

Bei den in der Literatur beschriebenen Desolvationsmethoden wurden die Partikeleigenschaften durch Faktoren wie Desolvationsreagenz, Quervernetzer, pH-Wert und Einsatz von Albumin-Copolymeren modifiziert. Anstelle des Ethanols verwendeten Chen et al. (1994) und Lin et al. (1993, 1994) Aceton als Desolvatisierungsmittel. Durch Veränderung des pH-Wertes auf pH 9,0 erzielten Lin et al. (1993) sehr kleine Nanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 100 nm. Partikel in der gleichen Größenordnung wurden durch den Einsatz von Albumin-Copolymeren und durch den Einsatz eines Dextranderivates als Quervernetzer (Lin et al. 1994, 1997, 1999) erhalten.

### *2.2.2.2.2 Gelatine-Nanopartikel*

Gelatine kann im Gegensatz zu Albumin mit Natriumsulfat allein desolvatisiert werden, doch auch eine Desolvation mit Ethanol und Aceton ist möglich (Kreuter 1983a, 1994). Ansonsten wird wie bei der Herstellung der Albumin-Partikel verfahren.

Modifikationen hinsichtlich der Desolvatationsbedingungen finden sich für Gelatine nicht. Eine Zwei-Schritt-Desolvatationsmethode der Gelatine wurde von Coester et al. (2000a) entwickelt, bei der im ersten Desolvatationsschritt die niedermolekulare Fraktion der Gelatine abgetrennt wurde und anschließend der hochmolekulare Anteil in Nanopartikel überführt wurde. Durch Abtrennung der niedermolekularen Fraktionen wurde eine sehr homogene Größenverteilung der Partikel erreicht.

## **2.3 Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln**

Die Oberflächeneigenschaften der Nano- und Mikropartikel spielen bei der Verteilung der Partikel im Körper eine entscheidende Rolle. Vor allem Hydrophilie und Oberflächenladung sind maßgeblich hieran beteiligt. Je stärker die Partikeloberfläche geladen ist, desto mehr werden die Partikel vom MPS aufgenommen und somit aus dem Blutkreislauf eliminiert (Gupta and Hung 1989). Die Hydrophilie ist nicht nur hinsichtlich der Körperverteilung ein wichtiger Aspekt. Auch bei der galenischen Zubereitung spielt sie eine entscheidende Rolle, denn hydrophilen Partikeln müssen keine oberflächenaktiven Stoffe zugesetzt werden, um in wäßrigen Lösungen stabile Dispersionen zu bilden.

Bei der Beladung der Partikel mit Arzneistoffen oder anderen Stoffen wie beispielsweise Proteinen hängt die Qualität und die Quantität der Beladung in gleichem Maße von den Oberflächeneigenschaften wie von den Eigenschaften des jeweiligen Stoffes ab. In früheren Arbeiten wurde versucht, den Arzneistoff adsorptiv an die Partikeloberfläche zu binden. Da es aber immer wieder zu Stabilitätsproblemen kam, könnte eine kovalente Arzneistoffbindung an die Partikeloberfläche eine Lösung dieser Stabilitätsprobleme darstellen. Doch um Stoffe kovalent binden zu können, müssen an der Oberfläche der Partikel funktionelle Gruppen zugänglich sein bzw. gemacht werden oder durch chemische Modifikation eingeführt werden.

### **2.3.1 Ziel der Oberflächenmodifikation**

Die mit der Oberflächenmodifikation der Nanopartikel verbundenen Ziele sind vielfältig. Eine Veränderung der Körperverteilung zur Umgehung des MPS und damit

eine verlängerte Zirkulation des Trägersystems in der Blutbahn ist eines der wichtigsten Ziele. Da die für die Aufnahme durch das MPS verantwortlichen Proteine hauptsächlich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an die Partikeloberfläche adsorbiert werden (Soderquist and Walton 1980) und damit die phagozytische Aufnahme durch das MPS forcieren, ist es möglich, durch gezielte Oberflächenmodifikation die Körperverteilung des kolloidalen Trägersystems zu verändern (Blunk et al. 1993). Die Veränderung der Oberflächenladung der Nanopartikel kann eine nicht-kovalente Bindung geladener Arzneistoffe ermöglichen. Um eine kovalente Bindung von Arzneistoffen oder Leitstrukturen für das Drug-Targeting wie Antikörper oder Lektine zu ermöglichen, müssen funktionelle Gruppen an der Partikeloberfläche bereitgestellt werden bzw. in eine aktive Form überführt werden. Eine Modifikation der Oberfläche kann auch die Arzneistoff-Freisetzung beeinflussen (Wu and Lee 1993).

### **2.3.2 Oberflächenmodifikation bei Acrylat-Nanopartikeln**

Die Oberflächenmodifikation von Polyacrylat-Nanopartikeln beschränkt sich bisher im wesentlichen auf zwei Verfahren. Zum einen wurden Stoffe an die Partikeloberfläche adsorbiert, beispielsweise hydrophile Agenzien wie Polylysgelatine oder Gummi arabicum (Wilkins and Myers 1966). Auch die Adsorption ionischer und nichtionischer Tenside veränderte die Körperverteilung des kolloidalen Trägersystems. Das Coating mit ionischen Tensiden (Poloxamer 908) führte Illum and Davis (1983), Leu et al. (1984) und Tröster et al. (1990) zu einer Reduktion der Partikelaufnahme in die Leber und damit zu einem Anstieg der Partikelkonzentration im Blutserum. Polysorbat 80-gecoatete Partikel führten nach i.v.-Injektion sogar zu einer Aufnahme der Nanopartikel in das Gehirn und damit zu einem zentralen Wirkungseintritt bei Dalargin und Loperamid, die vor dieser Oberflächenmodifikation auf diese Partikel aufgebracht wurden (Kreuter et al. 1995, Alyautdin et al. 1995, 1997). Zum anderen werden die Partikel durch Copolymerisation der Acrylate mit einem den gewünschten Eigenschaften entsprechenden Acrylsäurederivat, einem Costabilisator oder dem Wirkstoff (Passirani et al. 1999) selbst modifiziert. Zur Einführung funktioneller Gruppen wurden die Acrylate mit Monomeren, die funktionelle Gruppen tragen,



copolymerisiert (Rembaum and Yen 1979, Kreuter 1988, Lukowski et al. 1992, Langer et al. 1996, Hoffmann et al. 1997). An die Hydroxylgruppen- oder Carboxylgruppen-tragenden Oberflächen können dann wiederum Antikörper und Lektine gebunden werden, um ein Targeting des Trägersystems zu ermöglichen (Molday et al. 1975, Rembaum et al. 1976, Rembaum and Yen 1979).

Die adsorptive Bindung positiv geladener Arzneistoffe wurde durch die Negativierung der Partikeloberfläche mittels einer Copolymerisation der Alkylcyanoacrylate mit Dextranderivaten (Douglas et al. 1986) oder durch Copolymerisation von Methacrylaten mit Sulfopropylmethacrylaten (Langer et al. 1996) erzielt. Zur Positivierung der Oberfläche und damit der adsorptiven Bindung negativ geladener Arzneistoffe wie Oligonukleotiden wurden die Alkylcyanoacrylat-Monomere mit dem Costabilisator DEAE-Dextran (Zobel et al. 1997) oder anderen Dextranderivaten (Bertling et al. 1991, Douglas et al. 1986) polymerisiert. Eine temperatur- und pH-abhängige Wirkstoff-Freisetzung erzielten Wu and Lee (1993) für Theophyllin durch Copolymerisation von N-Isopropylamid mit Acrylsäure.

Eine chemische Modifikation der Oberfläche der reinen Acrylat-Nanopartikel ist aufgrund der chemischen Beschaffenheit der Polymermatrix nicht oder nur unter drastischen Bedingungen möglich. Sollten dennoch Methoden zur Oberflächenmodifikation beschrieben sein, handelt es sich meist um die Modifikation funktionalisierter Partikel, wie beispielsweise bei der Aktivierung von Polystyrol-Mikropartikeln mit 4-Fluorobenzensulfonylchlorid (Chang et al. 1992).

### **2.3.3 Oberflächenaktivierung proteinbasierter Nanopartikel durch Einführung bzw. Aktivierung funktioneller Gruppen**

Die proteinbasierten Nanopartikel dagegen sind bedingt durch ihre Proteinmatrix auch nach Fertigstellung der Partikel einer Oberflächenmodifikation gut zugänglich. Als funktionelle Gruppen stehen grundsätzlich Carboxylgruppen aus Asparagin- und Glutaminsäure, die  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins, die Hydroxylgruppen aus Serin und Tyrosin sowie die Thiolgruppen des Cysteins zur Verfügung. Durch die Methoden der Proteinchemie können diese funktionellen Gruppen unter sehr milden Bedingungen

umgesetzt werden, ohne dabei die Proteinstrukturen zu zerstören. Die milden Reaktionsbedingungen sind dabei gleichzeitig für die zu bindenden Arzneistoffe von Vorteil. Gerade bei peptidischen Wirkstoffen ist dies von entscheidender Bedeutung.

In den folgenden Kapiteln werden mögliche Umsetzungsreaktionen dieser funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche dargestellt, die genutzt werden können, um entweder den Arzneistoff direkt an das Trägersystem zu binden oder um Crosslinker bzw. Spacer einzuführen.

### **2.3.3.1 Bildung von Säureamidbindungen**

Die Ausbildung von Säureamidbindungen zwischen den Carboxylgruppen des Trägersystems und den Aminogruppen eines Arzneistoffes oder umgekehrt ist ohne den Zusatz eines Kopplungsreagenzes bzw. ohne die Aktivierung der Carboxylgruppen nicht möglich. Die Aktivierung der Carboxylgruppen kann über Carbodiimide oder Azide erfolgen. Methoden wie die Umsetzung mit Sulfonylchlorid zur Bildung reaktiver Säurechloride müssen für die proteinbasierten Partikel wegen der drastischen Reaktionsbedingungen ausgeschlossen werden.

#### *2.3.3.1.1 Die Carbodiimid-Methode*

Die Aktivierung der Carboxylgruppen mit Carbodiimiden ist in der Proteinchemie die Methode der Wahl zur Bildung von Säureamiden (Carraway and Koshland 1972, Perfetti et al. 1976, Chapman-Smith et al. 1997). Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten peptidischen Nanopartikel in wässriger Suspension vorliegen, wurde anstelle des üblichen lipophilen Dicyclohexylcarbodiimids (= DCC) das wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (= EDC) verwendet. Freie Carboxylgruppen reagieren mit Carbodiimid unter Bildung eines O-Acyl-Isoharnstoffderivates (siehe Abbildung 2). Die Isoharnstoffgruppe ist eine sehr gute Abgangsgruppe und wird beim Angriff eines Nukleophils als Harnstoffderivat abgespalten. Die Reaktion kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden, das pH-Optimum der Reaktion liegt bei pH 4,7 (Nakajima and Ikada 1995).



Als Puffersystem wird der dem EDC gegenüber inerte MES-Puffer verwendet, da Acetat- und Phosphatgruppen aus dem Puffer mit den Carboxylgruppen des Proteins konkurrieren und damit die Bindungsrate negativ beeinflussen können (Sheu et al. 1991). Da das EDC-Carboxylgruppen-Intermediat sehr instabil ist, sollte die Aminkomponente zeitgleich mit dem EDC zur Carboxylkomponente zugesetzt werden, denn bereits nach 5 min nimmt die Reaktivität der aktivierten Carboxylgruppe stark ab (Nakajima and Ikada 1995). Eine Stabilisierung des instabilen Intermediates kann durch den Zusatz von N-Hydroxysuccinimid (NHS) erfolgen (Staros et al. 1986).

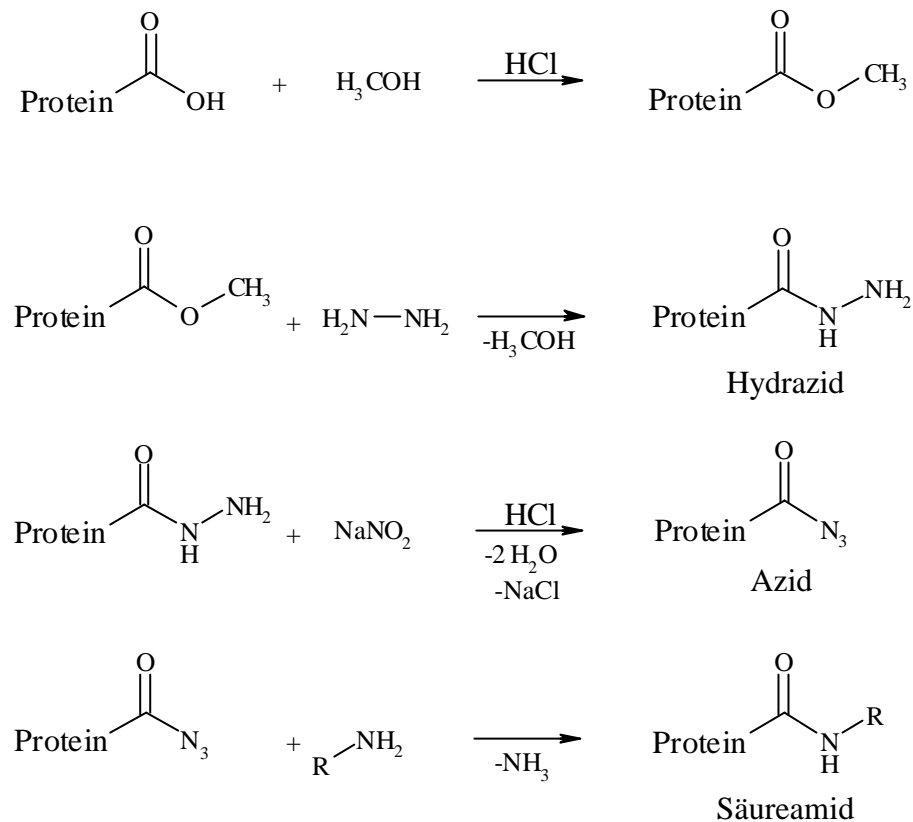
Diese Methode wurde in der Vergangenheit mehrfach genutzt. Irache et al. (1994) koppelten auf diese Art Lektine an Latexpartikel, Narayani und Rao (1993, 1996b) verknüpften Methotrexat und Gelatine kovalent. Orienti et al. (1996) banden mittels EDC Deoxycholsäure-Na an bovines Serumalbumin.

Nicht zu vernachlässigen sind möglicherweise auftretende Nebenreaktionen (siehe Abbildung 2). Zum einen können sich anstelle der O-Acyl-Isoharnstoffderivate Säureanhydride bilden, was aber auf die Bildung der Amide keinen weiteren negativen Einfluß hat. Zum anderen kann bei einem EDC-Überschuß (Nakajima and Ikada 1995) eine Umlagerung in das nicht mehr reaktive, stabile N-Acyl-Harnstoffderivat stattfinden, was den Angriff eines Nukleophils verhindert (Bodansky and Ondetti 1966). Ein weiteres Problem bei der Umsetzung von Proteinen sind Quervernetzungsreaktionen, die durch Reaktion von Amino- und Hydroxylgruppen des Proteins mit den aktivierten, eigenen Carboxylgruppen auftreten (Sheu et al. 1991).

### *2.3.3.1.2 Die Azid-Methode*

Eine alternative Methode zur Aktivierung der Carboxylgruppen stellt die Umsetzung der COOH-Gruppen mit Aziden dar. Die Carbonsäurefunktionen werden zunächst in Methylester überführt, dann mit Hydrazin in Hydrazide umgewandelt und mit Natriumnitrit zu Aziden umgesetzt. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3 dargestellt. Azid selbst ist eine gute Abgangsgruppe, so daß sich das Amid bei Zusatz der Aminokomponente ausbilden kann.

Abbildung 3: Reaktionsschema der Azid-Kopplungsreaktion



Narayani und Rao (1996a, 1996b) koppelten mit dieser Methode Methotrexat kovalent an Gelatine. Dabei aktivierten sie sowohl die Carboxylgruppen des Arzneistoffes als auch die des Proteins und koppelten jeweils mit den entsprechenden Aminogruppen. Sie konnten auf diese Weise eine Beladung von etwa 200 µg pro mg Gelatine erreichen.

### 2.3.3.2 Bildung von Esterbindungen

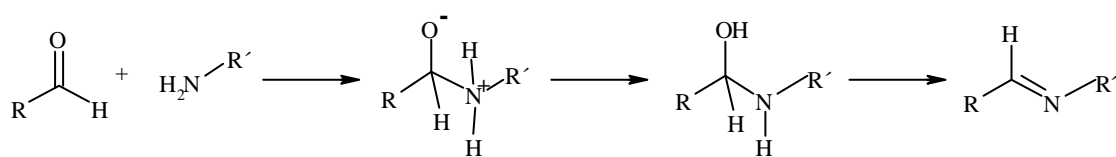
Mit Carbodiimiden können nicht nur Säureamide gebildet werden. Auch die Kopplung von Hydroxylgruppen an die COOH-Gruppe zu Esterbindungen wird durch den Einsatz dieser Substanzklasse begünstigt. Sheu et al. (1991) machten sich diese Reaktion zunutze und koppelten 5'-Desoxy-5-fluoridin an Serumalbumin und untersuchten den Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Kopplungsrate. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Ester sollte die Reaktion bei Raumtemperatur

durchgeführt werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 50°C führte bereits zu einer Abnahme der Bindungsrate um 30 % (Sheu et al. 1991).

### 2.3.3.3 Einführung oberflächenständiger Aldehydgruppen

Neben den natürlich vorkommenden Carboxyl- und Aminogruppen eignen sich auch Aldehydgruppen zur Kopplung mit Arzneistoffen. Doch im Gegensatz zu den anderen funktionellen Gruppen müssen die Aldehydgruppen künstlich in das Protein eingeführt werden. Dies kann durch den Einsatz bifunktionaler Aldehyde zur Quervernetzung wie z.B. Glutaraldehyd erreicht werden. Je größer die eingesetzte Aldehydkonzentration ist, desto häufiger treten monovalente Bindungen des Aldehyds und damit verbleibende freie Aldehydfunktionen an der Partikeloberfläche auf. Diese freien Aldehydgruppen können dann direkt mit den Aminofunktionen von Arzneistoffen unter Ausbildung von Schiff'schen Basen reagieren (siehe Abbildung 4). Sie können aber auch zur Einführung von Hydroxylgruppen mit Aminoethanol, mit Glycin zur Einführung von Carboxylgruppen oder mit Cystein zur Einführung von Thiolgruppen gequenchet werden (Longo et al. 1982, Irache et al. 1994, Latha and Jayakrishnan 1995, MacAdam et al. 1997, Coester et al. 2000b).

Abbildung 4: Reaktionsschema der Glutaraldehydkopplung



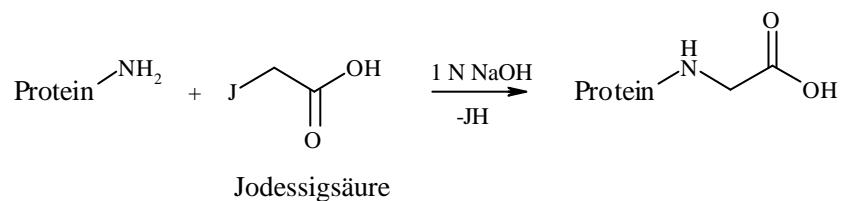
Akasaka et al. (1988) nutzten dieses Prinzip und koppelten mit Hilfe von Glutaraldehyd Antikörper an die Oberfläche von Nanopartikeln aus bovinem Serumalbumin. Obwohl die Antikörper kovalent über Schiff'sche Basen gebunden waren, wurde ihre Aktivität bzw. Affinität zu Antigenen nicht eingeschränkt. Zusätzlich mit einem Krebstherapeutikum beladene Partikel wurden so verstärkt in Tumorgewebe aufgenommen. Auch Cummings et al. (1991) und Golightly et al. (1988) haben über Glutaraldehyd ein Chemotherapeutikum, in diesem Fall

Doxorubicin bzw. Daunorubicin, an die Oberfläche von Protein-Mikropartikeln gebunden.

#### 2.3.3.4 Einführung von Carboxylgruppen

Je nach Herstellungsmethode weisen proteinbasierte Nanopartikel eine hydrophobe oder hydrophile Oberfläche auf (siehe 2.2.2). Hydrophobe Partikel haben an ihrer Oberfläche deutlich weniger funktionelle Gruppen als hydrophile, weswegen hier die Einführung von Carboxylgruppen notwendig sein kann. Eine Methode zur Einführung von Carboxylgruppen wurde in 2.3.3.3 beschrieben, indem freie Aldehydgruppen mit Glycin gequench wurden. Eine weitere Methode beschrieben Shafi et al. (1995) und MacAdam et al. (1997), indem sie die Oberfläche hydrophober Proteinpartikel mit Natronlauge behandelten und anschließend mit Jodessigsäure umsetzten.

Abbildung 5: Reaktionsschema der Jodessigsäurereaktion zur Einführung von Carboxylgruppen



Erfolgt die Umsetzung bei niedrigem pH-Wert, reagiert die Jodessigsäure mit Histidin, Lysin und Aspartat, wie in Abbildung 5 gezeigt, unter Abspaltung von Jodwasserstoff. Bei hohem pH-Wert dagegen reagiert die Jodessigsäure auch mit phenolischen Aminosäuren (MacAdam et al. 1997).

#### 2.3.3.5 Einführung chelatisierender kovalent gebundener Gruppen

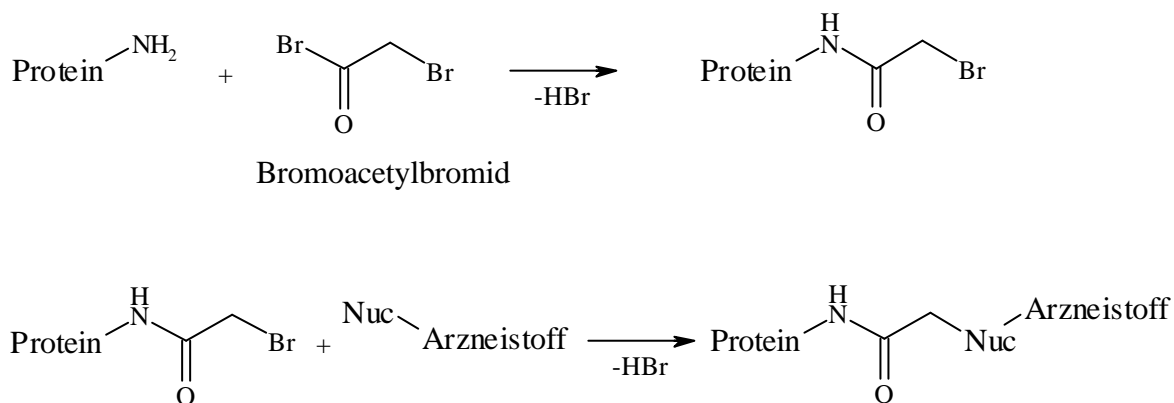
Hnatowich und Schlegel (1981) versuchten zu diagnostischen Zwecken Albumin-Partikel radioaktiv mit Ga-67 zu beladen und führten chelatisierende Gruppen an der Oberfläche der Partikel ein. Als chelatisierende Funktionen wurden Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) kovalent gebunden. Die Einführung erfolgte durch Umsetzung der Aminogruppen an

der Partikeloberfläche mit EDTA- bzw. DTPA-Anhydrid unter Ausbildung von Säureamidbindungen.

### 2.3.3.6 Modifikation mit Bromoacetylbromid

Die Modifikation von Partikeloberflächen mit Bromoacetylbromid wurde von Peterman et al. (1988) durchgeführt. Allerdings veränderten sie nicht die Oberfläche peptidischer Partikel, sondern die von Polystyrol-Partikeln, doch sollte diese Reaktion aufgrund der Oberflächenstruktur der proteinbasierten Nanopartikel problemlos auf selbige übertragbar sein.

Abbildung 6: Reaktionsschema der Bromoacetylbromidreaktion



Nuc = Nucleophile Gruppe

Nach Schaffung freier Aminofunktionen an der Partikeloberfläche wurden diese mit Bromoacetylbromid umgesetzt, wie in Abbildung 6 dargestellt. Die eingeführten Bromoacetylreste können nun ihrerseits direkt mit Proteinen unter Ausbildung kovalenter Bindungen reagieren. Ein Einsatz von Kopplungsreagenzien wie Carbodiimiden oder Aziden ist damit nicht mehr notwendig.



### **2.3.4 Oberflächenaktivierung proteinbasierter Nanopartikel durch Einführung von Spacern**

In den letzten Jahren wuchs das Interesse an proteinhaltigen Konjugaten, Kondensaten und Trägersystemen immens an, die Vielzahl an kommerziell vertriebenen Spacern und Crosslinkern zur Konjugation von Proteinen ebenfalls.

Bei den bifunktionalen Spacern wird zwischen homobifunktionalen und heterobifunktionalen Spacern unterschieden. Homobifunktional bedeutet, daß die zwei reaktiven Gruppen des Crosslinkers identisch sind und somit mit zwei gleichen funktionellen Gruppen des Proteins reagieren. Bei der Konjugation eines Proteins mit einem proteinbasierten Trägersystem können als Folge davon Quervernetzungsreaktionen innerhalb des Proteins bzw. innerhalb des Trägersystems auftreten, und die Bindungsrate des Proteins an das Trägersystem sinkt. Zusätzlich können aufgrund der Quervernetzung Flockungen des Trägersystems auftreten. Eine Alternative stellen heterobifunktionelle Crosslinker dar, die zwei unterschiedliche reaktive Gruppen aufweisen und somit mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Proteine reagieren, so daß eine selektive Umsetzung der Proteine möglich wird. Unter der Voraussetzung, daß in beiden Reaktionspartnern einer Proteinkonjugation jeweils nur eine Art funktioneller Gruppen mit Spacerreaktivität zu finden ist, können die oben aufgeführten Nebenreaktionen der homobifunktionalen Spacer durch den Einsatz der heterobifunktionalen Derivate vermieden werden.

Ein Überblick über die Literatur zeigt jedoch, daß sich die Heterogenität dieser Crosslinker auf zwei funktionelle Gruppen beschränkt: auf eine aminoreaktive und eine SH-selektive Gruppe. Innerhalb der amino- und SH-reaktiven Gruppen kann jedoch variiert werden. Welche Gruppen hierfür in Frage kommen, wird in den folgenden Kapiteln dargestellt. Die einzige Ausnahme bilden die photoaktiven Crosslinker. Diese Substanzen besitzen zwei aminoreaktive Gruppen, wobei jedoch eine dieser Gruppen nur durch Einwirkung von UV-Strahlung angeregt wird und reagieren kann. Auf diese Weise ist eine Selektivität hinsichtlich der Aminogruppen wie beim Einsatz eines heterobifunktionalen Crosslinkers möglich. Nachteil der heterobifunktionalen Crosslinker ist (mit Ausnahme der photoreaktiven Crosslinker)

die Voraussetzung, in einem der beiden Proteinfractionen freie SH-Gruppen zu haben, was in nativen Proteinen meist nicht der Fall ist. Dann müssen durch chemische Modifikationen SH-Gruppen entweder in das Protein oder an der Oberfläche des Trägersystems eingeführt werden.

Im folgenden Kapitel werden nun die grundlegenden Reaktionsmechanismen der reaktiven Gruppen dieser Spacer mit den funktionellen Gruppen der Partikeloberfläche erläutert.

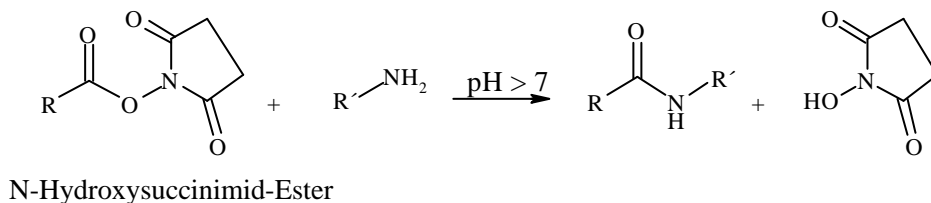
### 2.3.4.1 Aminoreaktive Gruppen

Nahezu alle verfügbaren bifunktionalen Spacer besitzen mindestens eine aminoreaktive Gruppe, da man davon ausgehen kann, daß in allen Proteinen Aminogruppen frei zugänglich sind. Die aminoreaktiven Strukturen lassen sich in drei Gruppen mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untergliedern: die NHS-Ester, die Imidoester und die Azidophenyllderivate.

#### 2.3.4.1.1 NHS-Ester

Die wohl am weitesten verbreitete Gruppe der aminoreaktiven Strukturen stellen die N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) dar. NHS-Ester reagieren unter Bildung von Säureamidbindungen (siehe Abbildung 7) mit den primären Aminogruppen des Proteins (Partis et al. 1983).

Abbildung 7: Reaktionsschema der NHS-Ester-Reaktion



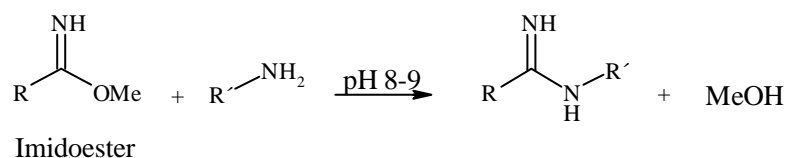
Die Reaktion verläuft unter milden Bedingungen (pH 7-9; Raumtemperatur) und ist deshalb Bestandteil sowohl vieler homobifunktionaler Crosslinker wie beispielsweise des DTSSPs (3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidyl propionat]) (Jung and Moroi 1983) als auch heterobifunktionaler Crosslinker wie z. B. des Sulfo-SMCCs (Sulfosuccinimidyl

4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexan-1-carboxylat) (Partis et al. 1983) oder des Sulfo-MBSs (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester) (Myers et al. 1989).

#### 2.3.4.1.2 Imidoester

Eine weitere Möglichkeit, die Aminogruppen von Proteinen kovalent über einen Spacer zu verknüpfen, bieten die Imidoester (Mattson et al. 1993). Im Gegensatz zu anderen reaktiven Gruppen zeigen die Imidoester keine oder nur sehr geringe Reaktivität gegenüber anderen nukleophilen Gruppen. Bei milden pH-Werten bilden sich Imidoamide, die die Ladung des Konjugates im Vergleich zu den Ausgangsproteinen nicht verändern (siehe Abbildung 8) — ein Vorteil gegenüber anderen Crosslinkern. Die Reaktion wird bei 0°C durchgeführt, da hier die Bindungsraten am höchsten sind. Die Lagerung der Konjugate sollte bei neutralem bis saurem pH-Wert erfolgen, da im alkalischen Milieu die Imidoamide langsam hydrolysieren (Mattson et al. 1993). Die Imidoester werden vor allem als homobifunktionale Crosslinker eingesetzt, wie beispielsweise das DTBP (Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat x 2 HCl) (Shivdasani and Thomas 1988).

Abbildung 8: Reaktionsschema der Imidoester-Reaktion

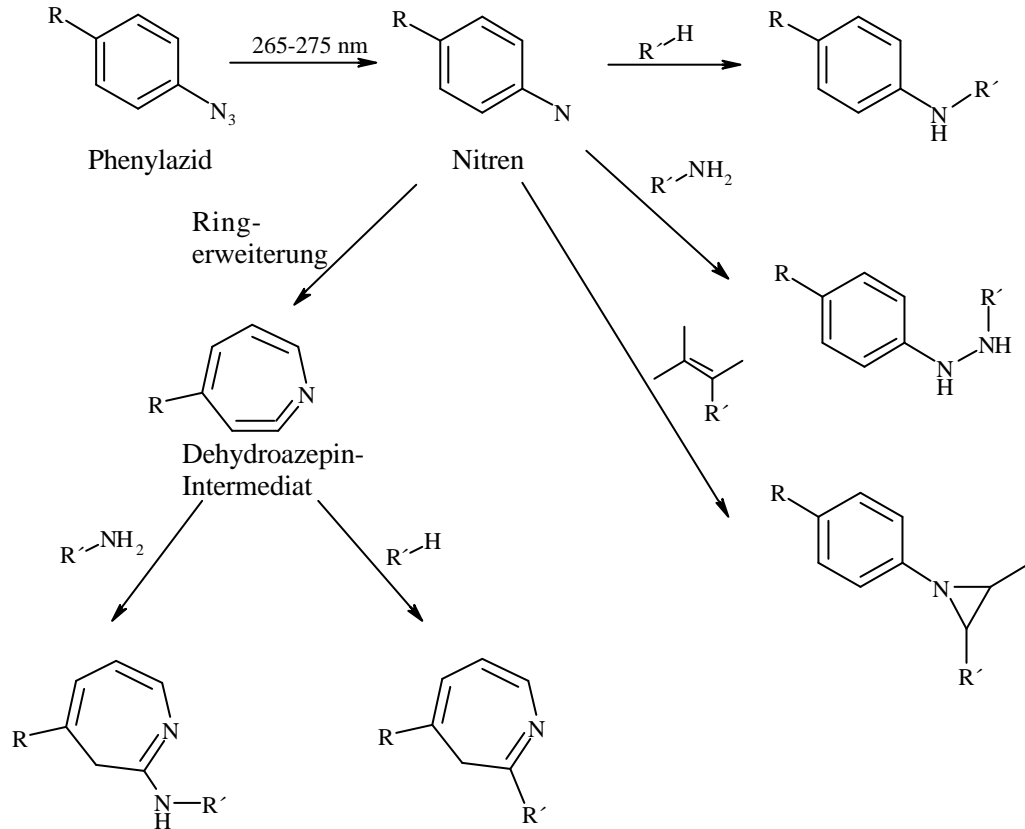


#### 2.3.4.1.3 Azidophenyl-Gruppe

Eine interessante Kopplungsreaktion ist die Photolyse der Phenylazide. Es handelt sich hierbei allerdings nicht um eine rein aminogruppengerichtete Kopplungsreaktion, sondern, wie in Abbildung 9 dargestellt, wird durch diese Reaktion das Protein über verschiedene Wege gekoppelt. Welches bzw. welche der aufgezeigten Produkte letztendlich entstehen, ist nicht vorhersehbar, sollte aber keine Auswirkungen auf die Stabilität des entstehenden Konjugates haben.

Die Reaktion wird durch UV-Strahlung von 265-275 nm angeregt. Trägt der Phenolring eine Nitrogruppe in para-Stellung zur Azidgruppe, kommt es zu einer Verschiebung der Anregungswellenlänge in einen Bereich von 300-460 nm. Spacer, die neben einer der beiden anderen aminoreaktiven Gruppen diese Azidophenylstruktur tragen, ermöglichen es, Proteine miteinander zu koppeln, ohne strukturfremde Thiolgruppen in eines der Proteine einzuführen und dennoch unerwünschte Quervernetzungsreaktionen wie bei den homobifunktionalen Crosslinkern auszuschließen. Beispiele für photoreaktive, heterobifunktionale Crosslinker dieser Art stellen das SAND (Sulfosuccinimidyl 2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat) (Lewis et al. 1977) und das Sulfo-SADP (Sulfosuccinimidyl[4-azidophenyldithio]propionat) (Jung and Moroi 1983) dar.

Abbildung 9: Reaktionsschema der Azidophenyl-Photolyse (nach Hermanson 1999)



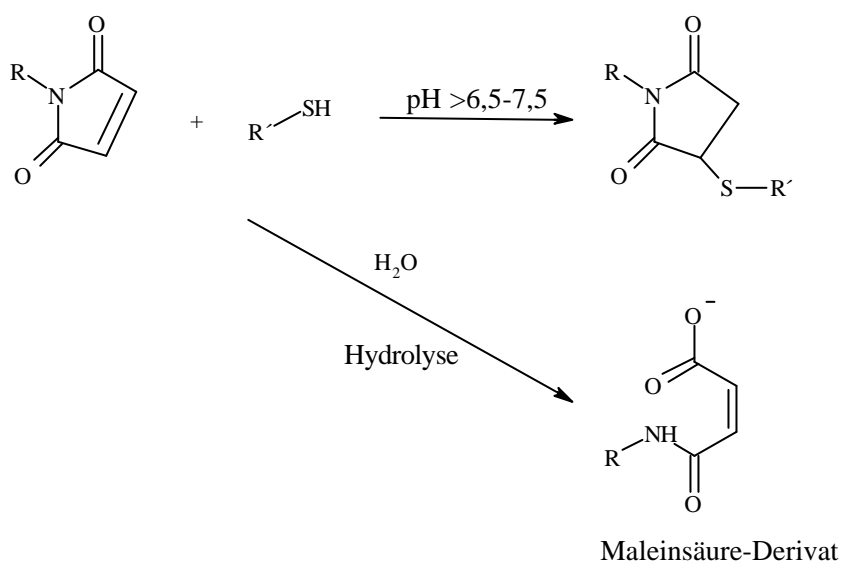
### 2.3.4.2 SH-selektive Gruppen

Neben den Aminogruppen werden freie SH-Gruppen als Angriffspunkt zur Kopplung eines Crosslinkers verwendet. Aufgrund der höheren Nucleophilie der SH-Gruppen ist die Umsetzung mit SH-reaktiven Gruppen im Gegensatz zu den aminoreaktiven Gruppen selektiv.

#### 2.3.4.2.1 Maleimidstruktur

Die Reaktion der Maleimidstruktur ist bei pH-Werten  $< 7$  spezifisch für Thiolgruppen, da SH-Gruppen unter diesen Bedingungen 1000-fach schneller mit dieser Struktur reagieren als Aminogruppen (siehe Abbildung 10). Lediglich bei sehr hohen pH-Werten kann eine Alkylierung der Maleinimide durch Aminogruppen stattfinden (Partis et al. 1983). Die Hydrolyseempfindlichkeit dieser Struktur ist bei pH-Werten  $< 7,5$  vernachlässigbar niedrig, kann aber ab pH 8,0 an Bedeutung gewinnen (Gregory 1955). Die Maleimidstruktur ist Bestandteil vieler heterobifunktionaler Crosslinker, wie beispielsweise des Sulfo-SMPBs (Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]-butyrat) (Martin and Papahadjopoulos 1982) und des SMCCs (Succinimidyl-4-N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) (Partis et al. 1983).

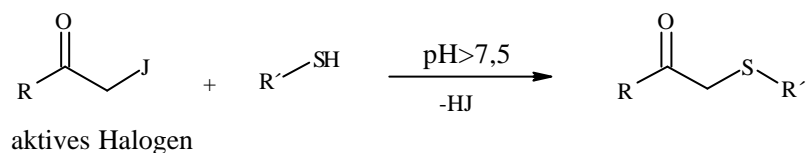
Abbildung 10: Reaktionsschema der Maleimidreaktion



### 2.3.4.2.2 Aktive Halogene

Unter aktiven Halogenen versteht man Alkyljodide oder -bromide. Diese Alkylhalogenide können in Abhängigkeit vom pH-Wert mit verschiedenen Nucleophilen unter Ausbildung kovalenter Bindungen reagieren (siehe Abbildung 11). Bei pH-Werten  $< 9$  und nur einem minimalen Überschuss des Reagenzes ist diese Reaktion SH-gruppenspezifisch (Gurd 1967), da das Thiolat-Anion unter diesen Bedingungen den stärksten nucleophilen Charakter aufweist. Anwendung findet dieses Prinzip in dem heterobifunktionalen Crosslinker SIAB (N-Succinimidyl (4-iodoacetyl) aminobenzoat) (Weltman et al. 1983).

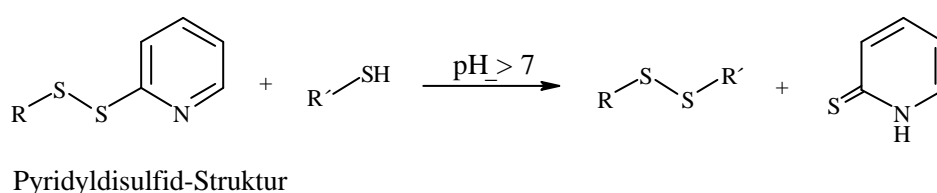
Abbildung 11: Reaktionsschema der Reaktion aktiver Halogene



### 2.3.4.2.3 Pyridyldisulfide

Die 2-Pyridyldisulfidreste der heterobifunktionalen Crosslinker reagieren mit aliphatischen Thiolgruppen unter Ausbildung von Disulfiden (siehe Abbildung 12). Der Vorteil dieses Crosslinkers liegt in der in-vivo-Spaltbarkeit der Disulfidbrücke des Spacers durch Reduktasen, was eine Freisetzung des gekoppelten Arzneistoffs im Zielgewebe erleichtert. Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt zwischen pH 7 und 8 (Carlsson et al. 1978). Ein Beispiel für einen diese SH-reaktive Gruppe tragenden Spacer ist das SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat) (Neurath and Strick 1981)

Abbildung 12: Reaktionsschema der Pyridyldisulfid-Reaktion



### **2.3.5 Weitere Möglichkeiten der Arzneistoffkopplung/Proteinkonjugation**

Neben der Verwendung der kommerziell erwerbbaaren Crosslinker können auch noch andere Verfahren der Quervernetzung und zur Einführung von Spacern genutzt werden. Paige et al. (1995) machten sich die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen amino- und SH-reaktiven Gruppen zunutze und synthetisierten aus Polyethylenglykol einen Maleimid- und NHS-Ester-tragenden heterobifunktionalen Crosslinker. Der Vorteil dieses Crosslinkers im Vergleich zu anderen liegt in der ausgeprägten Hydrophilie der Kette.

Eine direkte Einführung der Pyridyldisulfidstruktur (siehe 2.3.4.2.3) in das Protein zur Kopplung einer thiolgruppentragenden Komponente wurde von King et al. (1978) durchgeführt. Die Einführung der Pyridyldisulfidstruktur erfolgte durch Umsetzung der Aminogruppen mit 2-Iminothiolan und 4,4'-Dithiodipyridin. Nachteil dieser Methode ist das Fehlen eines Spacerarms, der u.U. für die Aktivität des gebundenen Arzneistoffes entscheidend sein kann. Ein ähnliches Prinzip verfolgten Meunier et al. (1999) mit der Einführung einer Pyridyldisulfid-ähnlichen Struktur mit 2-Iminothiolan und 6,6'-Dithiodinicotinsäure.

Suzawa et al. (2000) entwickelten einen enzymatisch spaltbaren Crosslinker. Dieser bestand aus einer Polyethylenglykolkette, an die ein Dipeptid aus L-Alanin und L-Valin angefügt war. Dieses Dipeptid konnte lediglich von dem Enzym Thermolysin gespalten werden, welches ausschließlich in Tumorgewebe zu finden ist. Die Dipeptidstruktur war anderen Enzymsystemen gegenüber inert, so daß eine tumorspezifische Freisetzung des Wirkstoffes erzielt wurde. DeFeo-Jones et al. (2000) erreichten durch den Einsatz eines Protein-Doxorubicinkonjugates, welches selektiv durch ein prostataspezifisches Antigen gespalten werden kann, herausragende Ergebnisse auf dem Gebiet der Prostatakrebsbekämpfung. Neben den enzymatisch spaltbaren Crosslinkern sind auch die säurelabilen Spacer von Bedeutung, die nach Aufnahme des Trägersystems in saure Endosomen den Arzneistoff intrazellulär oder nach Aufnahme in Tumorgewebe, in denen ein leicht saures Milieu herrscht, den Arzneistoff extrazellulär freisetzen (Kratz et al. 1999).





## 3 Material und Methoden

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Durchführung der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden. Sofern bei der Herstellung von Lösungen keine anderen Angaben gemacht sind, wurden diese in entmineralisiertem Wasser (MilliQ-Wasser) hergestellt.

### 3.1 Evaluierung der Herstellungsmethode und Charakterisierung der resultierenden Nanopartikel

#### 3.1.1 Herstellung von Protein-Nanopartikeln

##### 3.1.1.1 Chemikalien und Geräte

<i>Humanes Serumalbumin (HSA), Fraktion V</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Glutaraldehyd 8 %</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Ethanol reinst</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Hydroxylamin x HCl</i> .....	<i>Fluka, Buchs</i>
<i>1N Natronlauge</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>1N Salzsäure</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Magnetrührplatte MR 3001 K</i> .....	<i>Heidolph, Schabach</i>
<i>Gelatine A (porcine skin; 175 Bloom)</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Aceton p.a.</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Gelatine B (bovine skin; 75 Bloom)</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Centrifuge 5417</i> .....	<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Beckman L-80 Ultracentrifuge</i> .....	<i>Beckman Instruments, Palo Alto, USA</i>
<i>Ultraschallbad Transsonic Digital</i> .....	<i>Elma, Singen</i>

##### 3.1.1.2 Herstellung von HSA-Nanopartikeln

Die Nanopartikel (NP) aus humanem Serumalbumin (HSA) wurden in Anlehnung an die Desolvationsmethode von Marty et al. (1978) hergestellt. Dazu wurden zunächst 200 mg HSA in 2,0 mL gereinigtem Wasser gelöst. Unter permanentem Rühren (600-700 U min<sup>-1</sup>) wurde das Protein durch tropfenweise Zugabe von 6,0 mL Ethanol zu Nanopartikeln desolvatisiert. Zur Stabilisierung der partikulären Struktur wurden direkt im Anschluß an die Desolvation 235 µL 8 %-ige Glutaraldehydlösung

langsam zugegeben. Nach 24 h Rühren ( $600 \text{ U min}^{-1}$ ) bei Raumtemperatur (RT) wurden die Partikel wie in 3.1.1.5 beschrieben gewaschen.

### **3.1.1.3 Herstellung von Gelatine A-Nanopartikeln**

Die Gelatine A-Nanopartikel wurden nach einer Zwei-Schritt-Desolvationsmethode hergestellt, die von Coester et al. (2000a) beschrieben wurde. 1,25 g Gelatine A wurden in 25 mL MilliQ-Wasser unter Erhitzen im Wasserbad gelöst. Durch Zusatz von 30 mL Aceton wurde das Protein desolvatisiert. Nach wenigen Minuten sedimentierte ein Teil der Gelatinefraktionen. Der Überstand wurde verworfen und das ausgefallene Protein erneut unter Erwärmen in 25 mL Milli-Q-Wasser gelöst. Die Lösung wurde durch den Zusatz von 400  $\mu\text{L}$  1N Salzsäure sauer gestellt und die Gelatine durch langsames Zutropfen von 75 mL Aceton zu Nanopartikeln desolvatisiert. Zur Quervernetzung wurden 1,5 mL 8 %-ige Glutaraldehydlösung zugesetzt, die Nanopartikel über Nacht rühren lassen und im Anschluß daran gewaschen (siehe 3.1.1.5).

### **3.1.1.4 Herstellung von Gelatine B-Nanopartikeln**

Mit Ausnahme des pH-Wertes wurden die Gelatine B-NP entsprechend der Herstellungsvorschrift für Gelatine A-NP hergestellt. Der pH-Wert beim zweiten Desolvationsschritt wurde mit 400  $\mu\text{L}$  1N Natronlauge korrigiert.

### **3.1.1.5 Waschen der Nanopartikel**

Die Aufreinigung der NP erfolgte durch 5-faches Zentrifugieren und Redispergieren. Bei 20.000 g wurden die Partikel in einer Eppendorf-Zentrifuge oder Ultrazentrifuge 7 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das NP-Pellet im gleichen Volumen MilliQ-Wasser resuspendiert. Um eine vollständige Resuspendierung zu gewährleisten, wurden die Partikel gegebenenfalls mehrfach mit Ultraschall behandelt. Die Gelatine-NP wurden mit einer 30 %-igen Lösung von Aceton in Wasser gewaschen. Nach dem letzten Resuspendierungsschritt wurde das Aceton bei RT über mehrere Stunden verdampft.

### 3.1.2 Physikalische Charakterisierung der Nanopartikel

#### 3.1.2.1 Geräte

<i>Trockenschrank</i> .....	<i>Ehret, Emmendingen</i>
<i>Wägeschiffchen</i> .....	<i>Lüdi AG, Flawil, Schweiz</i>
<i>Mikrowaage Satorius Supermicro</i> .....	<i>Satorius, Göttingen</i>
<i>Goniometer BI-200SM</i> .....	<i>Brookhaven Instr.Corp., Holtsville, USA</i>
<i>Korrelator BI-2030AT</i> .....	<i>Brookhaven Instr.Corp., Holtsville, USA</i>
<i>He-Ne-Laser MN 05-LHP-991, Eff.Leistung 30 mW</i> .....	<i>Melles Griot, Carlsbad, USA</i>
<i>Lazer Zee Meter Model 501</i> .....	<i>Penkam Inc., Bedford Hills, New York, USA</i>
<i>CCD Video Camera LDH 0460</i> .....	<i>Philips, Niederlande</i>
<i>Monitor LDH 2132/10</i> .....	<i>Philips, Niederlande</i>
<i>DMA 48 density meter</i> .....	<i>AP Paar, Graz, Österreich</i>

#### 3.1.2.2 Bestimmung des Nanopartikelgehaltes

Der Nanopartikelgehalt wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust bestimmt. Dazu wurden 50,0 µL NP-Suspension in ein Wägeschiffchen überführt, im Trockenschrank 4 h bei 100°C getrocknet und die Gewichts Differenz mit der Mikrowaage bestimmt. Etwaige Salzzusätze zu den Medien wurden bei der Berechnung berücksichtigt.

#### 3.1.2.3 Bestimmung der Partikelgröße

Die Partikelgröße und die Größenverteilung der Nanopartikel wurden nach dem Prinzip der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ermittelt. Dazu wurden die NP-Präparationen 1:400 mit filtriertem MilliQ-Wasser (Porendurchmesser 0,22 µm) verdünnt. Die „Countrate“ der Proben lag bei RT in einem Bereich von 5-30 kHz, der Meßwinkel betrug 90° bei einer Wellenlänge von 632,9 nm und einer Blendenöffnung des Photomultipliers von 100 µm. Zur Auswertung der Partikelgröße wurde der effektive Durchmesser der Partikel verwendet. Die „total Countrate“ nach einer Meßzeit von 100 s wurde bei konstanter Partikelgröße als Hinweis auf die Partikelanzahl im Meßröhrchen herangezogen.

### 3.1.2.4 Bestimmung des Zetapotentials

Die Zetapotentialbestimmung beruht auf dem Prinzip der Mikroelektrophorese. 100-200  $\mu\text{L}$  der Nanopartikelsuspension wurden zu diesem Zweck mit MilliQ-Wasser, 1mM KCl-Lösung, 0,01M Phosphatpuffer oder 0,02 M PBS pH 7,0 zu 100 mL verdünnt und in die Meßzelle überführt. Nach Anlegen einer Spannung von 150 V wurde die elektrophoretische Mobilität der Probe bestimmt. Aus der elektrophoretischen Mobilität der NP berechnete das Meßgerät über die Smoluchowski-Gleichung das Zetapotential  $\zeta$  der Partikel.

### 3.1.2.5 Bestimmung der Partikeldichte

Um die Dichte reiner HSA-NP bestimmen zu können, wurde zunächst die Dichte einer hinsichtlich Gehalt und Partikelgröße definierten HSA-Nanopartikelsuspension in einem Medium bekannter Dichte gemessen. Der Gehalt der NP-Suspension betrug 10-30  $\text{mg mL}^{-1}$ , als Dispersionsmedium wurde MilliQ-Wasser mit einer Dichte von  $0,9982 \text{ g cm}^{-3}$  bei  $20^\circ\text{C}$  gewählt. Die Dichte der reinen NP berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$\rho_{NP} = \frac{\rho_S \cdot m_{NP}}{m_F + m_{NP} - \rho_S \cdot V_F}$$

Diese Gleichung vereinfacht sich unter der Annahme, daß das Volumen des Dispersionsmediums gleich dem Volumen der Nanopartikelsuspension ist ( $V_F = V_S$ ). Das Partikelvolumen ist also vernachlässigbar klein.

Daraus ergibt sich folgende vereinfachte Gleichung:

$$\rho_{NP} = \frac{\rho_S \cdot C_{NP}}{\rho_F + C_{NP} - \rho_S}$$

$\rho_{NP}$	Dichte der reinen Nanopartikel [ $\text{g cm}^{-3}$ ]
$\rho_S$	Dichte der Nanopartikelsuspension [ $\text{g cm}^{-3}$ ]
$\rho_F$	Dichte des Dispersionsmediums [ $\text{g cm}^{-3}$ ]
$C_{NP}$	Konzentration der Nanopartikel in Suspension [ $\text{g cm}^{-3}$ ]
$m_{NP}$	Masse der Nanopartikel [g]

$m_F$	Masse des Dispersionsmediums [g]
$V_F$	Volumen des Dispersionsmediums [cm <sup>3</sup> ]
$V_S$	Volumen der Nanopartikelsuspension [cm <sup>3</sup> ]

### 3.1.3 Evaluierung des Desolvationsprozesses von HSA

#### 3.1.3.1 Chemikalien und Geräte

<i>Humanes Serumalbumin (HSA), Fraktion V</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Glutaraldehyd 8 %</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Ethanol reinst</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Magnetrührplatte MR 3001 K</i> .....	<i>Heidolph, Schwabach</i>
<i>Magnetrührblock</i>	
<i>Antriebseinheit HP 15ST Variomag</i> .....	<i>H+P Labortechnik GmbH, München</i>
<i>Thermomodul 40ST Variomag</i> .....	<i>H+P Labortechnik GmbH, München</i>
<i>BCA-Protein-Assay-Reagent</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>L-80 Ultracentrifuge</i> .....	<i>Beckman Instruments, Palo Alto, USA</i>
<i>Thermomixer5436</i> .....	<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Photometer U-3000</i> .....	<i>Hitachi, Berkshire, UK</i>
<i>Sterilfilter 0,22 µm</i> .....	<i>Schleicher&amp;Schuell, Dassel</i>

#### 3.1.3.2 Desolvation von HSA mit verschiedenen Ethanolvolumina

In 2,0 mL MilliQ-Wasser wurden 200 mg HSA gelöst. Unter permanentem Rühren (500-600 U min<sup>-1</sup>) wurden zunächst 1,250 mL Ethanol langsam zugetropft. Es folgten weitere 250,0 µL. Um die Partikelbildung besser charakterisieren zu können, wurden sodann 8 x 100,0 µL Aliquote Ethanol zugegeben, es folgten 5 x 250,0 µL, 3 x 500,0 µL und 3 x 1000,0 µL. Nach jeder Ethanolzugabe wurden 50,0 µL der Probe entnommen und mit 5,0 µL 1,6 %-iger Glutaraldehydlösung umgesetzt. Der 1,6 %-ige Glutaraldehyd wurde durch 1:4 Verdünnung aus 8 %-igem Glutaraldehyd hergestellt. Die Proben wurden 2 h unter Schütteln (600 U min<sup>-1</sup>) bei 20°C im Thermomixer quervernetzt. Zur Charakterisierung wurden der Anteil an nichtdesolvatisiertem HSA (siehe 3.1.3.4) und die Partikelgröße (siehe 3.1.2.3) bestimmt.

### 3.1.3.3 Desolvation bei verschiedenen Temperaturen

Der in 3.1.3.2 beschriebene Versuch zur Evaluierung der Desolvation wurde sowohl bei 4°C, bei 30°C als auch bei 40°C wiederholt, um den Einfluß der Thermodynamik auf den Desolvationsprozeß zu untersuchen. Die angegebenen Temperaturen gelten sowohl für die Desolvation als auch für die Quervernetzung. Die Versuche bei 4°C wurden im Kühlraum durchgeführt, konstante 30°C und 40°C konnten mit Hilfe des Thermomoduls und des Thermomixers erreicht werden.

### 3.1.3.4 Bestimmung des Anteils an gelöstem nichtdesolvatisierten HSA nach der Desolvation

Nach Homogenisierung der nicht aufgereinigten Proben im Ultraschallbad wurden jeweils 20,0 µL der Proben abgenommen, mit 180 µL MilliQ-Wasser verdünnt und die NP in der Ultrazentrifuge bei 105.000 g über 40 min abzentrifugiert. Die Menge an gelöstem HSA wurde mit einem Standard BCA-Protein-Assay quantifiziert. Dazu wurden 30,0 µL des verdünnten Überstandes mit 800,0 µL BCA Arbeitsreagenz versetzt, die Proben 30 min bei 40°C im Thermomixer inkubiert und anschließend nach Abkühlung auf RT photometrisch in Quarz-Halbmikroküvetten bei 562 nm gegen Wasser vermessen. Zur Ermittlung des Proteingehaltes wurden 10,0 µL, 20,0 µL und 30,0 µL einer Standard HSA-Lösung (2,0 mg mL<sup>-1</sup>) unter den gleichen Bedingungen mit dem BCA Reagenz umgesetzt, wie für die NP-Proben beschrieben.

## 3.1.4 Evaluierung der Quervernetzung

### 3.1.4.1 Chemikalien und Geräte

<i>2,4,6-Trinitrobenzensäure (TNBS) 5%</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Natriumhydrogencarbonat</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Microcon microconcentrators 10.000</i> .....	<i>Amicon, Witten</i>
<i>Thermomixer 5436</i> .....	<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Photometer U-3000</i> .....	<i>Hitachi, Berkshire, UK</i>
<i>Centrifuge 5417</i> .....	<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Formaldehyd 35%</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Glutaraldehyd 8%</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>

### **3.1.4.2 Bestimmung freier Aminogruppen an der Partikeloberfläche**

Die quantitative Bestimmung der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche erfolgte mit Hilfe der TNBS-Reaktion. 75,0-300,0  $\mu\text{L}$  der gewaschenen NP wurden zu 400,0  $\mu\text{L}$  mit MilliQ-Wasser verdünnt und mit 400,0  $\mu\text{L}$  4 %-iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung pH 8,5 versetzt. Nach Zugabe von 400,0  $\mu\text{L}$  0,1 %-iger TNBS-Lösung wurden die Proben für 2 h bei 40°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die NP durch Zentrifugation (20.000 g; 25 min) abgetrennt. Nicht abreagiertes TNBS wurde im Überstand bestimmt, indem 125,0  $\mu\text{L}$  des Überstandes mit 500,0  $\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser verdünnt und bei 349 nm photometrisch gegen MilliQ-Wasser vermessen wurden. Um den Gehalt an nicht abreagiertem TNBS und damit den Gehalt an freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche berechnen zu können, wurde eine TNBS-Referenz-Probe unter den identischen Bedingungen wie die partikelhaltigen Proben bereitet, indem der Präparation anstelle von NP lediglich MilliQ-Wasser zugefügt wurde.

Proben, die gelöstes Protein enthielten, wurden durch Microcon 10.000 Molekularfilter filtriert (10.000 g; 15 min), um gelöste TNBS-Protein-Konjugate von dem nichtabreagierten TNBS zu trennen.

### **3.1.4.3 Quervernetzung der HSA-Nanopartikel**

#### *3.1.4.3.1 Quervernetzung mit verschiedenen Glutaraldehydkonzentrationen*

Die Desolvatation des HSAs erfolgte wie in 3.1.1.2 beschrieben. Zur Quervernetzung wurden Volumina von 750,0  $\mu\text{L}$  desolvatisierter NP in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und dort mit verschiedenen Mengen einer 2,7 %-igen Glutaraldehydlösung versetzt (2,64  $\mu\text{L}$ ; 5,28  $\mu\text{L}$ ; 10,50  $\mu\text{L}$ ; 15,84  $\mu\text{L}$ ; 21,12  $\mu\text{L}$ ; 26,40  $\mu\text{L}$ ; 31,70  $\mu\text{L}$ ; 52,80  $\mu\text{L}$ ). Das fehlende Volumen wurde mit MilliQ-Wasser ergänzt. Nach 24 h Reaktion bei RT wurde die Partikelgröße (siehe 3.1.2.3), das Zetapotential (siehe 3.1.2.4) sowie der Anteil an gelöstem HSA (siehe 3.1.3.4) im Medium bestimmt und die Anzahl freier Aminogruppen (siehe 3.1.4.2) nach 5-fachem Waschen der Partikel (siehe 3.1.1.5) untersucht.

### 3.1.4.3.2 *Quervernetzung durch Einwirkung von Wärme*

50 mg HSA wurden, wie in 3.1.1.2 beschrieben, zu Nanopartikeln desolvatisiert. Anstatt die entstandenen NP mit Glutaraldehyd quervernetzen, wurden jeweils 250  $\mu\text{L}$  der Präparation bei 50°C, 60°C bzw. 70°C für 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h im Thermomixer unter stetigem Schütteln (600  $\text{U min}^{-1}$ ) inkubiert. Anschließend wurden die NP gereinigt und die Anzahl freier Aminogruppen an der Partikeloberfläche (siehe 3.1.4.2) sowie die Partikelgröße (siehe 3.1.2.3) bestimmt. Da nicht alle Partikelpräparationen stabil waren, wurden die Proben der 50°C Hitzestabilisierung zusätzlich durch Microcon 10.000 Molekularfilter filtriert.

### 3.1.4.4 **Quervernetzung der Gelatine-Nanopartikel**

#### 3.1.4.4.1 *Quervernetzung mit Glutaraldehyd*

Die Gelatine A wurde desolvatisiert wie in 3.1.1.3 beschrieben. Zur Quervernetzung wurden 1,5 mL der Partikelsuspension in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit 3,0  $\mu\text{L}$ , 6,0  $\mu\text{L}$ , 9,0  $\mu\text{L}$ , 12,0  $\mu\text{L}$ , 15,0  $\mu\text{L}$ , 20,0  $\mu\text{L}$ , 30,0  $\mu\text{L}$  bzw. 40,0  $\mu\text{L}$  einer 4 %-igen Glutaraldehydlösung versetzt. Das fehlende Volumen wurde mit MilliQ-Wasser ergänzt und die Proben 24 h bei 20°C im Thermomixer unter Schütteln (600  $\text{U min}^{-1}$ ) inkubiert. Zur Charakterisierung wurde die Anzahl freier Aminogruppen auf der Partikeloberfläche (siehe 3.1.4.2) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte wie in 3.1.3.4 für HSA beschrieben.

Die Gelatine B wurde desolvatisiert wie in 3.1.1.4 beschrieben. Nach der Überführung von 1,5 mL der Partikelsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 und 40,0  $\mu\text{L}$  einer 2 %-igen Glutaraldehydlösung zugesetzt und die Proben 24 h im Thermomixer bei 20°C unter Schütteln (600  $\text{U min}^{-1}$ ) inkubiert. Wie bei den Gelatine A-NP wurde anschließend die Anzahl freier Aminogruppen auf der Partikeloberfläche (siehe 3.1.4.2) bestimmt.



### 3.1.4.4.2 Quervernetzung mit Formaldehyd

Die Gelatine A-NP wurden durch Desolvation mit Aceton hergestellt und mit den Volumina Aldehyd quervernetzt, wie in 3.1.4.4.1 beschrieben. Anstelle des Glutaraldehyds wurde 35 %-iger Formaldehyd zur Quervernetzung verwendet.

## 3.1.5 Quantitative Bestimmung der Carboxylgruppen

### 3.1.5.1 Chemikalien und Geräte

<i>Norephedrinhydrochlorid</i> .....			<i>Fluka, Buchs</i>
<i>Glycinmethylester</i> .....			<i>Fluka, Buchs</i>
<i>Cystaminiumdichlorid</i> .....			<i>Merck-Schuchardt, Hohenbrunn</i>
<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (=EDC)</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Dithiotreitol (=Clelands Reagenz; DTT)</i> .....			<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>N-Hydroxysulfosuccinimid = Sulfo-NHS</i> .....			<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>BCA-Protein-Assay-Reagent</i> .....			<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>MES-Puffer (BupH<sup>+</sup> MES buffered Saline Pack)pH 4,7</i> .....			<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>Ammoniak (konzentriert)</i> .....			<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Acetonitril gradient grade</i> .....			<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Triethylacetatpuffer pH 4,0</i>	<i>Triethylamin</i>	<i>0,625 g</i>	<i>Fluka, Buchs</i>
	<i>Eisessig</i>	<i>0,375 g</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>	
<i>Phosphatpuffer pH 7,4</i>	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>3,360 g</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	<i>0,460 g</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 1000,0 mL</i>	
<i>Carbonatpuffer pH 11,25</i>	<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	<i>1,550 g</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></i>	<i>1,050 g</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	

#### HPLC-Anlage:

<i>L-6220 Intelligent Pump</i> .....	<i>Hitachi, Tokyo, Japan</i>
<i>Säulenofen L-7350</i> .....	<i>Hitachi, Tokyo, Japan</i>
<i>Autosampler L-7200</i> .....	<i>Hitachi, Tokyo, Japan</i>
<i>Lamda-Max Model 481</i> .....	<i>Waters, Eschborn</i>
<i>PC-Integration Pack</i> .....	<i>Kontron, Milan, Italy</i>
<i>LiChrosorb-RP8 (5 µm) 125-4</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>

### **3.1.5.2 Bindung von Norephedrin**

#### *3.1.5.2.1 Quantitative Bestimmung des Norephedrins*

Die quantitative Bestimmung des Norephedrins erfolgte durch HPLC nach chromatographischer Auftrennung mit einer HPLC-RP8-Säule. Als Fließmittel A wurde Acetonitril, als Fließmittel B Triethylacetatpuffer pH 4,0 verwendet. Das System wurde isokratisch mit einem Verhältnis A:B von 80:20 betrieben. Bei einem Fluß von  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  und einem Einspritzvolumen von  $30 \text{ }\mu\text{L}$  betrug die Laufzeit pro Probe 10 min. Der Norephedrinpeak zeigte eine Retentionszeit von etwa 4 min und wurde photometrisch bei 220 nm bestimmt.

#### *3.1.5.2.2 Bindung des Norephedrins an die Partikeloberfläche*

Zur Kopplung des Norephedrins wurden  $500,0 \text{ }\mu\text{L}$  Partikelsuspension (siehe 3.1.1.2) mit  $500,0 \text{ }\mu\text{L}$  Norephedrinlösung ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) versetzt. Zu den Proben wurden  $20,0 \text{ }\mu\text{L}$ ,  $100,0 \text{ }\mu\text{L}$ ,  $200,0 \text{ }\mu\text{L}$ ,  $300,0 \text{ }\mu\text{L}$  und  $400,0 \text{ }\mu\text{L}$  eines EDC-Sulfo-NHS-Gemisches ( $50 \text{ mg EDC} + 10 \text{ mg Sulfo-NHS pro mL}$ ) pipettiert, das fehlende Volumen mit MilliQ-Wasser ergänzt und die Proben über Nacht bei RT stehen gelassen. Zur Bestimmung der Bindungsrate wurden die NP abzentrifugiert ( $20.000 \text{ g}$ ;  $20 \text{ min}$ ) und der Norephedringehalt in den Partikelüberständen mittels HPLC-Analytik (siehe 3.1.5.2.1) vermessen. Als Referenz dienten Norephedrinproben, die im gleichen Verhältnis mit EDC und Sulfo-NHS umgesetzt wurden wie die Partikelproben.

### **3.1.5.3 Bindung von Glycinmethylester**

#### *3.1.5.3.1 Quantitative Bestimmung des Glycinmethylesters*

Die quantitative Bestimmung des Glycinmethylesters erfolgte mit einer chromatographischen Auftrennung. Als Säule wurde eine LiChrosorb-RP-8-Säule verwendet. Ein Phosphatpuffer pH 7,4 stellte Fließmittel A dar, Fließmittel B bestand aus reinem Acetonitril. Während der ersten 5 min beinhaltete der Gradient ausschließlich Fließmittel A, in den folgenden 5 min wurde der Anteil an B kontinuierlich auf 20 % erhöht. Nach 10 min Gesamtlaufzeit wurde der Acetonitrilanteil wieder über 5 min auf Null reduziert und das System im Anschluß

daran noch weitere 15 min mit reinem Fließmittel A equilibriert. Das Injektionsvolumen betrug 50,0  $\mu\text{L}$ , der Fluß lag bei 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Die Peaks wurden bei 220 nm photometrisch detektiert.

#### *3.1.5.3.2 Bindung des Glycinmethylesters an die Partikeloberfläche mit EDC*

500,0  $\mu\text{L}$  NP (siehe 3.1.1.2) wurden mit 500,0  $\mu\text{L}$  Glycinmethylesterlösung (4  $\text{mg mL}^{-1}$ ) versetzt und 250,0  $\mu\text{L}$  EDC-Lösung (20  $\text{mg mL}^{-1}$ ) zupipettiert. Nach Inkubation der Proben über Nacht bei RT wurden die Partikel abzentrifugiert (20.000 g; 20 min) und mit HPLC der Gehalt des Glycinmethylesters im Partikelüberstand bestimmt. Als Referenz dienten mit EDC versetzte Glycinmethylesterproben.

#### **3.1.5.4 Bestimmung von Sulfo-NHS-Estern (N-Hydroxysulfosuccinimidester)**

Zur Aktivierung der Carboxylgruppen mit Sulfo-NHS wurden 200,0  $\mu\text{L}$  der NP-Suspension (siehe 3.1.1.2) mit 200,0  $\mu\text{L}$  EDC-Lösung (7  $\text{mg mL}^{-1}$ ) und 200,0  $\mu\text{L}$  Sulfo-NHS-Lösung (1,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Aufreinigung der Partikelproben (siehe 3.1.1.5) wurden die Sulfo-NHS-aktivierten Gruppen durch Umsetzung mit Ammoniumhydroxid oder dem BCA-Protein-Assay-Reagent quantitativ bestimmt.

##### *3.1.5.4.1 Bestimmung mit Ammoniumhydroxid*

100,0  $\mu\text{L}$  der gewaschenen Partikelprobe wurden mit 900,0  $\mu\text{L}$  0,1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  versetzt und die Proben 2 min bei RT inkubiert. Im Anschluß wurden die NP über 20 min bei 20.000 g abzentrifugiert und der Überstand bei 260 nm photometrisch vermessen. Die Standards zur Berechnung der Sulfo-NHS-Bindung bestanden aus reinem Sulfo-NHS, das unter den gleichen Bedingungen wie die Proben mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  umgesetzt wurde.

##### *3.1.5.4.2 Bestimmung mit BCA-Protein-Assay-Reagent*

Vor der Zugabe von 2,0 mL des BCA-Arbeitsreagenzes wurden 100,0  $\mu\text{L}$  der Partikelpräparation mit 50,0  $\mu\text{L}$  Carbonatpuffer pH 11,25 versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 60°C auf dem Thermomixer wurden die NP abzentrifugiert (20.000 g;

20 min) und die Proben nach 1:5 Verdünnung bei 562 nm photometrisch vermessen. Die Sulfo-NHS-Standards ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden entsprechend behandelt.

### 3.1.5.5 Bindung von Cystamin

Die gemäß 3.1.1.2 hergestellten HSA-NP ( $250,0 \mu\text{L}$ ) wurden zur quantitativen Bestimmung der Carboxylgruppen mit  $750,0 \mu\text{L}$  MES-Puffer versetzt und  $100,0 \mu\text{L}$  Cystaminlösung ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zugesetzt. Nach Zugabe von  $50 \text{ mg EDC}$  in  $250,0 \mu\text{L}$  MilliQ-Wasser wurden die Proben unter permanentem Schütteln bei  $600 \text{ U min}^{-1}$  und  $20^\circ\text{C}$  auf dem Thermomixer über Nacht inkubiert und anschließend wie in 3.1.1.5 beschrieben aufgereinigt. Zur Spaltung der Disulfidbrücken wurden  $100,0 \mu\text{L}$  DTT-Lösung ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu der Probe pipettiert, erneut über Nacht bei RT inkubiert, die Proben aufgereinigt und die freien Sulfhydrylgruppen, wie in 3.2.1.2 beschrieben bestimmt. Als Negativkontrolle dienten reine, nicht mit EDC behandelte HSA-NP, die unter den gleichen Bedingungen wie die Probe mit DTT umgesetzt wurden.

## 3.2 Einführung von Sulfhydrylgruppen an die HSA-Nanopartikeloberfläche

### 3.2.1 Bestimmung reaktiver Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche

#### 3.2.1.1 Chemikalien und Geräte

<i>Ellmans Reagenz (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure))</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>Phosphatpuffer pH 7,5</i>	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</i> <i>16,8 g</i> ..... <i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</i> <i>2,3 g</i> ..... <i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaEDTA</i> <i>0,37 g</i> ..... <i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i> <i>ad 1000 mL</i>
<i>L-Cystein x HCl</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>

#### 3.2.1.2 Quantitative Bestimmung

Je nach zu erwartendem Sulfhydrylgruppengehalt wurden  $50,0\text{-}200,0 \mu\text{L}$  der Partikelpräparation mit Phosphatpuffer pH 7,5 zu  $1465,0 \mu\text{L}$  verdünnt und anschließend mit  $35,0 \mu\text{L}$  einer  $0,4 \%$ -igen 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)-

Lösung (=Ellmans Reagenz) versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die NP abzentrifugiert (20.000 g; 20 min) und der Überstand, gegebenenfalls verdünnt, photometrisch bei 412 nm in Quarz-Halbmikroküvetten gegen Wasser vermessen. Zur Quantifizierung der Thiolgruppen wurde eine L-Cysteinstandardlösung (10-20 mg/25 mL MilliQ-Wasser) bereitet, von der je nach zu erwartender Anzahl an Thiolgruppen für eine Verdünnungsreihe 10 bis 60 µL entsprechend den Partikelproben mit Phosphatpuffer verdünnt und mit Ellmans Reagenz umgesetzt wurden.

### **3.2.2 Einführung von Thiolgruppen durch Reduktion von Disulfidbrücken**

#### **3.2.2.1 Chemikalien und Geräte**

*Dithiotreitol (=Clelands Reagenz; DTT)..... Pierce, Rockfort, Illinois, USA*  
*Cystaminiumdichlorid..... Merck-Schuchardt, Hohenbrunn*

#### **3.2.2.2 Einführung von Sulfhydrylgruppen mit Clelands Reagenz**

Die HSA-NP wurden hergestellt wie in Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben. Anschließend wurden die Partikel mit 0,35 mg DTT/mg HSA-NP umgesetzt und unter permanentem Rühren ( $600 \text{ U min}^{-1}$ ) über Nacht bei RT inkubiert. Die Partikel wurden gewaschen (siehe 3.1.1.5), die Anzahl reaktiver Gruppen quantifiziert (siehe 3.2.1.2) und die NP bei Temperaturen zwischen 2°C und 8°C gelagert.

#### **3.2.2.3 Evaluierung der DTT-Konzentration**

Die unmodifizierten HSA-NP wurden hergestellt, wie in 3.1.1.2 beschrieben. 500,0 µL der Partikelpräparation wurden mit 10,0 µL, 20,0 µL, 60,0 µL, 100,0 µL, 200,0 µL, 400,0 µL und 750,0 µL der DTT-Lösung ( $60 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Eppendorf Reaktionsgefäßen versetzt und das Volumen mit MilliQ-Wasser ergänzt. Nach 24-stündiger Inkubation bei RT wurden die Partikelproben gewaschen und die Anzahl der eingeführten Sulfhydrylgruppen bestimmt (siehe 3.2.1.2).

### 3.2.2.4 Beendigung der Clelands Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten

Zur Evaluierung der Reaktionszeit des DTTs wurde die Spaltung der Disulfidbrücken durch den Zusatz eines Überschusses an Cystamin nach verschiedenen Reaktionszeiten abgebrochen. Je 125,0  $\mu\text{L}$  der NP-Suspension wurden mit 375,0  $\mu\text{L}$  der DTT-Lösung versetzt. Durch Zusatz von 500,0  $\mu\text{L}$  Cystaminlösung ( $80 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurde die Reaktion nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h bzw. 24 h abgebrochen. Nach Reinigung der NP (siehe 3.1.1.5) wurden die freien SH-Gruppen quantifiziert (siehe 3.2.1.2).

### 3.2.2.5 Standardvorschrift

Als Ausgangspunkt dienen HSA-NP, die nach der Vorschrift in 3.1.1.2 hergestellt wurden. Zu der NP-Suspension, die 120 mg Partikel in 4-6 mL enthielt, wurden 2,0 mL DTT-Lösung ( $25 \text{ mg mL}^{-1}$  DTT) pipettiert. Die Präparation wurde über Nacht bei RT inkubiert und, wie in 3.1.1.5 beschrieben, aufgereinigt.

## 3.2.3 Quenchen freier Glutaraldehydgruppen

### 3.2.3.1 Chemikalien und Geräte

*L-Cystein x HCl*.....*Sigma, Steinheim*  
*Dithiothreitol (=Clelands Reagenz; DTT)*..... *Pierce, Rockfort, Illinois, USA*  
*Glutaraldehyd 8 %*.....*Sigma, Steinheim*  
*Cystaminiumdichlorid*..... *Merck-Schuchardt, Hohenbrunn*

### 3.2.3.2 Mit L-Cystein

#### 3.2.3.2.1 Evaluierung der L-Cysteinkonzentration

Das HSA wurde desolvatisiert und die NP mit Glutaraldehyd quervernetzt, wie in der allgemeinen Herstellungsverfahren in 3.1.1.2 beschrieben. Zwei Stunden nach der Glutaraldehydzugabe wurde die NP-Suspension in Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert (500,0  $\mu\text{L}$ ) und mit 1,60  $\mu\text{L}$ , 3,20  $\mu\text{L}$ , 6,25  $\mu\text{L}$ , 12,50  $\mu\text{L}$ , 18,75  $\mu\text{L}$ , 25,00  $\mu\text{L}$ , 50,00  $\mu\text{L}$ , 75,00  $\mu\text{L}$ , 100,00  $\mu\text{L}$ , 125,00  $\mu\text{L}$  und 250,00  $\mu\text{L}$  der L-Cysteinlösung ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) versetzt. Das Volumen wurde mit MilliQ-Wasser zu 750  $\mu\text{L}$  ergänzt und die Proben über Nacht bei RT inkubiert. Nach dem Waschen

(siehe 3.1.1.5) wurden je 100,0  $\mu\text{L}$  DTT-Lösung ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in die Eppendorf Gefäße pipettiert und die Proben erneut über Nacht bei RT inkubiert. Nach Reinigung der NP wurde die Anzahl der freien SH-Gruppen an der Partikeloberfläche bestimmt (siehe 3.2.1.2).

#### *3.2.3.2.2 Einfluß der Quervernetzungszeit*

Die NP wurden wie in Abschnitt 3.2.3.2.1 beschrieben, hergestellt. 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min und 180 min nach der Glutaraldehydzugabe wurden je 200,0  $\mu\text{L}$  der L-Cysteinlösung ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu 500,0  $\mu\text{L}$  der Partikelsuspension pipettiert, die Proben über Nacht bei  $20^\circ\text{C}$  im Thermomixer geschüttelt, gereinigt und die freien SH-Gruppen bestimmt (siehe 3.2.1.2).

#### *3.2.3.2.3 Einfluß der Glutaraldehydkonzentration*

Das HSA wurde desolvatisiert, wie in der allgemeinen Herstellungsvorschrift in 3.1.1.2 beschrieben. Zur Quervernetzung wurden Volumina von 14,4  $\mu\text{L}$ , 21,6  $\mu\text{L}$ , 28,9  $\mu\text{L}$ , 36,1  $\mu\text{L}$ , 43,4  $\mu\text{L}$ , 50,5  $\mu\text{L}$ , 57,7  $\mu\text{L}$ , 64,9  $\mu\text{L}$  und 72,2  $\mu\text{L}$  einer 8 %-igen Glutaraldehydlösung langsam zu je 500,0  $\mu\text{L}$  des desolvatisierten Proteins zugetropft. Das Volumen wurde mit MilliQ-Wasser zu 572,2  $\mu\text{L}$  ergänzt. Nach zwei Stunden Quervernetzen bei RT wurden je Probe 200  $\mu\text{L}$  einer L-Cysteinlösung ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zugegeben, die Proben über Nacht bei RT inkubiert, anschließend gereinigt (siehe 3.1.1.5) und die SH-Gruppen quantifiziert (siehe 3.2.1.2).

#### **3.2.3.3 Mit Cystamin**

Die HSA-NP wurden hergestellt, wie in 3.2.3.2.1 beschrieben. Zwei Stunden nach der Glutaraldehydzugabe wurden zu jeweils 500  $\mu\text{L}$  der quervernetzten Partikel 0,0  $\mu\text{L}$ , 1,6  $\mu\text{L}$ , 3,2  $\mu\text{L}$ , 6,2  $\mu\text{L}$ , 12,5  $\mu\text{L}$ , 25,0  $\mu\text{L}$  bzw. 75,0  $\mu\text{L}$  der Cystaminlösung ( $25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pipettiert. Das Volumen wurde mit MilliQ-Wasser ergänzt und die Proben 24 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Partikel (siehe 3.1.1.5) wurden 100,0  $\mu\text{L}$  einer DTT-Lösung ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zugegeben und erneut über Nacht bei RT inkubiert und die NP aufgereinigt.

## 3.2.4 Modifikation der Carboxylgruppen

### 3.2.4.1 Chemikalien und Geräte

<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid(=EDC)</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Cystaminiumdichlorid</i> .....	<i>Merck-Schuchardt, Hohenbrunn</i>
<i>Dithiotreitol (=Clelands Reagenz; DTT)</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>MES-Puffer (BupH<sup>®</sup> MES buffered Saline Pack) pH 4,7</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>Hydroxylamin x HCl</i> .....	<i>Fluka, Buchs</i>
<i>L-Cystein x HCl</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Thermomixer 5436</i> .....	<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>

### 3.2.4.2 Kopplung von Cystamin mit EDC

#### 3.2.4.2.1 Evaluierung der Reaktionszeit

Die HSA-NP wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Abschnitt 3.1.1.2 hergestellt. Je 250,0  $\mu\text{L}$  der Partikelpräparation wurden mit 500,0  $\mu\text{L}$  MES-Puffer pH 4,7 verdünnt, sowie mit 100,0  $\mu\text{L}$  Cystaminlösung (110  $\text{mg mL}^{-1}$ ) und 100,0  $\mu\text{L}$  EDC-Lösung (130  $\text{mg mL}^{-1}$ ) versetzt. Nach 15 min, 30 min, 45 min, 2 h, 6 h und 24 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Hydroxylaminhydrochloridlösung (125  $\text{mg mL}^{-1}$ ) beendet. 30 min nach Abstoppen der letzten Probe wurden die NP gereinigt (siehe 3.1.1.5), zur Spaltung der Cystamin-Disulfidbrücken mit 100,0  $\mu\text{L}$  DTT-Lösung (30  $\text{mg mL}^{-1}$ ) versetzt, am folgenden Tag erneut aufgereinigt und die Anzahl der eingeführten SH-Gruppen bestimmt (siehe 3.2.1.2).

#### 3.2.4.2.2 Evaluierung der EDC-Konzentration

Die HSA-NP wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Abschnitt 3.1.1.2 hergestellt. Zu 500,0  $\mu\text{L}$  der NP-Suspension wurden 700,0  $\mu\text{L}$  des MES-Puffers pipettiert und 100,0  $\mu\text{L}$  der Cystaminlösung (90  $\text{mg mL}^{-1}$ ) hinzugefügt. Zur Kopplung wurden verschiedene Volumina (0,0  $\mu\text{L}$ , 20,0  $\mu\text{L}$ , 30,0  $\mu\text{L}$ , 40,0  $\mu\text{L}$ , 50,0  $\mu\text{L}$ , 100,0  $\mu\text{L}$ , 150,0  $\mu\text{L}$  und 200,0  $\mu\text{L}$ ) der EDC-Lösung (110  $\text{mg mL}^{-1}$ ) zugegeben. Das fehlende Volumen wurde mit MilliQ-Wasser ergänzt und die Proben über Nacht bei RT inkubiert. Nach Reinigung der NP (siehe 3.1.1.5) wurden je Probe 100,0  $\mu\text{L}$  DTT-



Lösung ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zupipettiert und erneut über Nacht bei RT inkubiert, gereinigt und die Anzahl Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche bestimmt (siehe 3.2.1.2).

#### 3.2.4.2.3 *Evaluierung der Cystaminkonzentration*

Die HSA-NP wurden nach der allgemeinen Vorschrift in 3.1.1.2 hergestellt. Je  $250,0 \mu\text{L}$  der NP-Präparation wurden mit  $500,0 \mu\text{L}$  MES-Puffer auf pH 4,7 eingestellt. Zur Evaluierung der Cystaminkonzentration wurden Volumina von  $0,0 \mu\text{L}$ ,  $12,5 \mu\text{L}$ ,  $25,0 \mu\text{L}$ ,  $50,0 \mu\text{L}$ ,  $100,0 \mu\text{L}$ ,  $200,0 \mu\text{L}$  und  $500,0 \mu\text{L}$  der Cystaminlösung ( $26 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und je  $100,0 \mu\text{L}$  der EDC-Lösung ( $110 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zugegeben. Das fehlende Volumen wurde mit MilliQ-Wasser ergänzt und die Proben 24 h inkubiert, dann gereinigt (siehe 3.1.1.5), mit  $100,0 \mu\text{L}$  der DTT-Lösung ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) über Nacht inkubiert und vor der SH-Gruppenbestimmung erneut gewaschen.

#### 3.2.4.2.4 *Standardvorschrift*

Die HSA-NP wurden hergestellt, wie in 3.1.1.2 beschrieben.  $1,5 \text{ mL}$  der erhaltenen Partikelsuspension ( $\approx 45 \text{ mg}$  Partikel) wurden mit  $2,5 \text{ mL}$  MES-Puffer pH 4,7 versetzt und  $500,0 \mu\text{L}$  Cystaminlösung ( $216 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zupipettiert. Nach der Zugabe von  $100,0 \mu\text{L}$  EDC-Lösung ( $66 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden die Proben über Nacht bei RT ( $600 \text{ U min}^{-1}$ ) gerührt und anschließend gewaschen (siehe 3.1.1.5). Zur Spaltung der Disulfidbrücken des Cystamins wurden  $18 \text{ mg}$  DTT in  $200 \mu\text{L}$  MilliQ-Wasser gelöst und zur Präparation hinzugefügt. Nach Inkubation der Partikel über Nacht bei RT wurde die Partikelpräparation erneut aufgereinigt.

#### 3.2.4.3 **Kopplung von L-Cystein mit EDC**

Die Proben für diese Oberflächenmodifikation der NP wurden so bereit, wie für die Kopplung von Cystamin mit verschiedenen EDC-Konzentrationen in 3.2.4.2.2 beschrieben. Anstelle der Cystaminlösung wurden  $100,0 \mu\text{L}$  einer L-Cysteinlösung ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu den Proben gegeben und Volumina von  $0,0 \mu\text{L}$ ,  $50,0 \mu\text{L}$ ,  $100,0 \mu\text{L}$ ,  $200,0 \mu\text{L}$ ,  $300,0 \mu\text{L}$  und  $400,0 \mu\text{L}$  der EDC-Lösung hinzugefügt.

### 3.2.5 Modifikation der Aminogruppen mit Trauts Reagenz

#### 3.2.5.1 Chemikalien und Geräte

<i>2-Iminothiolan x HCl (Trauts Reagenz)</i> .....		<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>Hydroxylamin x HCl</i> .....		<i>Fluka, Buchs</i>
<i>TRIS-Puffer pH 8,5</i>	<i>TRIS</i>	<i>1,515 g ..... Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaCl</i>	<i>2,192 g ..... Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaEDTA</i>	<i>0,093 g ..... Caelo, Hilden</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 50 mL</i>

#### 3.2.5.2 Evaluierung der 2-Iminothiolankonzentration

Die NP wurden, wie in der allgemeinen Herstellungsvorschrift in 3.1.1.2 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurden 500,0 µL Aliquote der Partikelsuspension mit 1,0 mL TRIS-Puffer pH 8,5 verdünnt und mit verschiedenen Volumina (0,0 µL, 12,5 µL, 25,0 µL, 50,0 µL, 100,0 µL, 250,0 µL und 500,0 µL) einer wäßrigen 2-Iminothiolanlösung (26 mg mL<sup>-1</sup>) versetzt. Das Volumen wurde zu 2,0 mL ergänzt. Die Proben wurden über Nacht bei RT inkubiert, am nächsten Tag gereinigt (siehe 3.1.1.5) und die Anzahl der Thiolgruppen an der Partikeloberfläche bestimmt (siehe 3.2.1.2).

#### 3.2.5.3 Evaluierung der Reaktionszeit

Die NP wurden hergestellt, wie in der allgemeinen Herstellungsvorschrift in 3.1.1.2 beschrieben. Zur Evaluierung der Reaktionszeit wurden je 250,0 µL der Partikelpräparation mit 1,0 mL TRIS-Puffer pH 8,5 verdünnt und mit 250,0 µL Trauts Reagenz (25,5 mg mL<sup>-1</sup>) versetzt. Nach 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 6 h bzw. 24 h wurde die Reaktion durch Zusatz von 100,0 µL Hydroxylaminhydrochloridlösung (125 mg mL<sup>-1</sup>) abgebrochen, die NP wurden gewaschen (siehe 3.1.1.5) und die Anzahl der Sulfhydrylgruppen bestimmt (siehe 3.2.1.2).

#### 3.2.5.4 Standardvorschrift

Zur Modifikation der HSA-NP mit Trauts Reagenz wurden zunächst reine HSA-Partikel hergestellt, wie in 3.1.1.2 beschrieben. 1,5 mL der Partikelpräparation (≈ 45 mg Partikel) wurde anschließend mit 3,0 mL TRIS-Puffer pH 8,5 versetzt und

35 mg 2-Iminothiolan hinzugefügt. Unter permanentem Rühren ( $600 \text{ U min}^{-1}$ ) wurden die NP über Nacht bei RT thioliert und im Anschluß daran aufgereinigt (siehe 3.1.1.5).

### **3.2.6 Untersuchung der Lagerstabilität der eingeführten Sulfhydrylgruppen**

Die mit Trauts Reagenz und die mit DTT umgesetzten HSA-NP, sowie die EDC/Cystamin und EDC/L-Cystein modifizierte NP wurden zur Evaluierung der Lagerungsstabilität der eingeführten Thiolgruppen über einen Zeitraum von 8 Wochen bei  $4^\circ\text{C}$  in Eppendorf Reaktionsgefäßen ohne Zusatz eines Stabilisators gelagert. Nach 2 Tagen, 5 Tagen, 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen und nach 8 Wochen wurden die freien SH-Gruppen bestimmt (siehe 3.2.1.2).

### **3.2.7 Untersuchung der Cytotoxizität mit MTT-Test**

#### **3.2.7.1 Chemikalien und Geräte**

*3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) .....Sigma,Steinheim*  
*Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM)..... Seromed, Berlin*  
*Fetales Kälberserum (FCS)..... Seromed, Berlin*  
*Brutschrank BB 6220 CU.....Heraeus, Hanau*  
*ELISA Reader Spektra Max 340 .....Molecular Devices, Sunnyvale, USA*

#### **3.2.7.2 Durchführung**

Die MTT-Tests wurden am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, von Frau Stephanie Reiss (Arbeitsgruppe Dr. Hagen von Briesen) durchgeführt und ausgewertet.

Mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well wurden HeLa-Zellen in 24-Well-Platten ausplattiert und einen Tag bei  $37^\circ\text{C}$  und 7%  $\text{CO}_2$  in Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, welches 10 % fetales Kälberserum, 4mM L-Glutamin, 100 Einheiten  $\text{mL}^{-1}$  Penicillin und  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  Streptomycin enthielt. Das Serum wurde zuvor 1 h bei  $65^\circ\text{C}$  hitzeinaktiviert.

Die Zellen wurden 4h mit 1,0 mL der verschiedenen NP-Suspensionen inkubiert, wobei die NP-Präparationen mit DMEM auf die gewünschten Partikel-

Konzentrationen von  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $3,75 \text{ mg mL}^{-1}$  eingestellt wurden. Anschließend wurden die NP mit PBS-Puffer pH 7,4 von den Zellen gewaschen und die Zellen erneut 24 h in 1,0 mL DMEM-Medium kultiviert. Nach dieser Inkubation wurden je 250  $\mu\text{L}$  MTT-Lösung zu den Zellen pipettiert ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS) und weitere 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 7 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die zurückbleibenden blauen Farbstoffkristalle (Formazan) mit 0,01 N HCl in Isopropanol herausgewaschen. Die Quantifizierung des Formazans erfolgte nach Überführung der Farbstofflösung in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die gemessene Extinktion des Formazans korrelierte mit der Zellviabilität. Als 100 %-Wert der Viabilität dienten unbehandelte Zellen.

### 3.2.8 Mukoadhäsion der SH-modifizierten Nanopartikel

#### 3.2.8.1 Chemikalien und Geräte

<i>Mucin</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>HSA (Fraktion V)</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>PBS pH 7,8</i>	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,050 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>0,250 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaCl</i>	<i>0,220 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
	<i>pH-Wert mit 1N NaOH einstellen</i>		
<i>Thermomixer 5436</i> .....			<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Sterilfilter 0,22 <math>\mu\text{m}</math></i> .....			<i>Schleicher&amp;Schuell, Dassel</i>
<i>Photometer U-3000</i> .....			<i>Hitachi, Berkshire, UK</i>
<i>Centrifuge 5417</i> .....			<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Ultraschallbad Transsonic Digital</i> .....			<i>Elma, Singen</i>

#### 3.2.8.2 Durchführung

Der Test auf Mukoadhäsivität der SH-modifizierten NP erfolgte durch Bindung der Partikel an Mucin. Da Mucin relativ schlecht in Wasser löslich ist, wurden 15 mg Mucin in 3,0 mL Phosphatpuffer pH 7,8 suspendiert und mit Ultraschall kurz behandelt. Die unlöslichen Bestandteile des Mucins wurden abzentrifugiert (20.000 g; 20 min) und der Überstand sterilfiltriert. Der Gehalt der Mucinlösung wurde

anschließend gravimetrisch über den Trocknungsverlust nach der Methode, die zur Bestimmung des NP-Gehaltes in 3.1.2.2 beschrieben ist, bestimmt.

Die Mukoadhäsion wurde an zwei unterschiedlich SH-modifizierten Partikeln untersucht, an DTT-modifizierten NP (siehe 3.2.2.5) und an Traut-modifizierten NP (siehe 3.2.5.4). Als Vergleich wurden reine HSA-NP ohne Thiolgruppen (siehe 3.1.1.2) gewählt. 100,0  $\mu\text{L}$  der NP ( $\approx 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden mit 500,0  $\mu\text{L}$  der Mucinlösung versetzt und die Proben 2 h bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die NP abzentrifugiert (20.000 g; 20 min) und die Überstände bei 276 nm photometrisch vermessen. Reine Mucinlösungen dienten als Vergleich, ebenso reine Partikelproben zur Bestimmung einer etwaigen Absorption aus dem Partikelsystem im Photometer.

### 3.3 Veränderung der Oberflächenladung

#### 3.3.1 Herstellung positiv geladener Nanopartikel

##### 3.3.1.1 Chemikalien

<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (=EDC)</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>2-Aminoethyl-trimethylammoniumchlorid x HCl (=Cholamin)</i> .....	<i>Fluka, Buchs</i>
<i>MES-Puffer (BupH<math>\hat{\text{O}}</math> MES buffered Saline Pack) pH 4,7</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>0,1 N NaOH</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Cystaminiumdichlorid</i> .....	<i>Merck-Schuchardt, Hohenbrunn</i>
<i>PEG 400</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>

##### 3.3.1.2 Modifikation mit EDC

Als Ausgangspunkt der Oberflächenmodifikation wurden reine HSA-NP verwendet, die gemäß der Vorschrift in 3.1.1.2 hergestellt wurden. Zur Positivierung der Partikeloberfläche wurden 250,0  $\mu\text{L}$  der Partikelsuspension ( $\approx 4,3 \text{ mg NP}$ ) mit 500,0  $\mu\text{L}$  MES-Puffer versetzt und 100,0  $\mu\text{L}$  EDC-Lösung ( $120 \text{ mg mL}^{-1}$ ) hinzu pipettiert. Nach Inkubation der Probe über Nacht bei RT wurden die Partikel gereinigt (siehe 3.1.1.5) und das Zetapotential in MilliQ-Wasser bestimmt.

### **3.3.1.3 Modifikation mit EDC und Cholamin**

#### *3.3.1.3.1 HSA-Nanopartikel*

Je 250,0  $\mu\text{L}$  der wie in 3.1.1.2 beschrieben hergestellten HSA-NP-Suspension wurden mit 500,0  $\mu\text{L}$  MES-Puffer versetzt. Volumina von 20,0  $\mu\text{L}$ , 40,0  $\mu\text{L}$ , 60,0  $\mu\text{L}$ , 80,0  $\mu\text{L}$  und 100,0  $\mu\text{L}$  einer Cholaminlösung ( $70 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden hinzugefügt und das fehlende Volumen mit MilliQ-Wasser ergänzt. Nach dem Zusatz von 100,0  $\mu\text{L}$  EDC-Lösung ( $120 \text{ mg mL}^{-1}$ ) standen die Proben über Nacht bei RT und wurden anschließend aufgereinigt (siehe 3.1.1.5). Zur Abtrennung des an die Partikel gebundenen EDCs wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 0,1 N NaOH (bezogen auf das Probenvolumen) versetzt, erneut über Nacht bei RT inkubiert, aufgereinigt und das Zetapotential in MilliQ-Wasser bestimmt (siehe 3.1.2.4).

#### *3.3.1.3.2 Gelatine-Nanopartikel*

500,0  $\mu\text{L}$  der nach 3.1.1.3 hergestellten Gelatine A-Nanopartikel wurden mit 500,0  $\mu\text{L}$  MES-Puffer versetzt, 20,0  $\mu\text{L}$ , 40,0  $\mu\text{L}$ , 60,0  $\mu\text{L}$ , 80,0  $\mu\text{L}$  und 100,0  $\mu\text{L}$  Cholaminlösung ( $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ) hinzugefügt und das fehlende Volumen mit MilliQ-Wasser ergänzt. Nach dem Zusatz von 100,0  $\mu\text{L}$  EDC-Lösung ( $120 \text{ mg mL}^{-1}$ ) je Probe wurden die Partikel über Nacht bei RT stehen gelassen und anschließend gereinigt (siehe 3.1.1.5). Zur Entfernung des gebundenen EDCs wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 0,1N NaOH versetzt, erneut über Nacht bei RT inkubiert, aufgereinigt und im Anschluß daran das Zetapotential in MilliQ-Wasser bestimmt (siehe 3.1.2.4). Als Vergleich dienten unmodifizierte Gelatine A-NP und Gelatine A-NP, die mit EDC aber nicht mit Cholaminlösung versetzt, ansonsten aber wie die anderen Proben behandelt wurden.

### **3.3.1.4 Modifikation mit EDC und Cystamin**

Die Umsetzung der HSA-NP mit EDC und Cystamin erfolgte wie die Modifikation der Partikel mit EDC und Cholamin in 3.3.1.3.1. Anstelle der Cholaminlösung wurde eine Cystaminlösung ( $86 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu den Proben hinzugefügt.

### 3.3.1.5 Umsetzung mit EDC und Cystamin bzw. PEG 400 für Zellkulturexperimente

140,0  $\mu\text{L}$  der gemäß 3.1.1.2 hergestellten HSA-NP wurden mit 200,0  $\mu\text{L}$  MES-Puffer versetzt und 100,0  $\mu\text{L}$  PEG-Lösung (200 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) bzw. 100,0  $\mu\text{L}$  Cystaminlösung (100 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) hinzugefügt. Nach dem Zusatz von 100  $\mu\text{L}$  EDC (62 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) wurden die Proben über Nacht bei RT inkubiert und anschließend aufgereinigt (siehe 3.1.1.5). Zur Abspaltung des überschüssigen EDCs wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 0,1 N NaOH umgesetzt, erneut über Nacht bei RT inkubiert und aufgereinigt. Zur Charakterisierung wurde das Zetapotential (siehe 3.1.2.4) in verschiedenen Medien bestimmt und die Partikel auf ihre Zelladhäsion untersucht (siehe 3.4.4.5).

### 3.3.2 Maskierung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche

#### 3.3.2.1 Chemikalien

<i>Acetanhydrid</i> .....			<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Bernsteinsäureanhydrid</i> .....			<i>Fluka, Buchs</i>
<i>Jodessigsäure</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Diethylentriaminpentaessigsäure(DTPA)-Anhydrid</i> .....			<i>Fluka, Buchs</i>
<i>4fach-PBS-Puffer pH 7,5</i>	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,200 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>1,000 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaCl</i>	<i>0,220 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
<i>NaHCO<sub>3</sub>-Puffer pH 7,0</i>	<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	<i>0,420 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
<i>DMSO</i> .....			<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Acetonitril gradient grade</i> .....			<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>1N NaOH</i> .....			<i>Merck, Darmstadt</i>

#### 3.3.2.2 Umsetzung mit Acetanhydrid

Zur Maskierung der Aminogruppen und damit zur Erniedrigung des Zetapotentials wurden reine HSA-NP (Herstellung siehe 3.1.1.2) mit Acetanhydrid umgesetzt. Dazu wurden die NP aus 500,0  $\mu\text{L}$  NP-Suspension abzentrifugiert (20.000 g; 7 min), die Partikel in 500,0  $\mu\text{L}$  Acetonitril mit Ultraschall resuspendiert und die Probe mit

1,5 mL Acetanhydrid versetzt. Nach Inkubation der Proben über Nacht bei RT wurden die Partikel wie in 3.1.1.5 beschrieben gereinigt, das Zetapotential (siehe 3.1.2.4) bestimmt und die Zelladhäsion der modifizierten Partikel untersucht (siehe 3.4.4.5).

### **3.3.2.3 Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid**

100,0 mg Bernsteinsäureanhydrid wurden in 500,0  $\mu\text{L}$  DMSO gelöst und zu 20 mg HSA-NP (Herstellung siehe 3.1.1.2) pipettiert, die in 500,0  $\mu\text{L}$  Acetonitril resuspendiert waren (siehe 3.3.2.2). Nach Inkubation der Partikel über Nacht bei RT wurde die Präparation aufgereinigt, wie in 3.1.1.5 beschrieben, das Zetapotential gemessen (siehe 3.1.2.4) und die Partikel hinsichtlich ihrer zelladhäsiven Eigenschaften untersucht (siehe 3.4.4.5).

### **3.3.2.4 Umsetzung mit DTPA-Anhydrid**

Zur Kopplung des DTPA-Anhydrids wurden 625  $\mu\text{L}$  der HSA-NP-Suspension (siehe 3.1.1.2) mit 0,05 M  $\text{NaHCO}_3$ -Puffer pH 7,0 auf 10,0 mL verdünnt und 10 mg DTPA-Anhydrid zugegeben. Nach Reaktion über Nacht wurden die Partikel gewaschen (siehe 3.1.1.5), das Zetapotential bestimmt (siehe 3.1.2.4) und die zelladhäsiven Eigenschaften im Zellkulturexperiment untersucht (siehe 3.4.4.5).

### **3.3.2.5 Umsetzung mit Jodessigsäure**

#### *3.3.2.5.1 Umsetzung bei neutralem pH-Wert*

Zur Einstellung des pH-Wertes wurden 140,0  $\mu\text{L}$  HSA-NP-Suspension (siehe 3.1.1.2) mit 200,0  $\mu\text{L}$  4-fach-PBS-Puffer versetzt und 50,0  $\mu\text{L}$  Jodessigsäurelösung (100 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) zugefügt. Nach Inkubation der Probe über Nacht bei RT wurden die Partikel gereinigt (siehe 3.1.1.5), das Zetapotential bestimmt (siehe 3.1.2.4) und die veränderte Zelladhäsion der Partikelpräparation untersucht (siehe 3.4.4.5).

#### *3.3.2.5.2 Umsetzung bei alkalischem pH-Wert/Standardvorschrift*

140,0  $\mu\text{L}$  der HSA-Nanopartikelsuspension wurden mit 500,0  $\mu\text{L}$  1N NaOH versetzt, 5 min bei RT unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und danach mit 200,0  $\mu\text{L}$  einer



Jodessigsäurelösung ( $300 \text{ mg mL}^{-1}$ ) versetzt. Nach Reaktion über Nacht wurden die Proben aufgereinigt (siehe 3.1.1.5), das Zetapotential bestimmt (siehe 3.1.2.4) und die Proben auf ihre Zelladhäsion hin untersucht (siehe 3.4.4.5).

### 3.3.2.5.3 Umsetzung mit steigenden Jodessigsäurekonzentrationen

Zur Evaluierung der Jodessigsäurekonzentration wurden etwa 15 mg HSA-NP aus Suspension abzentrifugiert und in 1,5 mL 1 N NaOH resuspendiert. Nach 5 min wurden 20,0  $\mu\text{L}$ , 50,0  $\mu\text{L}$ , 100,0  $\mu\text{L}$  und 200,0  $\mu\text{L}$  der Jodessigsäurelösung ( $300 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zugesetzt, das fehlende Volumen mit MilliQ-Wasser ergänzt und die Proben über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrollen dienten zum einen reine HSA-NP, zum anderen reine HSA-NP, die mit 1N NaOH, aber nicht mit Jodessigsäure behandelt wurden. Nach dem Waschen der Präparationen wurde der Gehalt an Carboxylgruppen (siehe 3.1.5.5) bestimmt und SH-Gruppen mit Trauts Reagenz an der Partikeloberfläche eingeführt (siehe 3.2.5.4). Außerdem wurden Zetapotential (siehe 3.1.2.4) und Zelladhäsion (siehe 3.4.4.5) untersucht.

## 3.4 Bindung verschiedener (funktioneller) Proteine an die Partikeloberfläche

### 3.4.1 Evaluierung der Bindung von Modellproteinen mit Sulfo-MBS

#### 3.4.1.1 Chemikalien und Geräte

<i>BCA-Protein-Assay-Reagent</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>	
<i>Sulfo-m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester</i>		
= <i>Sulfo-MBS</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>	
<i>HSA (Fraktion V)</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>	
<i>Ovalbumin</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>	
<i><math>\alpha</math>-Globulin</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>	
<i>D-Salt<math>\text{\textcircled{O}}</math> Dextran Plastic Desalting Column 5 mL</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>	
<i>GPC-Puffer pH 6,5:</i>		
<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</i>	9,669 g .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</i>	5,051 g .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	14,204 g .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>MilliQ-Wasser ad</i>	1000 mL	

<i>PBS pH 6,5</i>	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,216 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>0,111 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaCl</i>	<i>0,220 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
<i>PBS pH 7,5</i>	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,050 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>0,250 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaCl</i>	<i>0,220 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
<i>Thermomixer 5436</i> .....			<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Centrifuge 5417</i> .....			<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Photometer U-3000</i> .....			<i>Hitachi, Berkshire, UK</i>
<i>HPLC-Pumpe Waters 600 Controller</i> .....			<i>Waters, Eschborn</i>
<i>HPLC-Autosampler SpectraSeries AS 100</i> .....			<i>Thermo Separation Products</i>
<i>UV-Detector Waters<sup>®</sup> 486 Tunable Absorbance Detector</i> .....			<i>Waters, Eschborn</i>
<i>Integrationssystem Maxima 820 Version 3.0</i> .....			<i>Waters, Eschborn</i>
<i>Säule: TSK Gel G3000 SWXL, 7,8 mm ID x 30 cm</i> .....			<i>TosoHaas, Stuttgart</i>

### 3.4.1.2 Analyse der Bindungsrate

#### 3.4.1.2.1 Direkte photometrische Bestimmung

Die Proben wurden zunächst zur Abtrennung der enthaltenen NP 30 min bei 20.000 g zentrifugiert. Zur photometrischen Bestimmung der Proteinbindung an die NP wurden je 500  $\mu\text{L}$  des Überstandes bei 279 nm gegen Wasser vermessen. Für die Berechnung der kovalenten Proteinbindung wurde der Überstand unmodifizierter HSA-NP als Blindwert berücksichtigt und das erhaltene Ergebnis um die Absorption des jeweiligen nichtaktivierten Proteins an SH-modifizierte HSA-NP (siehe 3.4.1.3.3) korrigiert.

#### 3.4.1.2.2 GPC-Bestimmung

Die chromatographische Analytik der Proteinbindung erfolgte mit HPLC-Gelpermeationschromatographie (GPC). Die Proben wurden vorbereitet, wie für die direkte photometrische Bestimmung beschrieben, und in HPLC-Vials überführt. Bei einer Säulentemperatur von 35°C und einem Fluß von 0,8  $\text{mL min}^{-1}$  wurden je 20,0  $\mu\text{L}$  der Proben eingespritzt und das Chromatogramm über einen Zeitraum von 20 min bei einer Wellenlänge von 220 nm oder 280 nm aufgezeichnet. Nach einer Auswaschzeit

von 10 min wurde die nächste Probe injiziert. Pro Vial erfolgten 2 Einspritzungen. Die Chromatogramme wurden automatisch integriert und die Peakflächen zwischen 6 min und 11 min für die Berechnung ausgewertet. Die Bindungsrate wurde als Verhältnis der Peakflächen der Nanopartikelproben im Vergleich zu reinen Proteinstandards berechnet.

#### *3.4.1.2.3 Bestimmung mit dem BCA-Protein-Assay*

Die Proben wurden bereit, wie für die direkte photometrische Bestimmung beschrieben (siehe 3.4.1.2.1). Je 30,0  $\mu\text{L}$  der unverdünnten Proben wurden zu 800,0  $\mu\text{L}$  des BCA-Arbeitsreagenzes pipettiert und diese Mischung 30 min bei 40°C im Thermomixer unter permanentem Schütteln (600 U  $\text{min}^{-1}$ ) inkubiert. Danach wurden die Proben auf RT abgekühlt und anschließend im Photometer bei 562 nm gegen Wasser vermessen. Zur Quantifizierung wurden 10,0  $\mu\text{L}$ , 20,0  $\mu\text{L}$  und 30,0  $\mu\text{L}$  einer Standardlösung des Proteins ( $\approx 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) unter denselben Bedingungen wie die Proben mit dem BCA-Arbeitsreagenz umgesetzt.

### **3.4.1.3 Bindung von HSA als Modellprotein mit Sulfo-MBS**

#### *3.4.1.3.1 Aktivierung von HSA mit Sulfo-MBS*

Zur Aktivierung von HSA mit Sulfo-MBS wurden 4 mg HSA in 1,0 mL PBS-Puffer pH 6,5 gelöst und mit 80,0  $\mu\text{L}$  Sulfo-MBS-Lösung (10  $\text{mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 6,5) versetzt. Nach 40 min Inkubation bei RT wurde das überschüssige Sulfo-MBS vom aktivierten HSA durch Größenausschlußchromatographie mit einer D-Salt™-Column abgetrennt. Auf die Säule wurde ein Probenvolumen von 1,0 mL aufgetragen und das Protein mit 1,0 mL Aliquoten PBS-Puffer pH 6,5 eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen 5 und 6 (siehe 3.4.1.3.2) wurden aufgefangen und zur weiteren Verwendung vereinigt. Der Gehalt des aufgereinigten, aktivierten Proteins wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust unter Berücksichtigung des Salzgehaltes des Puffers bestimmt (siehe 3.1.2.2).

### *3.4.1.3.2 Evaluierung der Proteinaufreinigung mit Größenausschlußchromatographie*

Die Aufreinigung des mit Sulfo-MBS-aktivierten HSAs erfolgte mit D-Salt™-Columns (siehe 3.4.1.3.1). Um zu ermitteln, welche Fraktionen das HSA enthalten und ab welcher Fraktion eine Sulfo-MBS-Verunreinigung des Proteins zu erwarten ist, wurden die Fraktionen 4-10 aufgefangen und mit GPC (siehe 3.4.1.2.2) bei 220 nm auf enthaltenes Protein bzw. Sulfo-MBS untersucht.

### *3.4.1.3.3 Bestimmung der Adsorptionsisothermen von HSA an SH-modifizierte HSA-Nanopartikel*

Zur Bestimmung der Adsorptionsisothermen von reinem HSA wurden verschieden SH-modifizierte HSA-NP verwendet. Im einzelnen handelte es sich dabei um Traut-NP aus 3.2.5.4, DTT-NP aus 3.2.2.5 und EDC/Cystamin-NP aus 3.2.4.2.4. Dazu wurden jeweils 100,0 µL der Partikeldispersion mit 50,0 µL, 100,0 µL, 200,0 µL, 400,0 µL und 600,0 µL des reinen, nichtaktivierten HSAs umgesetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der Adsorption des aktivierten HSAs an reine, nicht-modifizierte NP wurden je 100,0 µL der reinen NP mit 50,0 µL, 100,0 µL, 200,0 µL, 400,0 µL und 600,0 µL des aktivierten HSAs versetzt und ebenfalls über Nacht bei RT inkubiert. Die Aktivierung des HSAs erfolgte wie in 3.4.1.3.1 beschrieben. Anschließend wurde das Volumen auf 1,1 mL mit PBS-Puffer pH 6,5 ergänzt, die Partikel abzentrifugiert und die Partikelüberstände photometrisch vermessen (siehe 3.4.1.2.1). Die bestimmten Extinktionen wurden für alle Partikelarten um die Extinktion der Partikelüberstände des reinen Nanopartikelsystems korrigiert.

### *3.4.1.3.4 Einfluß der HSA-Konzentration*

Die Konzentrationsabhängigkeit der Bindungsrate wurde durch Variation der HSA-Konzentration bei gleichbleibendem Sulfo-MBS-Zusatz bestimmt. Dazu wurde das HSA aktiviert wie in 3.4.1.3.1 beschrieben. Anschließend wurden je 100,0 µL Traut-NP (siehe 3.2.5.4), 100,0 µL DTT-NP (siehe 3.2.2.5) oder 100,0 µL EDC/Cystamin-NP (siehe 3.2.4.2.4) mit 50,0 µL, 100,0 µL, 200,0 µL, 400,0 µL und 600,0 µL des aktivierten HSAs versetzt, das fehlende Volumen wurde mit MilliQ-Wasser ergänzt

und die Proben über Nacht bei RT inkubiert. Proben zur Bestimmung der Partikelabsorption der verschiedenen NP-Präparationen wurden unter den gleichen Bedingungen hergestellt, ebenso wie die HSA-Standards zur Berechnung der Bindungsrate. Die Proben wurden auf ein Volumen von 1,1 mL mit PBS-Puffer pH 6,5 ergänzt, die NP abzentrifugiert (20.000 g; 30 min) und die Partikelüberstände direkt photometrisch vermessen (siehe 3.4.1.2.1). Dieser Versuch wurde mit frisch bereiteten SH-modifizierten NP am ersten Tag, am dritten Tag und am fünften Tag nach der SH-Modifikation durchgeführt, um gleichzeitig die Abhängigkeit der Bindung von dem Zeitpunkt der SH-Gruppeneinführung zu untersuchen.

#### *3.4.1.3.5 Einfluß des pH-Wertes*

Die Aktivierung des HSAs wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten, pH 6,5 und pH 7,5 durchgeführt. Dazu wurden HSA und Sulfo-MBS in dem entsprechenden PBS-Puffer gelöst und die Aktivierung wie in 3.4.1.3.1 beschrieben durchgeführt.

Die Bindung des aktivierten Proteins erfolgte an Traut-NP (siehe 3.2.5.4), wobei zu jeweils 100,0 µL der Partikeldispersion 50,0 µL, 100,0 µL, 200,0 µL, 400,0 µL und 600,0 µL des Sulfo-MBS-aktivierten Proteins zugegeben und die fehlenden Volumina mit MilliQ-Wasser ergänzt wurden. Die HSA-Standards zur Berechnung der Bindungsrate wurden unter identischen Bedingungen ohne Partikelzusatz bereit. Ebenso wurden reine Partikelproben ohne Proteinzusatz zur Bestimmung der Partikelabsorption hergestellt. Nach Inkubation der Proben über Nacht bei RT, wurden die NP abzentrifugiert (20.000 g; 30 min) und die Bindungsrate direkt photometrisch bestimmt (siehe 3.4.1.2.1).

#### *3.4.1.3.6 Einfluß der Aktivierungszeit*

Das HSA wurde mit Sulfo-MBS so aktiviert, wie in 3.4.1.3.1 beschrieben. Lediglich die Reaktionszeit wurde variiert. Nach 15 min, 30 min, 45 min, 60 min und 90 min wurde die Aktivierung durch Aufreinigung des Proteins über die D-Salt™-Column beendet. Nach der Reinigung wurden je 100,0 µL des aktivierten HSAs umgehend zu 100,0 µL DTT-NP (siehe 3.2.2.5) gegeben und die Proben über Nacht bei RT

inkubiert. HSA-Standards ohne NP-Zusatz wurden unter identischen Bedingungen bereitet. Nach der Ergänzung des Probenvolumens auf 1,1 mL mit PBS-Puffer pH 6,5 wurden die NP abzentrifugiert und die Bindungsrate über Gelpermeationschromatographie (siehe 3.4.1.2.2) bestimmt.

### *3.4.1.3.7 Einfluß der Sulfo-MBS-Konzentration*

Um den Einfluß der Sulfo-MBS-Konzentration auf die Bindungsrate des HSAs zu untersuchen, wurde die Aktivierung des Proteins mit drei verschiedenen Sulfo-MBS-Konzentrationen durchgeführt. Zu je 700 µL HSA-Lösung ( $3,75 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 6,5) wurden 50,0 µL, 100,0 µL und 200,0 µL Sulfo-MBS-Lösung ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zugesetzt, das Volumen mit MilliQ-Wasser ergänzt, 45 min bei RT inkubiert und anschließend wie in 3.4.1.3.1 beschrieben, aufgereinigt. Zur Bindung an SH-modifizierte HSA-NP wurden je 100,0 µL DTT-NP (siehe 3.2.2.5) oder 100,0 µL Traut-NP (siehe 3.2.5.4) mit 100,0 µL des aktivierten HSAs umgesetzt und die Proben über Nacht bei RT inkubiert. Proteinstandards der drei verschieden aktivierten Proteine wurden unter identischen Bedingungen bereitet. Vor dem Abzentrifugieren der Partikel wurden die Proben mit PBS-Puffer pH 6,5 auf 1,1 mL ergänzt und im Anschluß direkt photometrisch vermessen (siehe 3.4.1.2.1).

### **3.4.1.4 Bindung von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht**

Zu Beginn wurden je 5 mg der Proteine Ovalbumin,  $\gamma$ -Globulin und HSA in 1,25 mL PBS-Puffer pH 6,5 gelöst und Aliquote von 600,0 µL dieser Lösungen mit je 50,0 µL Sulfo-MBS-Lösung ( $9,574 \text{ mg mL}^{-1}$ ) versetzt. Nach 45 min Inkubation bei RT wurden die aktivierten Proteine aufgereinigt wie in 3.4.1.3.1 beschrieben.

Zur Kopplung der aktivierten Proteine an Traut-NP (siehe 3.2.5.4) wurden je 100,0 µL der Partikelsuspension mit 100,0 µL bzw. 200,0 µL des aktivierten Proteins versetzt und die Proben über Nacht bei RT inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Proben mit PBS-Puffer pH 6,5 auf 700,0 µL ergänzt, die NP abzentrifugiert (20.000 g; 30 min) und die Partikelüberstände photometrisch vermessen. Als Standard zur Berechnung der Bindungsrate wurden Proben der reinen aktivierten Proteine

hergestellt und den Partikelproben entsprechend verdünnt. Außerdem wurden zur Bestimmung der Partikelabsorption reine Partikelproben ohne Proteinzusatz verwendet. Zur Kontrolle der Absorption der Proteine an die NP wurden reine, nicht-SH-modifizierte NP mit den entsprechenden Volumina aktivierter Proteine versetzt und SH-modifizierte NP mit reinen, nicht-aktivierten Proteinen in vergleichbarer Konzentration umgesetzt.

### 3.4.2 Bindung von HSA mit verschiedenen Crosslinkern

#### 3.4.2.1 Chemikalien und Geräte

<i>Sulfo-m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester</i>			
= Sulfo-MBS .....			Pierce, Rockfort, Illinois, USA
<i>Sulfo-Succinimidyl-4-N-maleimidomethyl-cyclohexan-1-carboxylat</i>			
= Sulfo-SMCC .....			Pierce, Rockfort, Illinois, USA
<i>3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat] = DTSSP.....</i>			
			Pierce, Rockfort, Illinois, USA
<i>Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat x HCl = DTBP .....</i>			
			Pierce, Rockfort, Illinois, USA
<i>Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat</i>			
= SAND.....			Pierce, Rockfort, Illinois, USA
<i>HSA (Fraktion V).....</i>			
			Sigma, Steinheim
<i>Acetatpuffer pH 5,0</i>	<i>CH<sub>3</sub>COONa x 3H<sub>2</sub>O</i>	0,324 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
	<i>pH-Wert mit Eisessig einstellen</i>		
<i>PBS pH 6,5</i>	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	0,216 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0,111 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>NaCl</i>	0,220 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
<i>PBS pH 7,5</i>	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</i>	0,050 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0,250 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>NaCl</i>	0,220 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
<i>Boratpuffer pH 8,5</i>	<i>Borsäure</i>	0,620 g .....	Merck, Darmstadt
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
	<i>pH-Wert mit 1N NaOH einstellen</i>		
<i>Blitz 283 professional.....</i>			
			Vivitar, Swindon, Wiltshire, U.K.
<i>D-Salt<sup>®</sup> Dextran Plastic Desalting Column 5 mL.....</i>			
			Pierce, Rockfort, Illinois, USA

### 3.4.2.2 Bindung von HSA mit Sulfo-SMCC und Sulfo-MBS

Je 4,0 mg HSA wurden in 1,0 mL PBS-Puffer pH 6,5 gelöst. Zur Aktivierung wurden zu 0,5 mL der Proteinlösung je 40,0  $\mu\text{L}$  des Crosslinkers Sulfo-SMCC ( $10,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und Sulfo-MBS ( $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zupipettiert und die Proben 40 min bei RT inkubiert. Die Aufreinigung des aktivierten Proteins erfolgte wie in 3.4.1.3.1 beschrieben.

Zu je 100,0  $\mu\text{L}$  der nach 3.2.5.4 hergestellten Traut-NP ( $\approx 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden jeweils 100,0  $\mu\text{L}$  und 200,0  $\mu\text{L}$  des aktivierten HSAs pipettiert und die Proben über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrollen dienten reine Traut-NP ohne Zusatz eines aktivierten Proteins sowie nicht-SH-modifizierte HSA-NP, die ebenfalls mit dem aktivierten Protein in beiden Konzentrationen umgesetzt wurden. Als Standard zur Bestimmung der Bindung wurden die entsprechenden Proben ohne Partikelzusatz verwendet. Vor der Bestimmung der Bindung wurden die Proben mit PBS-Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 700,0  $\mu\text{L}$  ergänzt. Der Gehalt der aufgereinigten, aktivierten Proteine wurde wie der NP-Gehalt (siehe 3.1.2.2) gravimetrisch über den Trocknungsverlust bestimmt. Die Ermittlung der Bindungsraten erfolgte mit Gelpermeationschromatographie (siehe 3.4.1.2.2).

### 3.4.2.3 Bindung von HSA mit DTSSP

Zur Bindung wurden je 100,0  $\mu\text{L}$  reiner HSA-NP mit 100,0  $\mu\text{L}$  bzw. 200,0  $\mu\text{L}$  HSA-Lösung ( $1,14 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 7,5) versetzt und mit 50,0  $\mu\text{L}$  und 100,0  $\mu\text{L}$  DTSSP-Lösung ( $0,67 \text{ mg mL}^{-1}$  in Acetatpuffer pH 5,0) quervernetzt. Die Proben wurden über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden die NP abzentrifugiert (20.000 g; 30 min) und die Bindungsrate über Gelpermeationschromatographie (siehe 3.4.1.2.2) ermittelt. Als Standard zur Berechnung der Bindungsrate dienten 100,0  $\mu\text{L}$  und 200,0  $\mu\text{L}$  HSA-Lösungen, die ebenfalls mit 50,0 bzw. 100,0  $\mu\text{L}$  DTSSP-Lösung versetzt waren, aber keine NP enthielten. Zur Korrektur der Absorption reiner HSA-NP wurden diese mit PBS-Puffer pH 7,5 versetzt und unter den gleichen Bedingungen vermessen wie die Bindungsproben.



### 3.4.2.4 Bindung von HSA mit DTBP

Die Bindung erfolgte unter identischen Bedingungen wie die Bindung mit DTSSP. Die Reaktion wurde lediglich bei einem anderen pH-Wert in Boratpuffer pH 8,5 und mit einer niedrigeren Crosslinkerkonzentration ( $0,34 \text{ mg mL}^{-1}$  in Boratpuffer pH 8,5) durchgeführt.

### 3.4.2.5 Bindung von HSA mit SAND

Unter Rotlichtbestrahlung wurden zu  $500,0 \text{ }\mu\text{L}$  einer HSA-Lösung ( $4 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 7,5)  $40,0 \text{ }\mu\text{L}$  SAND-Lösung ( $13,8 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 7,5) gegeben und 40 min bei RT inkubiert. Die Abtrennung des Proteins von überschüssigem SAND erfolgte wie in 3.4.1.3.1 beschrieben, allerdings weiterhin unter Rotlicht.

Unter Beibehaltung des Rotlichtes wurden je  $100,0 \text{ }\mu\text{L}$  der Traut-NP-Dispersion (siehe 3.2.5.4) mit  $100,0 \text{ }\mu\text{L}$  bzw.  $200,0 \text{ }\mu\text{L}$  des aktivierten HSAs versetzt und die Proben achtmal kurz hintereinander mit einem Blitz in einem Abstand von 5-10 cm angeblitzt. Anschließend wurden die Proben mit PBS-Puffer pH 7,5 auf  $700 \text{ }\mu\text{L}$  ergänzt, die Partikel abzentrifugiert ( $20.000 \text{ g}$ ; 30 min) und der ungebundene Proteinanteil in den Partikelüberständen über Gelpermeationschromatographie (siehe 3.4.1.2.2) bestimmt.

## 3.4.3 Bindung von Enzymen

### 3.4.3.1 Chemikalien und Geräte

<i>Alkalische Phosphatase (Aktivität ~23 unit/mg)</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Alkalische Phosphatase rein</i> .....			<i>Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden Ts</i>
<i>p-Nitrophenylphosphat</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>b-D-Galaktosidase</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>p-Nitrophenylgalaktosidat</i> .....			<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>DEA-Puffer pH 9,8</i>	<i>Diethanolamin</i>	<i>105 mg</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</i>	<i>93 mg</i> .....	<i>Fluka, Buchs</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 100,0 mL</i>	
<i>1N NaOH</i> .....			<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Thermomixer 5436</i> .....			<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Photometer U-3000</i> .....			<i>Hitachi, Berkshire, UK</i>

<i>PBS-Puffer pH 6,5</i>	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</i>	<i>1,208 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>1,721 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>NaCl</i>	<i>2,192 g</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
	<i>MilliQ-Wasser</i>	<i>ad 1000 mL</i>	
<i>Sulfo-MBS</i> .....			<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>D-Salt<sup>®</sup> Dextran Plastic Desalting Column 5 mL bzw. 10 mL</i> .....			<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>

### 3.4.3.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden zunächst je 500,0 µL einer Lösung des Substrates p-Nitrophenylphosphat (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) mit 500,0 µL DEA-Puffer gemischt und zwei Minuten im Thermomixer auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden je 500,0 µL der enzymhaltigen Proben zugegeben, das Volumen bei kleineren Probenvolumina gegebenenfalls zu 1,5 mL ergänzt und die Proben bei 37°C im Thermomixer für 30–60 min, je nach enzymatischer Aktivität der Proben, inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 200,0 µL Probe entnommen und in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert, in denen 200,0 µL 1N NaOH vorgelegt waren. Die Proben wurden mit 600,0 µL MilliQ-Wasser verdünnt. Falls NP in den Proben enthalten waren, wurde 30 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand im Photometer bei 400 nm gegen Wasser gemessen.

### 3.4.3.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β-Galaktosidase

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β-Galaktosidase wurde die Umsetzung von p-Nitrophenylgalaktosidat (PNPG) zu p-Nitrophenol genutzt. Dazu wurden 1,0 mL Phosphatpuffer pH 6,5 mit 5,0 µL MgCl<sub>2</sub>-Lösung (20,3 mg mL<sup>-1</sup>) gemischt und mit 300,0 µL PNPG-Lösung (1,6 mg mL<sup>-1</sup>) versetzt. Je nach Enzymkonzentration wurden 100,0-200,0 µL der enzymhaltigen Proben zugesetzt und die Proben 30 min bei 37°C im Thermomixer unter Schütteln (600 U min<sup>-1</sup>) inkubiert. Je 200,0 µL der Proben wurden zu 200,0 µL 1N NaOH pipettiert und die Proben mit 600,0 µL MilliQ-Wasser verdünnt. Die in den Proben enthaltenen NP wurden abzentrifugiert (20.000 g; 30 min) und die Partikelüberstände unverdünnt gegen Wasser bei 400 nm im Photometer vermessen.

#### **3.4.3.4 Bindung der alkalischen Phosphatase (Verschnitt) mit Sulfo-MBS an HSA-Nanopartikel**

Zur Aktivierung der Phosphatase (Verschnitt) wurden zunächst 1,0 mL einer Phosphatase-Lösung ( $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 6,5) mit  $150,0 \text{ }\mu\text{L}$  Sulfo-MBS-Lösung ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 6,5) versetzt und 40 min bei RT aktivieren lassen. Die Aufreinigung erfolgte wie in 3.4.1.3.1 für das aktivierte HSA beschrieben.

Zur Kopplung wurden je  $100,0 \text{ }\mu\text{L}$  der Partikelsuspension (Traut-NP; siehe 3.2.5.4) mit  $100,0 \text{ }\mu\text{L}$  bzw.  $200,0 \text{ }\mu\text{L}$  der aktivierten alkalischen Phosphatase-Lösung umgesetzt. Entsprechende Volumina der Enzym-Lösung und der Partikelsuspension dienten als Referenzproben. Zur Bestimmung der Adsorption wurden sowohl nicht-SH-modifizierte NP mit aktivierter Phosphatase als auch SH-modifizierte NP mit nichtaktivierter Phosphatase in den gleichen Konzentrationen wie die Kopplungsproben mit den entsprechenden Referenzproben umgesetzt. Die Proben wurden über Nacht bei RT inkubiert, anschließend auf  $1,1 \text{ mL}$  mit PBS-Puffer pH 6,5 ergänzt und je Probe  $50,0 \text{ }\mu\text{L}$  der Gesamtprobe zur Aktivitätsbestimmung (siehe 3.4.3.2) entnommen. Anschließend wurden die Partikel 7 min bei  $20.000 \text{ g}$  abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und vor der Bestimmung der Beladung und der Aktivität der Überstände nochmals 30 min bei  $20.000 \text{ g}$  zentrifugiert. Zur Aktivitätsbestimmung wurden  $50,0 \text{ }\mu\text{L}$  der Gesamtproben sowie der Überstände mit  $950 \text{ }\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser verdünnt. Die NP wurden 5-fach gewaschen (siehe 3.1.1.5). Beim letzten Waschschriff wurden die NP in  $300 \text{ }\mu\text{L}$  resuspendiert und unverdünnt für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des gebundenen Enzyms verwendet.

#### **3.4.3.5 Bindung der reinen alkalischen Phosphatase**

$143,0 \text{ }\mu\text{L}$  reiner alkalischer Phosphatase-Lösung ( $19,77 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden mit  $600,0 \text{ }\mu\text{L}$  Zweifach-PBS-Puffer pH 6,5 verdünnt und  $500,0 \text{ }\mu\text{L}$  dieser verdünnten Phosphatase-Lösung mit  $40,0 \text{ }\mu\text{L}$  Sulfo-MBS-Lösung ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) versetzt. Die Inkubation und Aufreinigung erfolgte wie in 3.4.1.3.1 beschrieben.

Zur Bindung des aktivierten Enzyms an frisch bereitete Traut-NP (Herstellung siehe 3.2.5.4) wurden je  $50,0 \text{ }\mu\text{L}$  der NP-Dispersion mit  $50,0 \text{ }\mu\text{L}$  bzw.  $100,0 \text{ }\mu\text{L}$  der

Phosphatase-Lösung versetzt und das fehlende Volumen mit MilliQ-Wasser ergänzt. Zur Bestimmung der Adsorption der Phosphatase an die NP wurden sowohl nicht-modifizierte HSA-NP mit aktiviertem Enzym als auch SH-modifizierte NP mit nicht-aktivierter Phosphatase in den entsprechenden Konzentrationen versetzt. Phosphatase-standards und unbeladene NP zur Korrektur der Adsorption wurden unter den gleichen Bedingungen bereitgestellt.

Nach Inkubation der Proben über Nacht bei RT wurden das Volumen auf 700,0  $\mu\text{L}$  mit PBS-Puffer pH 6,5 ergänzt. Von jeder Probe wurden 10,0  $\mu\text{L}$  Aliquots abgenommen und zur Bestimmung der Enzymaktivität der Gesamtproben verwendet. Anschließend wurden die NP abzentrifugiert (20.000 g; 7 min), die Überstände abgenommen, die NP 5-fach gewaschen (siehe 3.1.1.5), zuletzt in 300,0  $\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser redispergiert und zur Bestimmung der partikelgebundenen Enzymaktivität verwendet. Die Überstände wurden erneut zentrifugiert (20.000 g; 30 min), von den NP-haltigen Proben nochmals 10,0  $\mu\text{L}$  Aliquots zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität abgenommen und die Überstände zur Bestimmung der Bindungsrate direkt photometrisch vermessen wie in 3.4.1.2.1 beschrieben.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden 20,0  $\mu\text{L}$  der NP-haltigen Proben mit 980,0  $\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser versetzt. 10,0  $\mu\text{L}$  aller anderen Proben wurden in zwei Verdünnungsschritten zunächst mit 1990,0  $\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser und anschließend nochmals 100,0  $\mu\text{L}$  dieser Zwischenverdünnung mit 1900,0  $\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser verdünnt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte wie in 3.4.3.2 beschrieben. Von den NP-haltigen Proben wurden 50,0-250,0  $\mu\text{L}$  verwendet, von allen anderen Proben je 100,0  $\mu\text{L}$ .

### **3.4.3.6 Bindung der $\beta$ -Galaktosidase**

Zur Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase mit Sulfo-MBS wurden 2 mg des verschnittenen Enzyms in 600,0  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer pH 6,5 gelöst. Diese Proteinlösung wurde mit 75,0  $\mu\text{L}$  Sulfo-MBS-Lösung ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer pH 6,5) versetzt. Die Inkubation des Enzyms und die Aufreinigung erfolgte wie in 3.4.1.3.1 beschrieben.

Gebunden wurde die aktivierte Galaktosidase an Traut-NP (siehe 3.2.5.4), wobei je 100,0  $\mu\text{L}$  der Partikelsuspension mit 50,0  $\mu\text{L}$ , 100,0  $\mu\text{L}$  oder 200,0  $\mu\text{L}$  des aktivierten Enzyms umgesetzt wurden. Das fehlende Volumen wurde mit MilliQ-Wasser ergänzt. Eine reine Partikelprobe und die entsprechenden Galaktosidasestandards wurden unter identischen Bedingungen hergestellt. Nach Reaktion über Nacht wurden die NP 5-fach gewaschen (siehe 3.1.1.5) und anschließend die Aktivität des gebundenen Enzyms bestimmt, wie in 3.4.3.3 beschrieben.

### 3.4.4 Bindung von Antikörpern

#### 3.4.4.1 Chemikalien und Geräte

<i>Sulfo-MBS</i> .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>Fluorescein-NeutrAvidin</i> $\hat{\text{O}}$ .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>NeutrAvidin</i> $\hat{\text{O}}$ .....	<i>Pierce, Rockfort, Illinois, USA</i>
<i>CD3-Antikörper, biotinyliert</i> .....	<i>Dianova, Hamburg</i>
<i>IgG-Antikörper, biotinyliert</i> .....	<i>Dianova, Hamburg</i>
<i>Cytochalasin</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Medium RPMI1640</i> .....	<i>500 mL Biochrom, Berlin</i>
<i>L-Glutamin (200 mM)</i> .....	<i>10 mL Biochrom, Berlin</i>
<i>Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL)</i> .....	<i>5 mL Biochrom, Berlin</i>
<i>FCS 15 %</i> .....	<i>75 mL Boehringer, Mannheim</i>
<i>PBS-Puffer pH 7,4</i> .....	<i>Biochrom, Berlin</i>
<i>Ficoll-Trennlösung (Dichte 1,007)</i> .....	<i>Biochrom, Berlin</i>
<i>Buffy Coat</i> .....	<i>gesunder Spender</i>
<i>Falcon Röhrchen (50 mL)</i> .....	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
<i>Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 mL</i> .....	<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Adhäsionsobjektträger Poly-Prep</i> $\hat{\text{O}}$ <i>Slides</i> .....	<i>Sigma Diagnostics, St.Louis, USA</i>
<i>Brutschrank Cytoperm</i> .....	<i>Heraeus, Hanau</i>
<i>Concanavalin A Alexa Fluor</i> $\hat{\text{O}}$ <i>594 conjugate</i> .....	<i>Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA</i>
<i>Mowiol 488</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (=DABCO)</i> .....	<i>Fluka, Buchs</i>
<i>Glycerol 25 %</i> .....	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Paraformaldehyd</i> .....	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Elisa-Antikörper SwAMPx</i> .....	<i>USOL, Prag, Tschechische Republik</i>
<i>Titertek Uniskan</i> .....	<i>Flow Laboratories, Irvine, UK</i>

<i>Vortex Genie 2</i> .....	<i>Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA</i>
<i>Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE 300</i> .....	<i>Nikon, Japan</i>
<i>Bildbearbeitungssoftware Lucia Version 3.0</i> .....	<i>Laboratory Imaging GmbH</i>
<i>FACScan</i> .....	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
<i>CLSM:</i>	
<i>Komplettsystem Leica TCS NT</i> .....	<i>Leica Lasertechnik, Heidelberg</i>
<i>Mikroskop Leitz DMIRB</i> .....	<i>Leica, Wetzlar</i>
<i>Argon-Krypton-Laser</i> .....	<i>Leica Lasertechnik, Heidelberg</i>
<i>True Confocal Scanner TCS 4D</i> .....	<i>Leica Lasertechnik, Heidelberg</i>
<i>Imaris Bildbearbeitungssoftware</i> .....	<i>Bitplane AG, Zürich, Schweiz</i>
<i>Selima Bilddaten-Software</i> .....	<i>Bitplane AG, Zürich, Schweiz</i>

### 3.4.4.2 Bindung der Antikörper über Biotin-Avidin-Bindung

Das Zellkulturexperiment wurde sowohl mit HSA-NP als auch mit Gelatine A-NP durchgeführt. Die NP wurden hergestellt und thioliert, wie in 3.1.1.2 bzw. 3.1.1.3 und 3.2.5.4 beschrieben.

Zur Aktivierung des Fluorescein-NeutrAvidins™ (FNA) wurden 2,5 mg FNA in 0,5 mL PBS-Puffer pH 7,5 gelöst und mit 50,0 µL einer Sulfo-MBS-Lösung (15 mg mL<sup>-1</sup> in PBS-Puffer pH 7,5) versetzt. Das FNA wurde mit Sulfo-MBS inkubiert und aufgereinigt, wie in 3.4.1.3.1 beschrieben. 1,0 mL des aufgereinigten FNAs wurden mit 1,5 mL der jeweiligen thiolierten NP versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der FNA-Bindungsrate an die NP wurden 125 µL der Vollprobe abgenommen und mit PBS-Puffer pH 7,5 zu 700,0 µL ergänzt. Eine entsprechende reine FNA-Probe und eine reine NP-Probe wurden bereit und zusammen mit der Vollprobe direkt photometrisch vermessen, wie in 3.4.1.2.1 beschrieben. Die mit FNA gekoppelten NP wurden 5-fach gewaschen und dabei zuletzt in 1,0 mL MilliQ-Wasser resuspendiert. Ein Volumen NP-Suspension, das 3,0 mg bzw. 0,3 mg der NP entspricht, wurde mit 500 µL bzw. 50,0 µL der Lösung des biotinylierten CD3-Antikörpers (= 50 µg Antikörper) bzw. des biotinylierten IgGs (= 50 µg Antikörper) umgesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT unter permanentem Schütteln (600 U min<sup>-1</sup>) auf dem Thermomixer bei 20°C wurden die Partikel erneut 2-fach gewaschen. Beim letzten Redispergierschritt wurden die Partikel

in 100,0  $\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser aufgenommen und anschließend direkt vor der Zellinkubation auf ein Endvolumen von 3,0 mL ergänzt.

#### **3.4.4.3 Antigenitätstest**

Die Antigenitätstests wurden von Herrn Dr. Josef Matousek am Institute of Animal Physiology and Genetic an der Academy of Science of the Czech Republic in Libechov durchgeführt.

Die Bestimmung der gegen die Zubereitungen gebildeten Antikörper erfolgte wie bereits 1994 von Matousek beschrieben. Je 100  $\mu\text{g}$  der NP-Präparationen (unmodifizierte, mit Trauts Reagenz thiolierte und mit NeutrAvidin™-konjugierte HSA-NP) wurden in je 200  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer aufgenommen und im Verlauf von 4 Wochen 4 mal in Versuchsgruppen zu je 5 Mäusen subkutan injiziert. 10 Tage nach der letzten Injektion wurden die Mäuse getötet. Zur Bestimmung der gebildeten Antikörper wurde ein nicht-kompetitiver ELISA-Test durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Mikrotiterplatten mit 5  $\mu\text{g}$  der jeweiligen Zubereitung überzogen und gewaschen. Verdünnungsreihen der Seren der behandelten Mäuse und von Vergleichsseren mit PBS-behandelter Mäuse wurden hergestellt und auf den Platten für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein fluoreszenzmarkierter zweiter Antikörper (SwAMPx) in 1:500 Verdünnung zugegeben. Nach 20 min wurde die Bindung durch Zugabe von 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  beendet und die Absorption bei 450 nm bestimmt. Der Antikörper-Nachweis wurde als positiv gewertet, wenn die Absorption des Testserums mindestens 2 Standardabweichungen über dem Wert der Vergleichsseren lag.

#### **3.4.4.4 Zellkulturexperiment**

Die Zellkulturexperimente wurden von Frau Karin Becker (Arbeitsgruppe Dr. Hagen von Briesen) am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, durchgeführt.

### 3.4.4.4.1 Isolierung primärer humaner Lymphozyten (PBLs)

Die primären, humanen Lymphozyten (PBLs; peripheral blood lymphocytes) wurden aus dem Buffy Coat (Leukozytenpräparation) eines gesunden Spenders durch Dichtegradientenzentrifugation nach der sogenannten Ficoll-Hypaque-Methode gewonnen. Zu diesem Zweck wurde der Buffy Coat auf zwei Falcon-Röhrchen verteilt und mit PBS-Puffer auf 50 mL verdünnt. Je 25 mL der Ficoll-Trennlösung wurden vorsichtig mit je 25 mL der verdünnten Zellsuspension überschichtet und die Präparationen 30 min bei 2000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Die weißliche Bande (Interphase) zwischen der gelblichen oberen Phase und der farblosen viskosen unteren Phase zweier Falcon-Röhrchen wurden in einem weiteren Falcon-Röhrchen vereinigt, mit PBS-Puffer auf 50 mL aufgefüllt und die Zellen bei  $1200 \text{ U min}^{-1}$  10 min (mit Bremse) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets von zwei Falcon-Röhrchen vereinigt, erneut auf 50 mL aufgefüllt und bei  $1200 \text{ U min}^{-1}$  10 min die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in Medium aufgenommen und in eine mit Medium gefüllte Kulturflasche überführt.

### 3.4.4.4.2 Inkubation der Zellen mit den Partikelpräparationen

Die Inkubation der Zellen erfolgte mit den NP-Präparationen aus 3.4.4.2. Die Zellen wurden für eine Dauer von 30 min bzw. 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  und bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Dabei wurden je 5 mal  $2 \cdot 10^6$  Zellen mit 500  $\mu\text{L}$  der Anti-CD3-NP-Präparation, der IgG-NP-Präparation und der reinen FNA-NP-Präparation versetzt. Von den vier Proben einer Präparation wurde jeweils eine Probe 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, 4 h bei  $37^\circ\text{C}$ , 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 4 h bei  $4^\circ\text{C}$ . Die Zellen, auf die der fünfte Teil der Partikelpräparationen gegeben wurde, wurden vor der Probenzugabe 30 min mit Cytochalasin vorinkubiert und dann ebenfalls 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Konzentration der Partikelpräparationen im Zellkulturmedium betrug  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  erfolgte im Brutschrank bei einer  $\text{CO}_2$ -Begasung von 7 % in geöffneten Reaktionsgefäßen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen bei  $4^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  für 4 h inkubiert und Zellen mit reinen, nicht mit FNA-gekoppelten NP bei  $4^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  für 4 h inkubiert. Direkt im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellen 4-fach mit PBS-Puffer durch Zentrifugation ( $2000 \text{ U min}^{-1}$ , 5 min) und Redispergieren



mit einem Vortex-Mischer gewaschen. Die Präparationen wurden ohne Fixierung mit Paraformaldehyd über FACS-Analyse gemessen (siehe 3.4.4.4.3) und für die CLSM-Aufnahmen vorbereitet (siehe 3.4.4.4.4).

#### *3.4.4.4.3 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)*

Die FACS-Analysen wurden von Herrn Christoph Königs (Arbeitsgruppe Dr. Ursula Dietrich) am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, durchgeführt.

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden mit einem FACS (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter) ausgeführt. Die gewaschenen Zellen des Antikörperexperimentes (siehe 3.4.4.4.2) wurden in 800 µL PBS-Puffer aufgenommen und in dieser Konzentration für die FACS-Analyse verwendet. Das Fluoreszenzsignal von 10.000 Zellen pro Messung wurde bestimmt, wobei das Signal des FL1-Kanals (530 nm) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgewertet wurde. Zur Ermittlung der Partikelbindung an die Zelloberfläche bzw. Aufnahme in das Zellinnere wurde der Wert der mittleren Fluoreszenzintensität der Probe herangezogen bzw. graphisch der Shift der Intensitätsverteilung bei der Partikelaufnahme bewertet.

#### *3.4.4.4.4 Probenvorbereitung der CLSM-Präparate*

Die Fixierung und Färbung der Zellen wurde von Frau Stephanie Reiss (Arbeitsgruppe Dr. Hagen von Briesen) am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, durchgeführt.

Zur Fixierung der Zellen auf Adhäsionsobjektträgern wurden die mit PBS gewaschenen Zellen in 100 µL PBS aufgenommen und 20 µL der Probe auf einen Objektträger getropft. Nach 5 min waren die Zellen auf den Objektträgern adhärirt, die Zelldichte wurde mikroskopisch überprüft. Die Zellsuspension wurde mit PBS abgespült, der Objektträger abgeklopft und die Zellen mit 20 µL Paraformaldehyd (5 % in PBS-Puffer) fixiert. Nach 10 min Inkubation in einer feuchten Kammer wurde der überschüssige Paraformaldehyd durch Waschen mit PBS-Puffer vorsichtig entfernt und die Zellmembran durch Zugabe von 20 µL einer 0,0005 %igen Concanavalin A Alexa Fluor® 594 Konjugat-Lösung gefärbt. Nach 5 min Färbung wurden die Präparate durch Zugabe einer Lösung von 10 % Mowiol 488, 2,5 %

Diazabicyclo[2,2,2]octan und 25 % Glycerol in 0,2 M TRIS-Puffer pH 8,5 bedeckt und im Kühlschrank vor Licht geschützt aufbewahrt.

### 3.4.4.4.5 CLSM (*Confocal-Laser-Scanning-Microscopy*)

Die Proben des Zellkulturexperimentes mit den antikörperbeladenen NP (siehe 3.4.4.4.2) wurden mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet, um die Aufnahme der Nanopartikel in das Zellinnere sichtbar zu machen. Die Aufnahmen wurden mit einem 100er Objektiv durchgeführt und Aufnahmen von 42 optischen Schnitten durch die Zellen erstellt. Die Anregung der Zellmembranfärbung (Concanavalin A Alexa Fluor® 594-Konjugat) erfolgte bei 590 nm, die der fluoresceinmarkierten NP bei 488 nm.

### 3.4.4.5 Adhäsionsversuche mit oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln

Die oberflächenmodifizierten HSA-NP-Präparationen aus 3.3.1.4, 3.3.1.5 und 3.3.2 sowie unmodifizierte Gelatine A-NP (siehe 3.1.1.3) wurden mit jeweils  $2 \cdot 10^6$  PBLs (siehe 3.4.4.4.1) 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation bei 37°C erfolgte im Brutschrank bei einer 7 %-igen CO<sub>2</sub>-Begasung in geöffneten Reaktionsgefäßen. Die Konzentration der Partikelpräparationen in Zellkulturmedium betrug  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Zur Untersuchung der Zelladhäsion wurden die Proben nach 5-fachem Waschen mit PBS-Puffer (Zentrifugation  $2000 \text{ U min}^{-1}$ , 5 min) in 96-Well-Platten überführt (100 µL) und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe 3.4.4.5) auf verbleibende Fluoreszenz der NP und Zellaggregation untersucht. Die Untersuchungen erfolgten sowohl im Durchlicht als auch bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die erhaltenen Daten wurden als Bilddateien gespeichert.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluierung der Herstellungsmethode proteinbasierter Nanopartikel und der Charakterisierung des resultierenden Trägersystems, wobei der Schwerpunkt auf humanem Serumalbumin (HSA) als Trägermaterial liegt. Die Nanopartikel wurden an der Partikeloberfläche modifiziert, um eine Bindung von Arzneistoffen, insbesondere funktioneller Peptide, an das Trägersystem zu ermöglichen. Die Bindungsparameter wurden evaluiert und das Trägersystem anschließend in Zellkulturexperimenten getestet.

### **4.1 Evaluierung der Herstellungsmethode von HSA-Nanopartikeln und Charakterisierung des resultierenden partikulären Systems**

Die Herstellung der proteinbasierten Nanopartikel erfolgte in Anlehnung an eine Desolvationsmethode, die von Marty et al. (1978) für Gelatine und andere Protein-Nanopartikel beschrieben wurde. Wässrige HSA- und Gelatinelösungen wurden mit Hilfe eines Nichtlösungsmittels, im Falle des HSAs mit Ethanol, zu nanopartikulären Formen desolvatisiert und anschließend durch Zugabe eines Quervernetzers gehärtet. Zur physikalischen Charakterisierung des resultierenden Systems wurden die Partikelgröße, das Zetapotential, der Partikelgehalt sowie die Partikeldichte bestimmt. Die Oberfläche der Partikel wurde durch Bestimmung der Amino- und Carboxylgruppen näher charakterisiert.

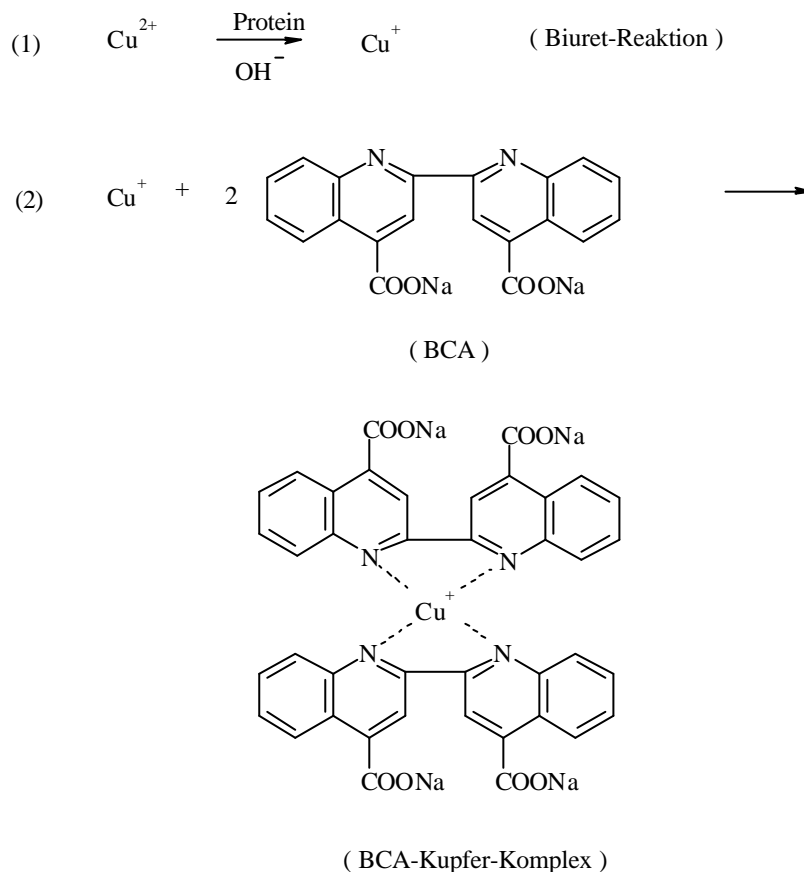
#### **4.1.1 Evaluierung des Desolvationsprozesses von HSA-Nanopartikeln**

Die Desolvation des HSAs mit Ethanol zu Nanopartikeln wurde durch die Bestimmung des Anteils an nichtdesolvatisiertem HSA im Desolvationsmedium und der Veränderung der Partikelgröße und der Partikelanzahl bei fortschreitender Ethanolzugabe evaluiert.

#### 4.1.1.1 Die BCA-Reaktion

Die Bestimmung des gelösten Proteins im Desolvatationsmedium erfolgte mit dem sensitiven BCA-Protein-Assay-Reagent, das erstmals 1985 von Smith et al. zur quantitativen Proteinbestimmung beschrieben wurde (Smith et al. 1985). Proteine ergeben mit BCA (Bicinchoninic acid) eine quantitativ auswertbare Farbreaktion, bei der zunächst im alkalischen Milieu das Protein  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen im Sinne einer Biuret-Reaktion reduziert (Abbildung 13; Reaktion (1)). Die  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen bilden dann mit BCA den dargestellten, farbigen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm (2).

Abbildung 13: Bildung des BCA-Kupfer-Komplexes in Gegenwart von Proteinen im alkalischen Milieu (nach Smith et al. 1985)



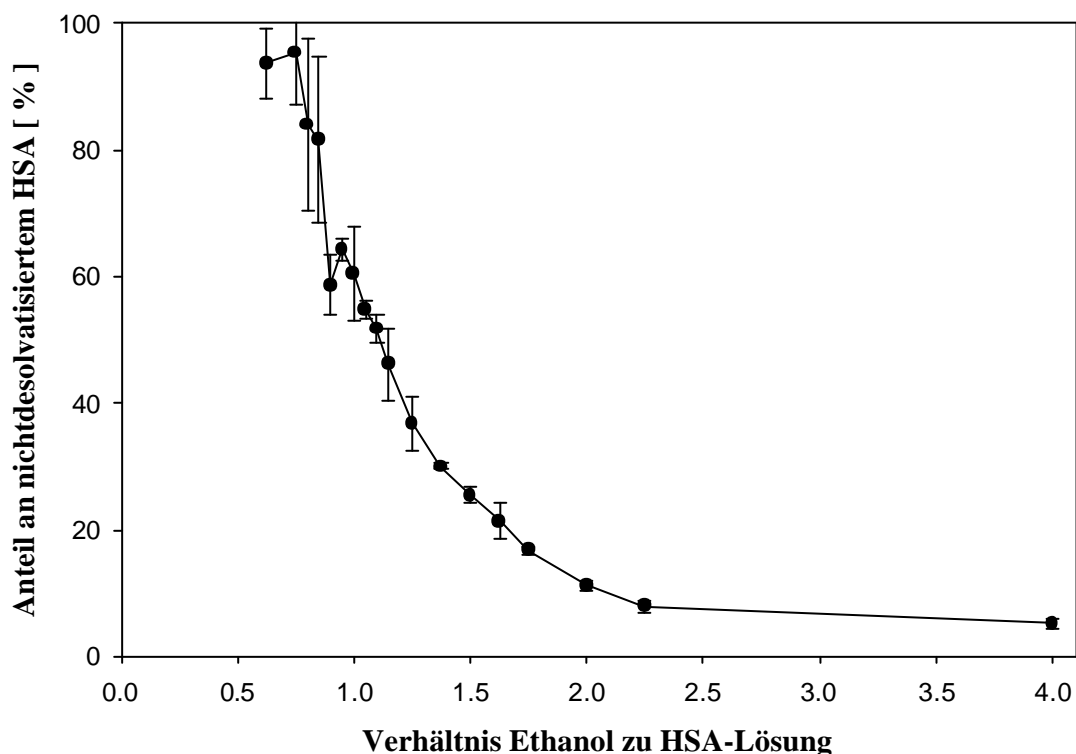
Zur Reduktion der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen sind neben den Peptidbindungen sowohl Cystein und Cystin, als auch Tryptophan und Thyrosin fähig, wobei die Beteiligung des Tryptophans, Thyrosins und der Peptidbindung bei höheren Temperaturen

ausgeprägter ist (Wiechelmann et al. 1988). Doch neben den genannten Aminosäuren reagieren auch andere funktionelle Gruppen mit dem BCA Reagenz, wie beispielsweise Aldehyd- und Hydrazidgruppen oder mit N-Hydroxysuccinimid aktivierte Carboxylgruppen (Tylianakis et al. 1994). Eine Selektivität für Proteine liegt also nicht vor.

#### 4.1.1.2 Der Anteil an nichtdesolvatisiertem HSA im Desolvatationsmedium

Die BCA-Reaktion wurde nicht in rein wäßrigem Medium, sondern in ethanol- und glutaraldehydhaltigem Medium durchgeführt. Da dies einen Einfluß auf die Extinktion des Protein-Assays haben könnte, wurde diese mögliche Fehlerquelle durch den Einsatz entsprechender Vergleiche mit in die Berechnung einbezogen.

Abbildung 14 Anteil an nichtdesolvatisiertem HSA in Abhängigkeit vom zugesetzten Ethanolvolumen während des Desolvatationsprozesses (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Die Proben wurden jedoch vor der BCA-Reaktion verdünnt, so daß die Verschiebung des Absorptionskoeffizienten durch den Ethanolgehalt der Probe und den Beitrag des

Glutaraldehyds zur Extinktion vernachlässigbar gering war und bei den höchsten Konzentrationen bei etwa 1,3 % der Gesamtabsorption lag.

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung in Abbildung 14 zeigen, daß der Anteil an gelöstem HSA von der 0,8-fachen Ethanolzugabe bis hin zur 2,25-fachen Zugabe signifikant abnimmt. Bei weiterer Ethanolzugabe verringert sich der Proteinanteil in der Lösung nur noch geringfügig.

### **4.1.1.3 Einfluß des Ethanolvolumens auf die Partikelgröße und die Partikelanzahl**

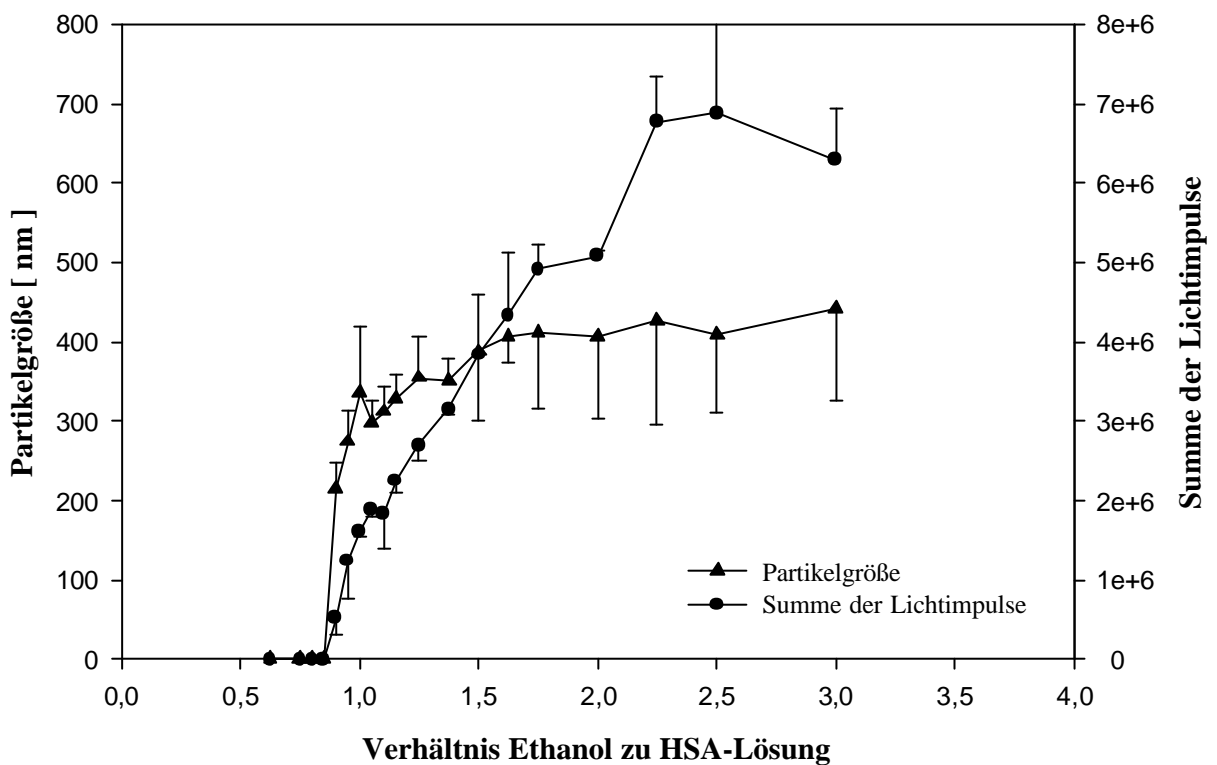
Die Partikelgröße wurde mit Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt. Zur Auswertung des Experimentes wurde der „effective Diameter“ gewählt. Neben dem Partikeldurchmesser wurden zusätzlich die „total Counts“ zur Auswertung des Versuches mit herangezogen. Diese Counts stellen die Summe der Lichtpulse dar, die während der PCS-Messung auf den Photomultiplier treffen. Die Anzahl dieser Lichtpulse hängt von mehreren Parametern ab, da sowohl mit zunehmender Partikelgröße als auch mit wachsender Partikelanzahl die Summe der Lichtimpulse ansteigt. Bei gleichbleibender Partikelgröße erlauben die Counts also eine Aussage über die Partikelanzahl in der Probe.

Die Ergebnisse der PCS-Messung sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Eine meßbare Partikelbildung setzte nach Zugabe des 0,8-fachen Ethanolvolumens zur HSA-Lösung ein. Dieser Wert korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der BCA-Bestimmung (siehe 4.1.1.2), da auch hier erst ab der 0,8-fachen Ethanolzugabe der Proteinanteil abnimmt. Der Zusatz des 0,8-fachen bis 1,5-fachen Ethanolvolumens führte zu einem signifikanten Anstieg der Partikelgröße. Eine weitere Ethanolzugabe zeigte keinen Einfluß auf den Teilchendurchmesser.

Dagegen bewirkte die Ethanolzugabe bis zum Zusatz des 2,5-fachen Volumens einen signifikanten Anstieg der Summe der Lichtimpulse. Dies bedeutet, da wie oben beschrieben die Lichtimpulssumme sowohl von der Partikelgröße als auch von der Partikelanzahl abhängt, sich die Partikelgröße aber ab dem 1,5-fachen Ethanolvolumen nicht mehr ändert, daß die Anzahl der Partikel in der Probe zwischen dem 1,5-fachen

und dem 2,5-fachen Ethanolzusatz nochmals deutlich ansteigt. Der Desolvationsprozeß ist folglich nach Abschluß des Partikelwachstums noch nicht beendet, was bei weiterer Zugabe des Desolvationsmittels zu einer gesteigerten Partikelausbeute führt.

Abbildung 15: Partikelgröße und Counts in Abhängigkeit des zugesetzten Ethanolvolumens (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Diese Betrachtung wurde durch die Ergebnisse der BCA-Bestimmung bekräftigt. Die Ergebnisse in Abbildung 14 zeigen eine signifikante Abnahme der HSA-Konzentration um weitere 20 % zwischen der Zugabe des 1,5-fachen Ethanolvolumens bis zum 2,5-fachen Volumen, was wie erwähnt, bei gleichbleibender Partikelgröße lediglich eine Zunahme der Partikelzahl bedeuten kann.

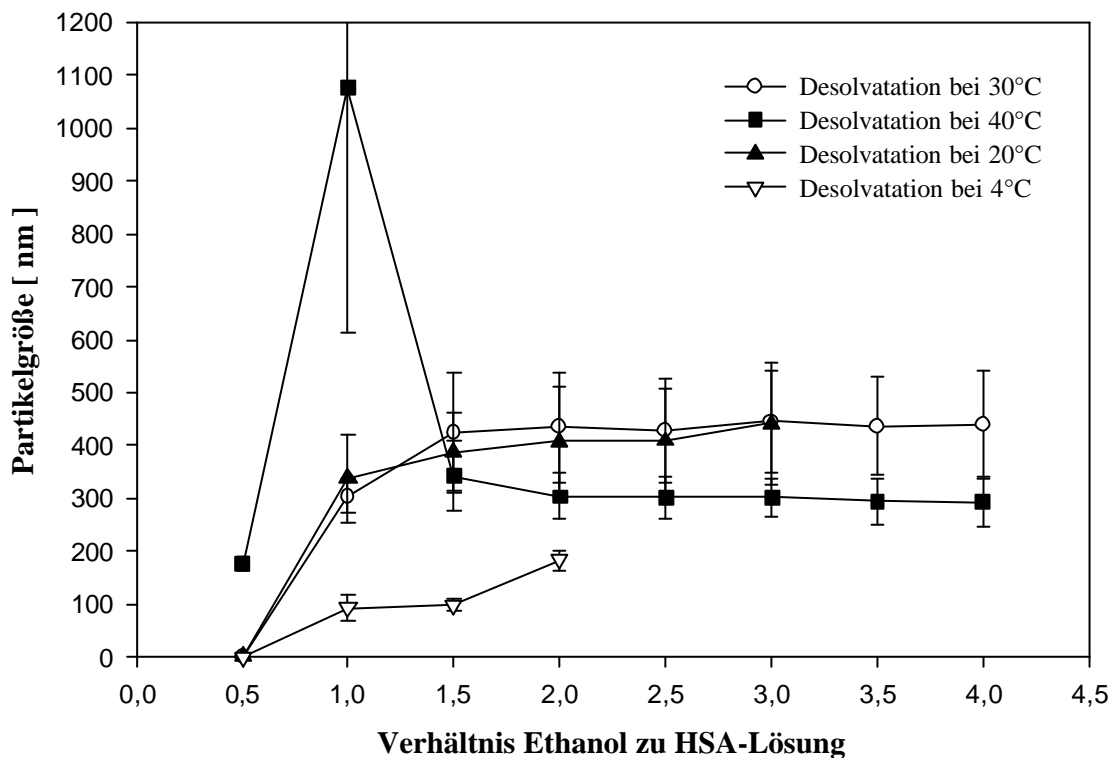
Bei der Desolvation kann man folglich drei Abschnitte unterscheiden. In dem ersten Teil der Desolvation bis zum Zusatz des 0,8-fachen Ethanolvolumens ist noch keine Partikelbildung nachweisbar. In dem zweiten Abschnitt bis zum Zusatz des 1,5-fachen Ethanolvolumens zur HSA-Lösung nimmt mit steigender Ethanolkonzentration im

Probengefäß die Partikelgröße zu. Der weitere Zusatz des Desolvatisierungsmittels im dritten Abschnitt führt dann zwar zu einer weiteren Zunahme der Partikelanzahl, aber nicht zu einer Vergrößerung des Partikeldurchmessers.

#### 4.1.1.4 Thermodynamische Kontrolle der Desolvatation

Um zu überprüfen, ob der Desolvatationsprozeß thermodynamisch kontrolliert ist, wurde die Desolvatation bei 4°C, 30°C und 40°C wiederholt und die Partikelgröße sowie die Summe der Lichtpulse als Kriterium zur Auswertung herangezogen.

Abbildung 16: Thermodynamische Kontrolle der Desolvatation anhand der Partikelgröße (n=3; Mittelwert ± S.D.)

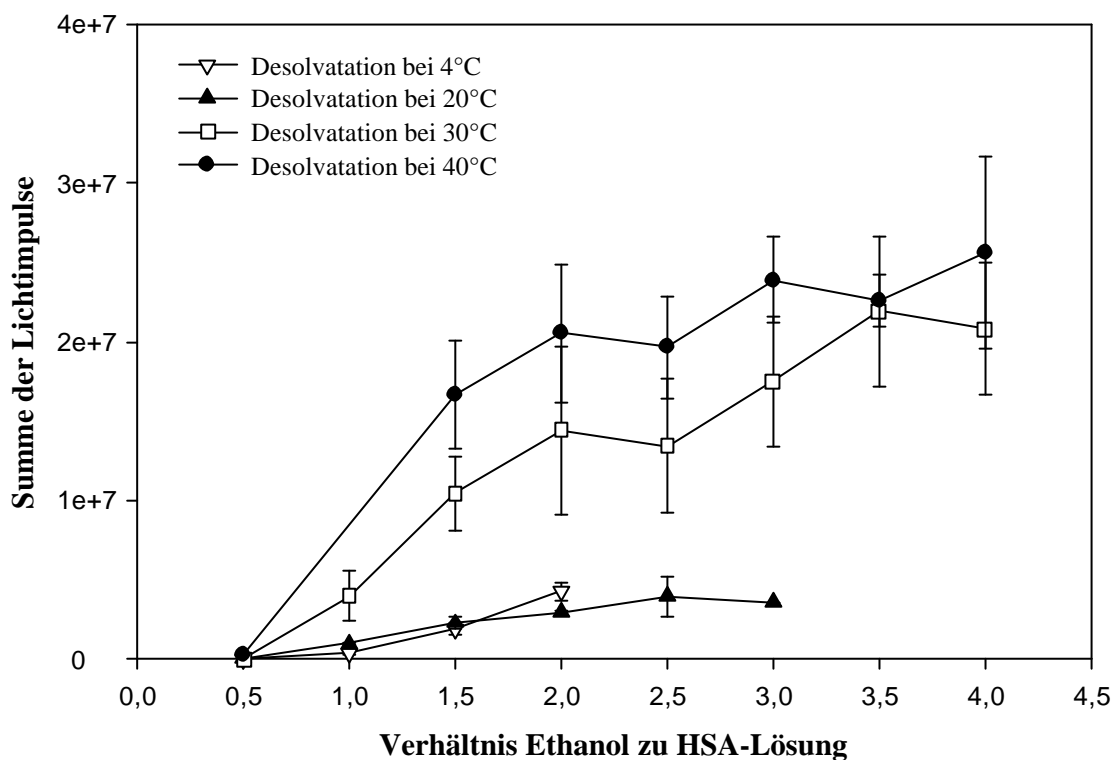


Die Partikelgröße wird offensichtlich durch die Temperatur während des Herstellungsprozesses nicht beeinflusst. Lediglich die 4°C-Proben sind deutlich kleiner als die entsprechenden Partikel bei höheren Temperaturen (siehe Abbildung 16). Wie die Ergebnisse in der Abbildung 17 zeigen, ist bei der Summe der Lichtimpulse dagegen eine gewisse Tendenz zu höheren Ausbeuten bei höheren Temperaturen erkennbar, was durch eine verminderte Löslichkeit des HSAs bei erhöhten



Temperaturen zu erklären ist. Die geringste Ausbeute ergab sich bei 20°C. Eine Aussage über die Ausbeute bei 4°C ist problematisch, da hier die Partikelgröße abnimmt und somit das Streulicht pro Partikel ebenfalls geringer wird. Eine Aussage über die Ausbeute anhand der Lichtimpulse ist deswegen nicht möglich. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich kein Hinweis auf eine thermodynamische Kontrolle des Desolvationsprozesses.

Abbildung 17: Thermodynamische Kontrolle der Desolvation anhand der Lichtimpulssumme im Streulichtexperiment (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



#### 4.1.2 Evaluierung der Quervernetzung von HSA-Nanopartikeln

Die Quervernetzung von HSA ist sowohl auf chemischem als auch auf thermischem Weg über die Einwirkung von Wärme möglich (Scheffel et al. 1972, Kramer 1974, Gupta and Hung 1989, Chen et al. 1994, Esposito et al. 1996). Eine Stabilisierung der Partikel auf chemischem Weg ist durch den Zusatz von Carbonylverbindungen wie den Aldehyden Glutaraldehyd bzw. Formaldehyd und 2,3-Butadion (Allémann et al.

1993), modifiziertem Dextran (Lin et al. 1994) oder Säurechloriden (Edwards-Levy et al. 1993, 1994, Levy et al. 1994, 1995, Andry et al. 1996) möglich.

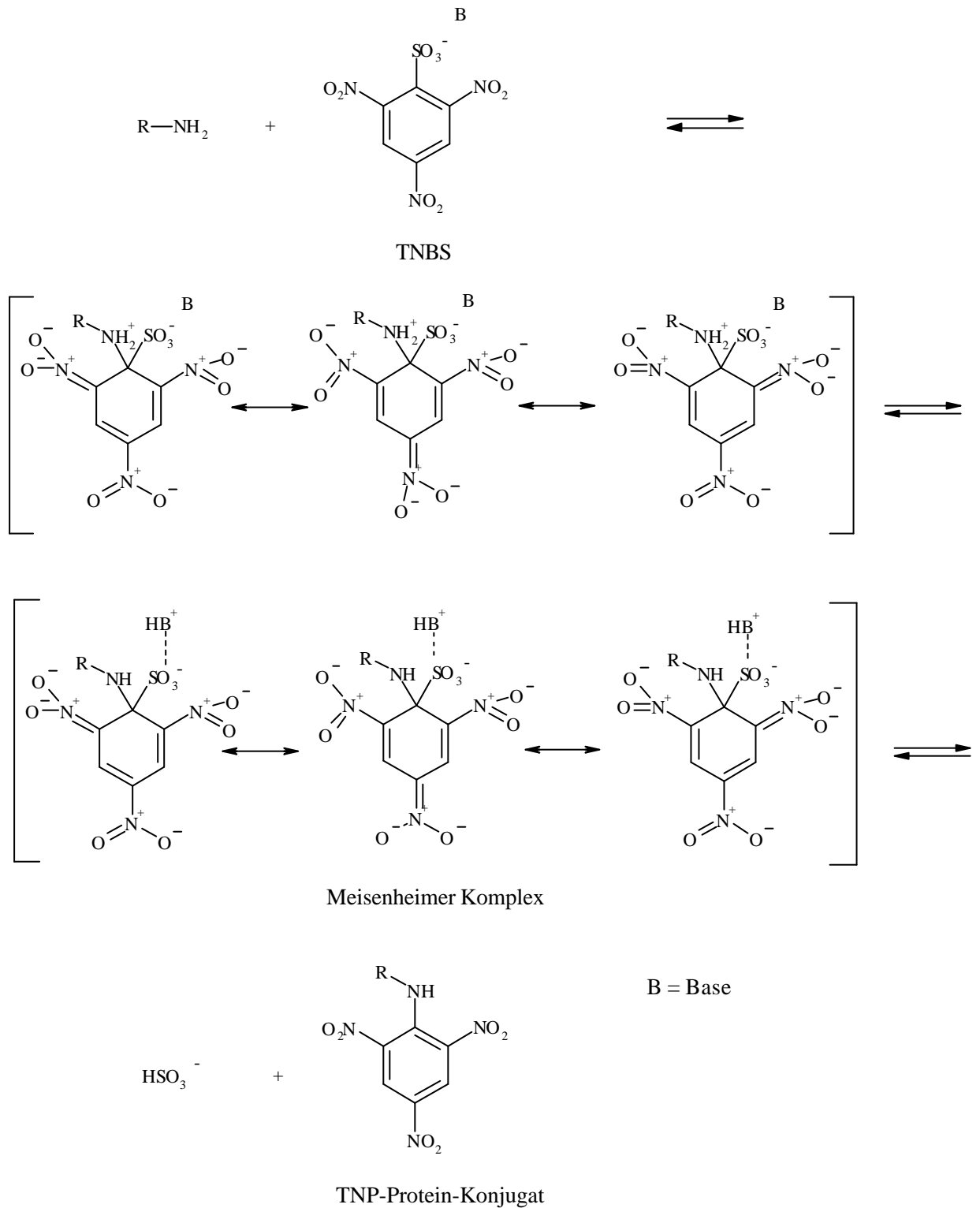
Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HSA-Nanopartikel wurden mit Glutaraldehyd oder durch Hitzedenaturierung stabilisiert und der Einfluß der Quervernetzerkonzentration bzw. der Denaturierungszeit und -temperatur auf die Anzahl der Aminogruppen an der Partikeloberfläche sowie auf den Anteil an freiem HSA nach der Quervernetzung im Desolvatationsmedium evaluiert. Zusätzlich wurde der Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf die Partikelgröße und das Zetapotential untersucht.

### **4.1.2.1 Bestimmung der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche**

Okyama und Satake (1960) beschrieben erstmals die spezifische Umsetzung von 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure (= TNBS) mit freien Aminogruppen zu Trinitrophenylderivaten (= TNP-Derivaten). Da diese Reaktion unter sehr milden Bedingungen hinsichtlich Temperatur und pH-Wert abläuft, nutzte Habeeb (1966) die TNBS-Reaktion zur Bestimmung der freien Aminogruppen von bovinem Serumalbumin nach der Umsetzung mit Formaldehyd.

Bei der TNBS-Reaktion greifen die Aminogruppen das TNBS im Sinne einer nucleophilen, aromatischen Substitution an, wie in Abbildung 18 dargestellt. Lediglich das unprotonierte Amin weist eine genügend starke Nucleophilie zur Reaktion auf. Die Reaktivität der Amine steigt mit zunehmender Basizität, nur sekundäre und primäre Alkylamine sind vergleichsweise unreaktiv. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Reaktion ist die Bildung des tetrasubstituierten Ring-Intermediats (Means et al. 1972). Das gebildete TNP-Protein-Konjugat weist bei einer Wellenlänge von 349 nm einen signifikant höheren Absorptionskoeffizienten auf als das reine TNBS. Diese Zunahme der Extinktion wurde zur quantitativen Auswertung herangezogen (Habeeb 1966). Der molare Extinktionskoeffizient einer Aminogruppe im Protein läßt sich jedoch nicht bestimmen, da unterschiedliche Proteine zu unterschiedlich starken Veränderungen des TNBS-Spektrums führen (Habeeb 1966).

Abbildung 18: Reaktionsschema der TNBS-Reaktion (nach Means et al. 1972)



Eine Kalibrierung ist lediglich bei der Verwendung von Aminosäuren möglich, wobei sich hier sogar  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Aminogruppen unterscheiden lassen (Fields 1972). Eine

Verallgemeinerung dieser Absorptionskoeffizienten auf Proteine wie von Sashidhar et al. (1994) konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden.

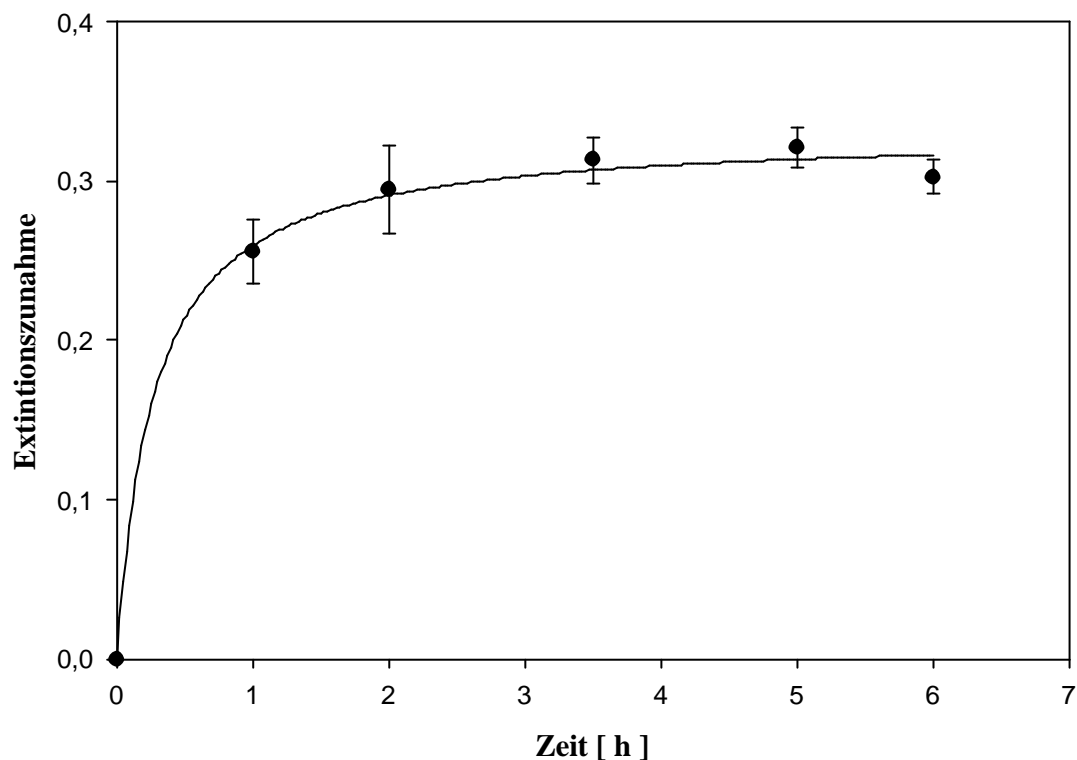
Prinzipiell ist eine nucleophile, aromatische Substitution des TNBS auch mit Hydroxylionen und Thiolen möglich. Thiole reagieren unter ähnlichen Bedingungen wie primäre Amine (Fields 1972). Gegenüber Hydroxylionen wird die Reaktion mit Aminen bevorzugt, da Hydroxylionen aufgrund von Coulomb'schen Abstoßungskräften wesentlich langsamer und nur bei höherer Ionenstärke, bei höherem pH-Wert und erhöhter Temperatur mit TNBS reagieren. Durch eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen kann also eine Selektivität für Aminogruppen erzielt werden (Means et al. 1972). Da unmodifizierte HSA-Nanopartikel keine Thiolgruppen an der Partikeloberfläche aufweisen, ist eine Verfälschung des Aminogruppengehaltes durch Thiolgruppen nicht möglich.

Die von Habeeb (1966, 1967) beschriebenen Methoden zur quantitativen Bestimmung der Aminogruppen von Proteinen beziehen sich auf die Bestimmung von gelösten Proteinen. In dieser Arbeit stand jedoch die Bestimmung reaktiver Aminogruppen an der Oberfläche von Nanopartikeln im Vordergrund. Da das Endprodukt der TNBS-Reaktion nicht löslich war, sondern in Partikelform vorlag, war eine direkte photometrische Bestimmung des Konjugates und damit eine Auswertung über die Extinktionszunahme bei 349 nm nicht möglich. Um die Aminogruppen dennoch quantifizieren zu können, wurden die Partikel mit TNBS umgesetzt und im Anschluß an die Reaktion abzentrifugiert. Durch das Abzentrifugieren der Partikel wurde das TNP-Proteinkonjugat vollständig aus dem Überstand entfernt, so daß eine photometrische Bestimmung des noch nicht abreagierten TNBS im Überstand möglich war. Die Differenz zur Ausgangskonzentration des TNBS entspricht der Menge an gebundenem TNBS und damit der Anzahl der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche. Probleme mit unlöslichen TNP-Proteinkonjugaten (Habeeb 1966, 1967) und Veränderungen des Absorptionsspektrums durch Komplexierung von Sulfitionen (Fields 1972) wurden durch diese Methode umgangen. Antoni et al. (1983) lösten das Problem bei der Aminogruppenbestimmung unlöslicher Beads durch Reaktion des nicht abreagierten TNBS mit Glycin im Überschuß. Doch da eine

Quantifizierung der Aminogruppen mit einer direkten Bestimmung des nicht abreagierten TNBS möglich war, wurde diese Variante zur Bestimmung gewählt.

Alternative Bestimmungsmethoden zur Quantifizierung der Aminogruppen, wie von Gaur and Gupta (1989) und Kakabakos et al. (1994) beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Abbildung 19: Evaluierung der TNBS-Reaktionszeit (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)

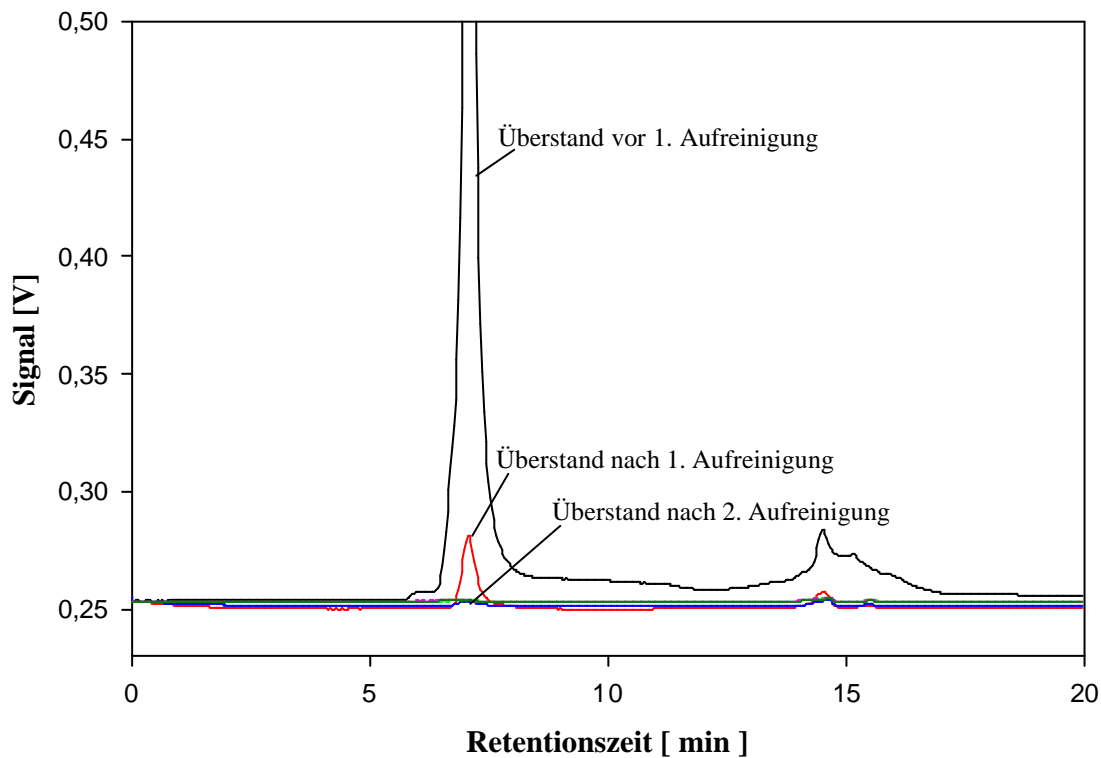


Zur Evaluierung der Reaktionszeit wurde reines HSA mit TNBS umgesetzt und die Änderung der Extinktion im Vergleich zur reinen TNBS-Lösung über 6 h beobachtet. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt. Der größte Extinktionsunterschied ergab sich nach 5-6 h. Da die Extinktionszunahme zwischen 2 h und 6 h Reaktionszeit nicht signifikant war, wurde die Inkubationsdauer für die weiteren Untersuchungen auf 2 h festgelegt.

#### 4.1.2.2 Aufreinigung der Nanopartikel

Nach der Herstellung bzw. der Oberflächenmodifikation mußten die Nanopartikel vielfach aufgereinigt werden, um restliches Protein, überschüssigen Quervernetzer oder etwaige Reagenzien zur Oberflächenmodifikation aus dem Suspensionsmedium zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte durch 5-faches Abzentrifugieren und Resuspendieren unter Anwendung von Ultraschall. Zur Evaluierung der Partikelreinigung wurden die Überstände der einzelnen Waschschriffe von HSA-Nanopartikeln mit Gelpermeationschromatographie auf noch enthaltenes gelöstes HSA analysiert. Die Chromatogramme der 5 Waschschriffe sind in Abbildung 20 übereinandergelegt und zeigen deutlich, daß bereits nach dem 2. Reinigungsschritt, also vor dem 3. Aufreinigen, so gut wie kein HSA mehr bei einer Retentionszeit von 7-8 min im Partikelüberstand nachweisbar ist.

Abbildung 20: Gelpermeationschromatographische Bestimmung von gelösten Komponenten nach verschiedenen Reinigungsschritten bei der Aufreinigung von HSA-Nanopartikeln



Auch die niedermolekularen Fraktionen bei etwa 15 min Retentionszeit sind nach dem 3. Waschschrift nicht mehr im Chromatogramm erkennbar. Um bei der routinemäßigen Aufreinigung ein Verschleppen der Verunreinigungen zu vermeiden, wurden zur Sicherheit zwei weitere Reinigungsschritte durchgeführt.

#### **4.1.2.3 Quervernetzung der Nanopartikel mit Glutaraldehyd**

Die gängigste Methode zur Quervernetzung und damit zur Stabilisierung von Nano- und Mikropartikeln aus Proteinen wie HSA, Gelatine oder Casein ist die chemische Umsetzung mit dem homobifunktionellen Glutaraldehyd (Marty et al. 1978, Longo et al. 1982, Allémann et al. 1993, Jayakrishnan et al. 1994, Latha and Jayakrishnan 1995). Die Reaktion von Glutaraldehyd mit Proteinen wurde von Habeeb und Hiramoto (1968) umfassend untersucht. Der Glutaraldehyd reagiert dabei unter Ausbildung von Schiff'schen Basen mit den  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins (Rubino et al. 1993).

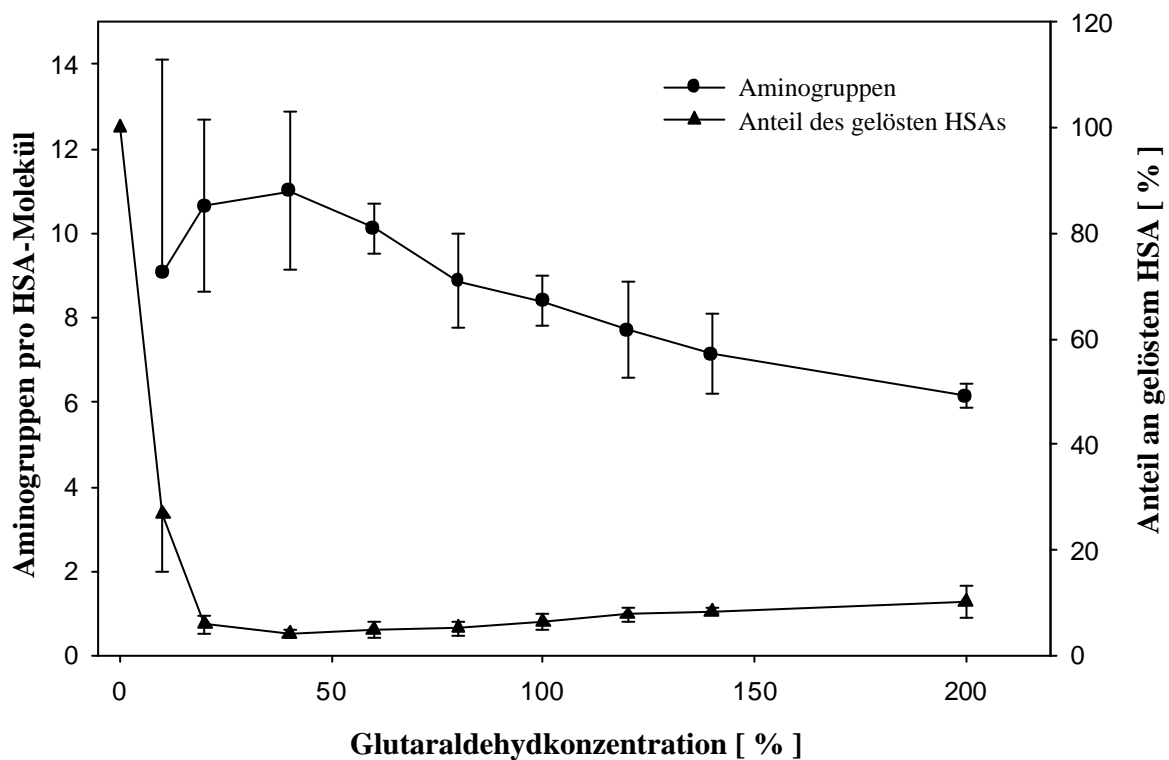
Zur Evaluierung des Grades der Quervernetzung wurde der Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf die Anzahl der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche untersucht, da diese gleichzeitig auch als Maß für den Grad der Quervernetzung gelten kann (Rubino et al. 1993). Außerdem stellen die Aminogruppen in vielen Fällen den Angriffspunkt für die Kopplung von heterobifunktionalen und homobifunktionalen Spacern dar, wie z.B. für das im weiteren Verlauf der Arbeit verwendete Sulfo-MBS (siehe 4.4.1). Um die Stabilität der Partikel in Abhängigkeit der Quervernetzung zu beurteilen, wurde nach Verdünnen der Nanopartikelsuspension der Anteil des aus der Nanopartikelmatrix wieder in Lösung gehenden HSAs im Partikelüberstand bestimmt und die Abhängigkeit der Partikelgröße und des Zetapotentials von der zugegebenen Aldehydmenge untersucht.

##### *4.1.2.3.1 Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf die Anzahl freier Aminogruppen auf der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln*

Steigende Mengen an Glutaraldehyd von 0-200 % wurden zu den desolvatisierten HSA-Nanopartikeln zupipettiert. 100 % Glutaraldehydzusatz bedeutet, daß die Menge

an Aldehyd zugesetzt wurde, die theoretisch benötigt würde, um alle 60 Aminogruppen des HSAs (siehe 2.2.1.1.2) unter der Voraussetzung quervernetzten, daß beide Carbonylfunktionen des Glutaraldehyds reagieren. Die freien, nicht abreagierten Aminogruppen wurden mit TNBS quantitativ bestimmt (siehe 4.1.2.1). Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen eine signifikante Abnahme der Aminogruppen bei steigendem Glutaraldehydzusatz von 40 % bis 200 %. Diese Abnahme der Aminogruppen weist auf einen steigenden Grad der Quervernetzung hin, wie von Lin et al. (1994) und Rubino et al. (1993) beschrieben.

Abbildung 21: Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf die Anzahl freier Aminogruppen und den Anteil des in gelöster Form vorliegenden HSAs (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Die unerwartet niedrige Aminogruppenzahl bei 10 % und 20 % Glutaraldehydzusatz ist auf ein teilweises Wiederauflösen der Partikelmatrix zurückzuführen, bei welchem ein Anteil an HSA wieder in Lösung geht. Das gelöste HSA bildet dann bei der TNBS-Reaktion lösliche TNP-HSA-Konjugate, die, wie in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben,



einen wesentlich größeren Extinktionskoeffizienten aufweisen als reines TNBS. Damit wird die Messung falsch negativ beeinflusst, da der Überstand der Partikel nach der Zentrifugation durch das gelöste TNP-HSA-Konjugat eine stärkere Absorption bei 349 nm aufweist als mit reinen Partikeln zu erwarten wäre. Die Quervernetzung mit 10 % Glutaraldehyd führt also zu instabilen Partikeln. Das gleiche gilt für die Quervernetzung mit 20 % Glutaraldehyd, allerdings scheint hier der Quervernetzungsgrad deutlich höher und damit das Wiederauflösen wesentlich geringer ausgeprägt.

#### *4.1.2.3.2 Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf den Anteil an gelöstem HSA im Partikelüberstand*

Die Folgerungen über die Partikelstabilität wurden von den Ergebnissen der BCA-Bestimmung des Anteils an gelöstem HSA nach der Aufreinigung der Partikel im Überstand, wie in Abbildung 21 dargestellt, untermauert. Die Graphik zeigt, daß bei der Quervernetzung der Partikel mit 10 % Glutaraldehyd etwa 30 % der Partikelmatrix wieder in Lösung geht, die Partikel sich also zu einem beträchtlichen Teil wieder auflösen. Dies erklärt die niedrige Aminogruppenzahl bei 10 % Quervernetzung wie in Abschnitt 4.1.2.3.1 beschrieben. Beim Zusatz von 20 % Aldehyd dagegen wird der Anteil an HSA in Lösung auf etwa 5 % reduziert, bei 40 % liegt er bereits unter 3 %. Die niedrigste Aldehydmenge, die zur Herstellung stabiler HSA-NP benötigt wird, liegt demnach bei 40 %, was sehr gut mit Ergebnissen von Roser und Kissel (1993) korreliert.

#### *4.1.2.3.3 Evaluierung der Quervernetzungszeit*

Zur Evaluierung der Quervernetzungszeit wurden die noch ungewaschenen Nanopartikel nach der Zugabe des Quervernetzers im Anschluß an die Desolvation über einen Zeitraum von 14 Tagen bei RT gelagert. Das Fortschreiten der Quervernetzung sollte anhand der Abnahme der freien Aminogruppen untersucht werden. Als Glutaraldehydkonzentrationen wurden 40 % und 100 % gewählt, da 40 % die niedrigste Quervernetzerkonzentration zur Herstellung stabiler Nanopartikel war (siehe 4.1.2.3.1) und 100 % als ein Beispiel für höhere Glutaraldehydkonzentrationen

dienen sollte. Die Ergebnisse der Aminogruppenbestimmung sind in Tabelle 3 dargestellt.

Ein signifikanter Einfluß der Reaktionszeit des Glutaraldehyds konnte bei Quervernetzungszeiten von 6 h bis 14 Tagen weder bei den 40 %-Partikeln noch den 100 %-Partikeln festgestellt werden. Dies Ergebnis stimmt grundsätzlich mit den Resultaten von Lin et al. (1993) überein, der einen zunehmenden Grad der Quervernetzung lediglich während der ersten zwei Stunden der Quervernetzung fand, indem er den Trübungsgrad der Partikelsuspension photometrisch verfolgte. Allerdings zeigt sich in diesen Experimenten nach 6 h noch eine leichte Instabilität der Partikel, denn der 6 h-Wert erscheint im Vergleich zu den restlichen Werten sehr niedrig, da kürzere Reaktionszeiten theoretisch zu einem geringeren Grad der Quervernetzung führen sollten und damit zu höheren Aminogruppenzahlen. Deswegen lassen die niedrigen 6 h-Werte auf eine noch unvollständige Quervernetzung mit teilweise Wiederauflösen der Partikelmatrix schließen, was dann wiederum zu einer Verfälschung der Aminogruppenbestimmung aufgrund löslicher TNP-HSA-Konjugate führt, wie bereits in Abschnitt 4.1.2.3.1 beschrieben.

Tabelle 3: Einfluß der Quervernetzungszeit auf die Anzahl freier Aminogruppen (n=3)

Quervernetzungs- zeit [ h ]	Aminogruppen pro HSA-Molekül			
	40 % Glutaraldehyd		100 % Glutaraldehyd	
	Mittelwert	S.D.	Mittelwert	S.D.
6	8,309	2,041	6,773	1,118
24	11,861	1,815	8,125	0,558
48	9,988	0,820	7,505	0,435
336	12,885	1,200	8,441	0,095

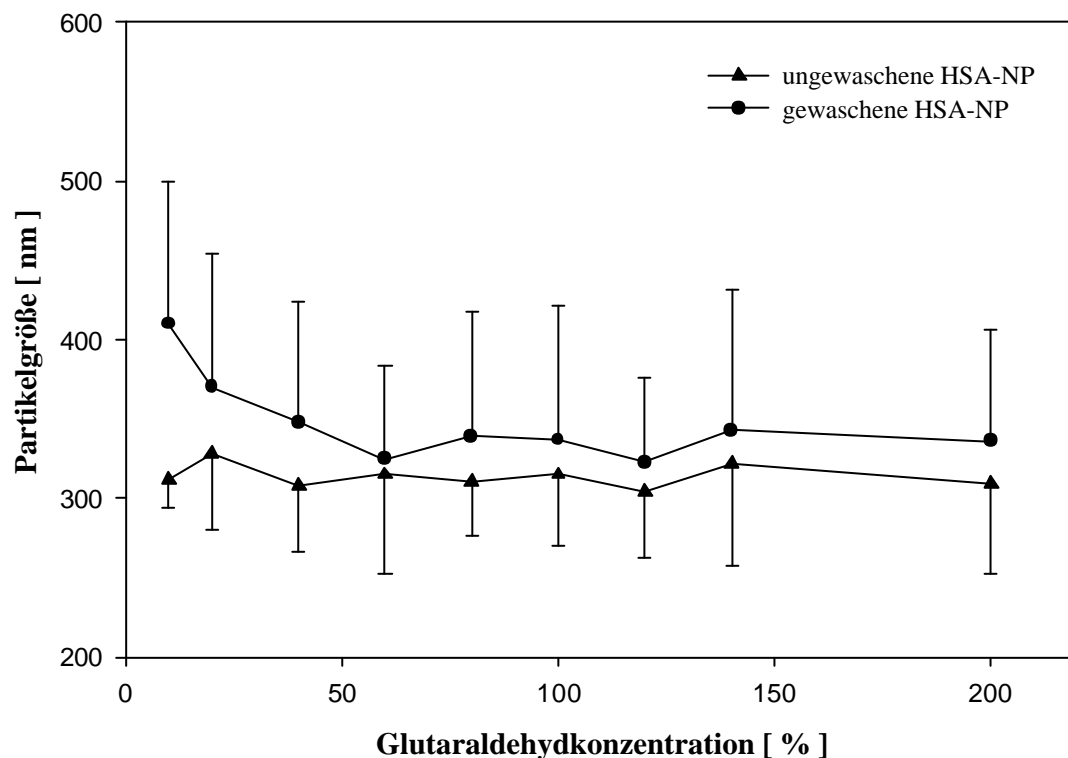
Um dies zu überprüfen, wurde der Anteil an freiem HSA mit dem BCA-Assay bestimmt. Das BCA-Assay ergab einen Proteingehalt von etwa 5 % nach 6 h, aber nur noch 1,3 % nach 24 h Quervernetzung für die mit 40 % Glutaraldehyd gehärteten

Nanopartikel. Für die mit 100 % Aldehyd umgesetzten Partikel ergaben sich vergleichbare Werte von 6,9 % nach 6 h und 1,0 % nach 24 h Quervernetzungszeit. Die Quervernetzung ist demnach nach 6 h Reaktionszeit noch nicht vollständig abgeschlossen. Eine Quervernetzungszeit von 24 h sollte unabhängig von der eingesetzten Glutaraldehydkonzentration eingehalten werden.

#### 4.1.2.3.4 Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf die Partikelgröße

Die Partikelgrößenbestimmungen mit Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) wurden sowohl mit den gewaschenen als auch mit den ungewaschenen, glutaraldehyd-stabilisierten Partikeln durchgeführt und der Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf den Partikeldurchmesser untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

Abbildung 22: Einfluß der Quervernetzung auf die Partikelgröße von HSA-Nanopartikeln (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)

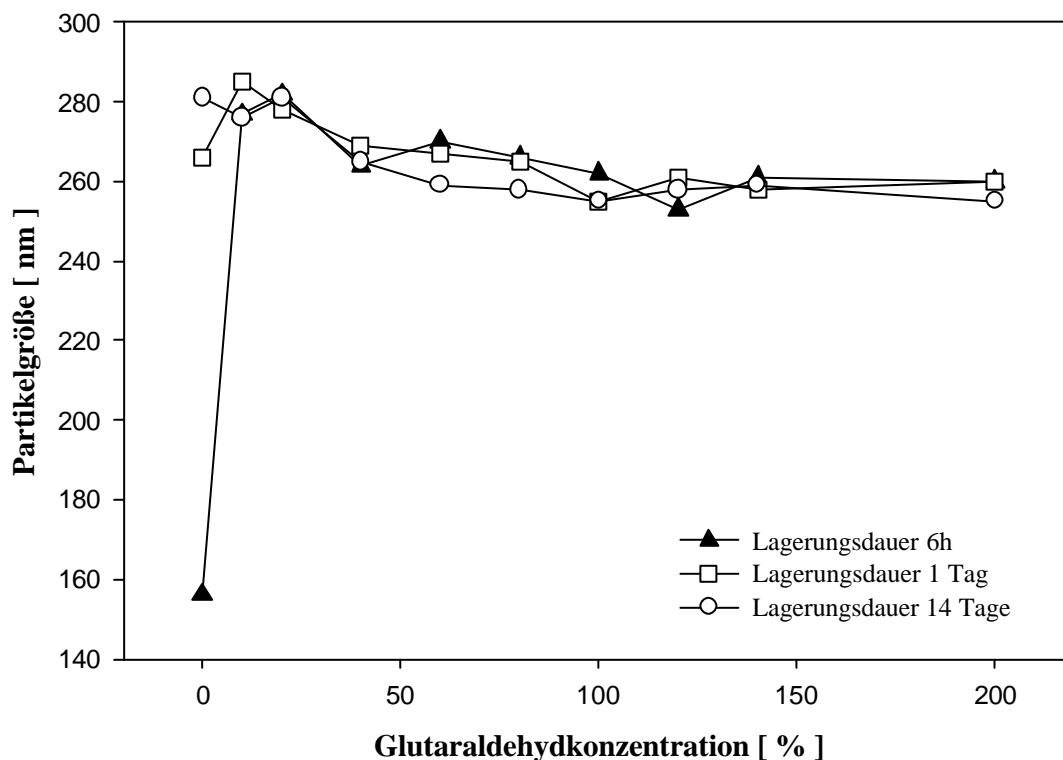


Die Graphik zeigt, daß die Partikelgröße der HSA-Nanopartikel unabhängig vom Grad der Quervernetzung ist. Sogar Partikel, die nach den Abschnitten 4.1.2.3.1 und 4.1.2.3.2 nicht stabil sind, unterscheiden sich hinsichtlich der Partikelgröße nicht von

den stabilen Präparationen. Die Ermittlung der Partikelstabilität über die Bestimmung der Aminogruppen und des gelösten Anteils an HSA im Partikelüberstand erscheint damit als wesentlich empfindlichere Methode im Vergleich zur Partikelgrößenbestimmung. Eine Instabilität der mit 10 % und mit 20 % Glutaraldehyd gehärteten Partikel ist lediglich bei den gewaschenen Partikeln zu vermuten, da hier eine leichte Größenzunahme im Vergleich zu den anderen Präparationen zu erkennen ist. Diese Größenzunahme ist vermutlich aufgrund der unzureichenden Quervernetzung auf ein Quellen der Partikel im Laufe des Waschprozesses zurückzuführen, da das Desolvatisierungsmittel Ethanol nun vollständig entfernt wurde.

#### 4.1.2.3.5 Einfluß der Lagerung auf die Partikelgröße

Abbildung 23: Einfluß der Lagerungszeit auf die Partikelgröße von HSA-Nanopartikeln in Abhängigkeit vom Grad der Quervernetzung



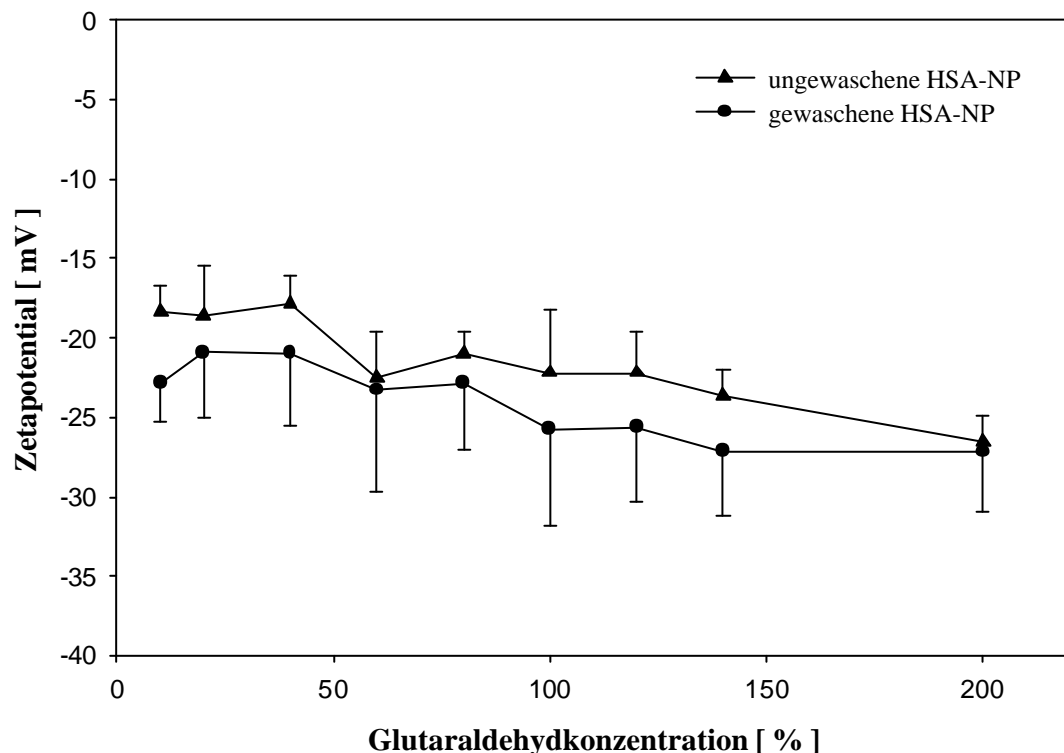
Um zu zeigen, wie sich die Partikelgröße bei Lagerung bei RT über einen Zeitraum von 14 Tagen in Abhängigkeit vom Quervernetzungsgrad verändert, wurde die Partikelgröße der gewaschenen Partikel nach 6 h, 1 Tag und 14 Tagen bestimmt. Die

Lagerung hatte jedoch bei keiner der verschieden stark gehärteten Partikel Einfluß auf den mittleren Partikeldurchmesser, wie in Abbildung 23 gezeigt.

#### 4.1.2.3.6 Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf das Zetapotential

Die Zetapotentialmessung der mit verschiedenen Glutaraldehydkonzentrationen quervernetzten Partikel wurde in PBS-Puffer pH 7,0 durchgeführt, um Verfälschungen aufgrund von schwankenden pH-Werten und Veränderungen der Ionenstärke bei der Bestimmung zu vermeiden. Als Ergebnis dieser Bestimmung ist eine deutliche Tendenz des Zetapotentials erkennbar, mit zunehmender Quervernetzung stärker negativ zu werden (siehe Abbildung 24).

Abbildung 24: Einfluß der Glutaraldehydkonzentration auf das Zetapotential von HSA-Nanopartikeln (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Ein höherer Grad an Quervernetzung führt durch eine Reduktion der Aminogruppen zu einer Abnahme an positiven Ladungen an der Partikeloberfläche. Die Zahl der Carboxylgruppen und damit die Zahl der negativen Ladungen bleibt unverändert, so daß es mit zunehmendem Grad der Quervernetzung zu einer Abnahme des

Zetapotentials kommen sollte. Die in Abbildung 24 gezeigte Abnahme des Zetapotentials ist allerdings statistisch nicht signifikant. Ein Unterschied zwischen gewaschenen und nicht gewaschenen Partikeln ist hinsichtlich der Zetapotentialreduktion nicht erkennbar, lediglich liegt das Zetapotential der gewaschenen Partikel niedriger als das der ungewaschenen. Dies mag auf eine Anlagerung freien HSAs an die Partikeloberfläche der ungereinigten Partikel zurückzuführen sein.

### **4.1.2.4 Stabilisierung der HSA-Nanopartikel durch Hitzedenaturierung**

Eine mögliche Alternative zur Quervernetzung proteinbasierter Nanopartikel ist die Denaturierung durch Einwirkung von Wärme über einen längeren Zeitraum. Diese Methode zur Partikelhärtung wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben, allerdings meist für die Herstellung von Nano- und Mikropartikeln in zweiphasigen Systemen (Scheffel 1972, Kramer 1974, Widder et al. 1979, Lee et al. 1981, Gallo et al. 1984, Gupta and Hung 1989, Rubino et al. 1993, Esposito et al. 1996, MacAdam et al. 1997). Aber auch durch Desolvation hergestellte Partikel können durch Einwirkung von Wärme gehärtet werden, was in Arbeiten von Chen et al. (1994) bereits mit Albumin-Mikropartikeln bei einer Temperatur von 75°C für 15 bis 30 min gezeigt wurde.

#### *4.1.2.4.1 Evaluierung der Hitzedenaturierung anhand der freien Aminogruppen*

Zur Evaluierung der Hitzedenaturierung wurden die desolvatisierten HSA-Nanopartikel bei verschiedenen Temperaturen (50°C; 60°C; 70°C) über einen Zeitraum von 48 h erhitzt. Der Grad der Quervernetzung bzw. die Partikelstabilität wurde wie bereits bei der Evaluierung der Glutaraldehydstabilisierung, durch Ermittlung der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Die Hitzedenaturierung bei 50°C führte selbst bei einer Erwärmung über 48 h nicht zu einer stabilen Nanopartikelpräparation. Die extrem niedrigen Aminogruppenzahlen zwischen 2 und 6 h Denaturierungszeit weisen auf einen erheblichen Anteil an

gelöstem HSA hin, das, wie in Abschnitt 4.1.2.3.1 beschrieben, mit der Bestimmung der Aminogruppen interferiert und damit falsch negative Ergebnisse lieferte.

Tabelle 4: Aminogruppengehalt auf der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln, die durch Hitzedenaturierung stabilisiert wurden (n=3)

Denaturierungszeit [ h ]	Aminogruppen pro HSA-Molekül					
	50°C		60°C		70°C	
	Mittelwert	S.D.	Mittelwert	S.D.	Mittelwert	S.D.
nach Zentrifugation						
2	-7,447	0,357	3,906	0,718	13,580	1,530
4	0,183	1,443	7,519	0,611	13,191	0,524
6	3,131	0,571	8,756	1,049	12,748	1,295
24	11,363	0,309	10,761	0,279	12,814	0,221
48	11,648	0,696				
nach Filtration						
2	14,099	0,779				
4	14,790	3,742				
6	15,111	1,224				
24	14,451	1,418				
48	13,606	0,871				

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die 50°C-Proben durch eine Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 Da zentrifugiert, um eventuell gelöstes TNP-HSA abzutrennen. Das Ergebnis der erneuten Messung ist in Tabelle 4 dargestellt und zeigt hier deutlich höhere Aminogruppenzahlen als vor der Filtration — ein eindeutiger Beweis für die Instabilität der bei 50°C behandelten Partikel. Da die Anzahl der Aminogruppen der 50°C-Partikel sich mit zunehmender Denaturierungszeit und damit zunehmendem Grad der Härtung nicht ändert, kann die steigende Stabilität der Partikel lediglich mit einer intrapartikulären Stabilisierung erklärt werden, an der die funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche nicht beteiligt sind.

Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, daß bei einer vergleichbaren Desolvation der Partikel die Glutaraldehydquervernetzung zu geringeren Aminogruppenzahlen auf der Partikeloberfläche (7-11 Aminogruppen pro HSA-Molekül) führt, da der Glutaraldehyd nur von der Oberfläche der Partikel her angreifen kann. Der Mechanismus der Quervernetzungsreaktion unter Einfluß von Glutaraldehyd liefert einen weiteren Grund für niedrigere Aminogruppenzahlen auf der Partikeloberfläche: Glutaraldehyd reagiert mit zwei Aminogruppen unter Ausbildung von Schiff'schen Basen, während bei einer möglichen Kondensationsreaktion der Hitzedenaturierung sowohl Aminogruppen als auch Carboxylgruppen beteiligt sein könnten (Esposito et al. 1996).

Die Instabilität der bei 60°C denaturierten Partikel ist wesentlich geringer als bei den 50°C-Proben. Allerdings erscheint auch hier nach 24 h noch keine optimale Härtung erreicht zu sein, da der Maximalwert der Aminogruppen deutlich unter den Werten der 70°C-Proben liegen. Eine Kontrolle durch Zentrifugation durch Ultrafiltrationseinheiten wurde nicht durchgeführt. Die unzureichende Stabilität der Partikel nach 24 h Inkubation bei 60°C bestätigt die Aussagen von Carter und Ho (1994), daß Albumin Hitzepasteurisierung bei 60°C über eine Dauer von 10 h ohne Zerstörung der Proteinstruktur übersteht.

Die Denaturierung bei 70°C dagegen führte bereits nach 2 h zu stabilen Partikeln. Eine Fortsetzung des Erhitzens ergab keine weitere Veränderung der Aminogruppenzahlen. Die Kontrollwerte nach Zentrifugation durch Ultrafiltrationseinheiten führten zu identischen Werten wie ohne Filtration, d.h. kein HSA hat sich während der TNBS-Reaktion aus der Partikelmatrix gelöst. Die absolut gesehen niedrigere Aminogruppenzahl der bei 70°C quervernetzten Partikel im Vergleich zu den gefilterten Werten der 50°C-Proben sind möglicherweise durch einen höheren Grad der Quervernetzung bei 70°C zu erklären, da höhere Temperaturen zu einer stärkeren Quervernetzung von Proteinpartikeln führen können (Chen et al. 1994).

Hitzestabilisierung von HSA-Nanopartikeln bei 50°C für weniger als 48 h, sowie bei 60°C für weniger als 24 h führt folglich zu keiner ausreichenden Härtung der



Nanopartikel, bei 70°C dagegen ist eine Denaturierungszeit von 2 h für eine hohe Partikelstabilität ausreichend.

#### *4.1.2.4.2 Vergleich der Aminogruppen an der Partikeloberfläche mit der Aminogruppenanzahl des nativen Proteins*

Nach der Härtung des desolvatisierten HSAs zu stabilen Nanopartikeln können demnach maximal 24 % der Aminogruppen des HSA-Moleküls an der Oberfläche der Partikel nachgewiesen werden. Dieser Wert erscheint zunächst sehr gering, ein Vergleich mit den verfügbaren Aminogruppen des reinen, nicht desolvatisierten bzw. denaturierten HSAs zeigt jedoch Aminogruppenwerte von  $9,05 \pm 1,02$  ( $n=4$ ) pro nativem HSA-Molekül. Das HSA-Molekül enthält wie in 2.2.1.1.2 beschrieben 60 Aminogruppen. Diese drastisch niedrigere Zahl nachweisbarer Aminogruppen sollte jedoch angesichts der überwiegend  $\alpha$ -helikalen Struktur des Albumins (67 %) nicht verwundern (Carter and Ho 1994). Im Vergleich zu diesen niedrigen Werten liegen die Aminogruppenzahlen pro Molekül an der Partikeloberfläche mit  $14,43 \pm 1,71$  bei den bei 70°C hitzedenaturierten Nanopartikeln unerwartet hoch. Angesichts der Herstellungsmethode scheint jedoch eine teilweise Denaturierung des HSAs durch den Ethanolzusatz und die Einwirkung des Quervernetzers bzw. erhöhter Temperaturen, die zu einer gesteigerten Expression von Aminogruppen an der Partikeloberfläche aufgrund einer Entfaltung der Proteinstruktur führt, wahrscheinlich. Ein Ansteigen der verfügbaren Aminogruppenzahl durch Zusatz steigender Mengen an Ethanol zu einer Ovalbuminlösung wurde bereits von Steven und Tristram (1958) beschrieben.

#### *4.1.2.4.3 Einfluß der Hitzedenaturierung auf die Partikelgröße*

Da die Härtung durch längeres Erhitzen auf andere Mechanismen zurückzuführen ist als bei der Glutaraldehydquervernetzung, wurde auch hier die Abhängigkeit der Partikelgröße von der Temperatur und der Denaturierungszeit untersucht. Die Ergebnisse der PCS-Messung sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß weder die Denaturierungstemperatur noch die Denaturierungszeit einen Einfluß auf die Partikelgröße haben. Auch unterscheiden sich die Partikeldurchmesser der

hitzenedenaturierten Nanopartikel nicht von denen der glutaraldehydstabilisierten Partikel. Die Größe ist demnach allein von der Desolvatation abhängig und nicht von der Art der anschließenden Partikelstabilisierung.

Tabelle 5: Einfluß der Denaturierungszeit und –temperatur auf die Partikelgröße von HSA-Nanopartikeln (n=3)

Denaturierungszeit [ h ]	Partikelgröße [ nm ]					
	50°C		60°C		70°C	
	Mittelwert	S.D.	Mittelwert	S.D.	Mittelwert	S.D.
2	315,67	30,07	279,00	10,58	309,33	10,69
4	328,00	31,32	289,67	15,28	355,67	38,08
6	326,33	30,02	305,33	29,19	330,33	25,50
24	344,33	37,31	327,33	29,02	358,00	43,00
48	333,67	15,01				

#### 4.1.2.5 Evaluierung der Quervernetzung von Gelatine-Nanopartikeln - ein Vergleich

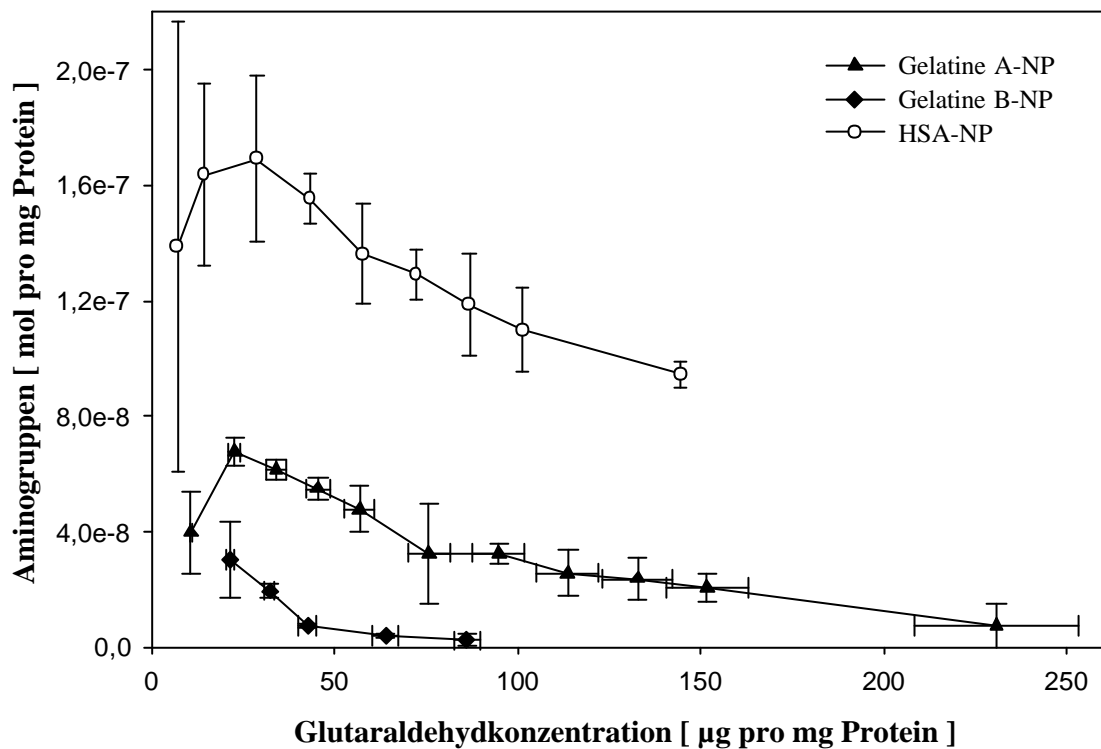
Um zu sehen, ob HSA-Nanopartikel im Vergleich zu anderen Proteinpartikeln eine hohe oder niedrige Anzahl freier Aminogruppen an der Partikeloberfläche aufweisen und damit die Bindungsmöglichkeiten für Arzneistoffe besser oder schlechter sind, wurden Gelatine A- und B-Nanopartikel hergestellt, mit zwei verschiedenen Aldehyden (Glutaraldehyd und Formaldehyd) in unterschiedlichen Konzentrationen quervernetzt und die Anzahl freier Aminogruppen an der Partikeloberfläche bestimmt.

##### 4.1.2.5.1 Quervernetzung mit Glutaraldehyd

Auch für Gelatine ist Glutaraldehyd ein gängiges Quervernetzungsreagenz (Marty et al. 1978, Tabata and Ikada 1989, Coester et al. 2000a), welches unter Ausbildung von Schiff'schen Basen mit den Aminogruppen der Gelatine reagiert. Die Ergebnisse der Aminogruppenbestimmung sind in Abbildung 25 sowohl für Gelatine A- als auch für Gelatine B-Partikel dargestellt. Da Gelatine keine definierte Zusammensetzung hat,

sondern ein Gemisch aus vielen Proteinbruchstücken ist (siehe 2.2.1.2), konnten die Glutaraldehydkonzentrationen nicht wie beim HSA in Prozent angegeben werden und die Aminogruppen nicht in Gruppen pro Molekül. Die Darstellung erfolgte deshalb in Aminogruppen pro mg Gelatine und Glutaraldehydzusatz in  $\mu\text{g}$  pro mg Protein. Um einen Vergleich mit den HSA-Ergebnissen zu bekommen, wurden die Daten der Abbildung 21 in Abbildung 25 mit der neuen Skalierung miteinbezogen.

Abbildung 25: Aminogruppen an der Oberfläche von Gelatine A- bzw. Gelatine B-Partikeln im Vergleich zu HSA-Nanopartikeln in Abhängigkeit von der Glutaraldehydkonzentration im Quervernetzungsschritt (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Mit steigender Glutaraldehydkonzentration nimmt die Anzahl der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche sowohl bei den Gelatine A- als auch bei den Gelatine B-Partikeln signifikant ab. Überraschenderweise ist die absolute Zahl der Aminogruppen an der Oberfläche der Gelatine A-Partikel deutlich höher als an der Oberfläche der Gelatine B-Partikel. Außerdem nimmt die Aminogruppenzahl bei Zusatz von 80  $\mu\text{g}$  Glutaraldehyd pro mg Gelatine B praktisch auf Null ab, so daß auf

höhere Quervernetzerkonzentrationen verzichtet wurde, während bei Gelatine A auch nach dem Zusatz von 230  $\mu\text{g}$  Aldehyd pro mg Protein immer noch Aminogruppen an der Oberfläche nachweisbar waren. Dieser signifikante Unterschied zwischen den beiden Gelatinearten kann nicht auf den unterschiedlichen Herstellungsprozeß der Gelatine zurückgeführt werden, da bei dem alkalischen Aufschluß der Gelatine B lediglich Säureamidgruppen von Asparagin- und Glutaminbausteinen in freie Carboxylgruppen überführt werden (Bauer et al. 1993). Die Anzahl der Aminogruppen in den Gelatineketten wird bei diesem Aufschlußverfahren dagegen nicht verändert. Der Grund für die drastisch niedrigere Aminogruppenzahl an der Oberfläche der Gelatine B-Partikel ist eher in den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen bei der Quervernetzung mit Glutaraldehyd zu suchen. Im allgemeinen werden die Quervernetzungsreaktionen von Aldehyden in neutralen oder schwach alkalischen Medien durchgeführt (Lin et al. 1994), da die Ausbildung von Schiff'schen Basen im alkalischen Milieu wesentlich schneller und in deutlich größerem Umfang abläuft. Deshalb werden für die Stabilisierung der Gelatine A-Partikel, die im sauren pH-Bereich ausgeführt wird, deutlich höhere Glutaraldehydmengen benötigt, um einen den Gelatine B-Partikeln entsprechenden Grad der Quervernetzung zu erlangen. Bei den Gelatine A-Partikeln zeigt sich wie bei den HSA-Partikeln bei der niedrigsten Glutaraldehydkonzentration eine leichte Instabilität der Partikel, die sich durch Beeinträchtigung der TNBS-Reaktion in falsch niedrigeren Aminogruppenzahlen äußert.

Gelatine hat keine definierte Primärstruktur wie HSA. In der Literatur finden sich jedoch Werte von 33  $\epsilon$ -Aminogruppen pro 1000 Aminosäuren eines Gelatinemoleküls (Digenis et al. 1994). Demnach sind etwa 30 % der Gelatine A-Aminogruppen und etwa 13 % der Gelatine B-Aminogruppen an der Oberfläche der Nanopartikel verfügbar. Im Vergleich dazu präsentieren HSA-Partikel maximal 23 % ihrer Aminogruppen an der Partikeloberfläche.

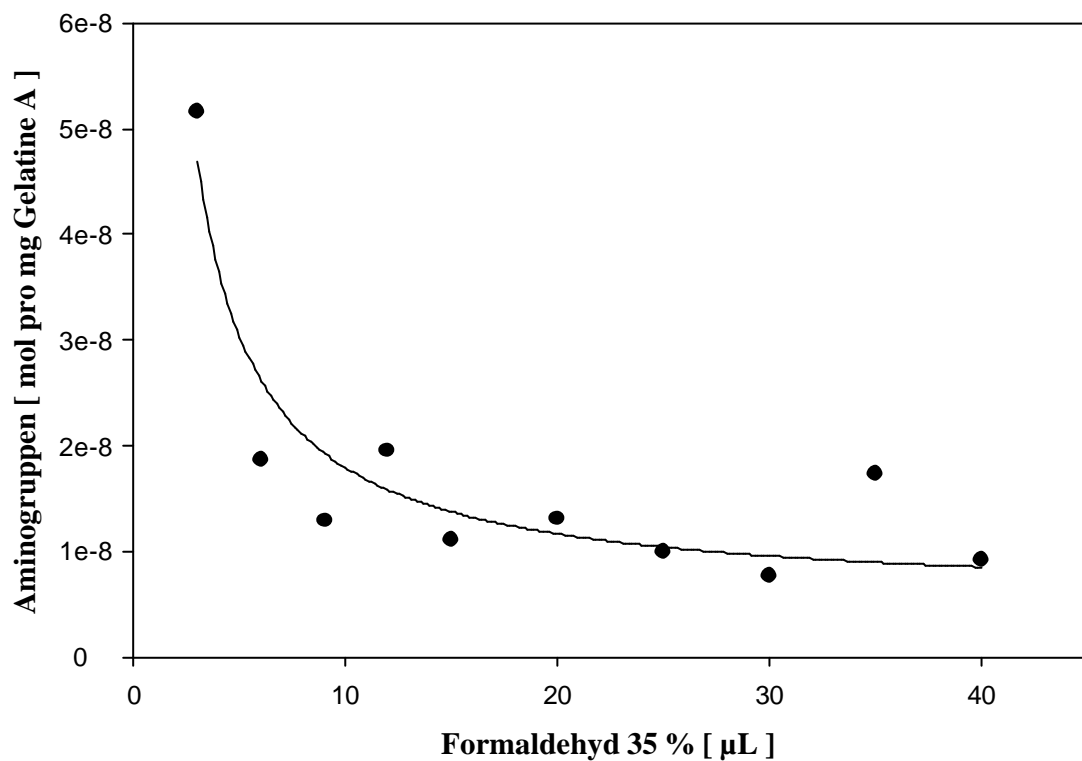
Die Aminogruppenbestimmung der HSA-Partikel in Abbildung 25 zeigt, daß an der Partikeloberfläche der HSA-Partikel signifikant mehr Aminogruppen bei gleichem Glutaraldehydzusatz verfügbar sind, als an den Gelatine-Partikeln. Eine Kopplung von

Arzneistoffen an die HSA-Nanopartikel über die funktionelle Aminogruppe sollte also demnach wesentlich effektiver sein.

#### 4.1.2.5.2 Quervernetzung mit Formaldehyd

Neben Glutaraldehyd wird auch oftmals Formaldehyd als Quervernetzungsreagenz eingesetzt. (Widder et al. 1979, Yoshioka et al. 1981). Der Reaktionsmechanismus der Quervernetzung des monofunktionellen Formaldehyds mit Gelatine wurde von Digenis et al. (1994) ausführlich beschrieben.

Abbildung 26: Aminogruppen an der Oberfläche formaldehydgehärteter Gelatine A-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Formaldehydkonzentration



Demnach können mehrere chemische Reaktionen ablaufen, die unter Beteiligung von zwei  $\epsilon$ -Aminogruppen zur Ausbildung von Pyridinringen, Methylenbrücken oder Iminen führen, die letztendlich in einer Verknüpfung der Proteinketten durch Bildung von Aminen resultieren.

Auch bei der Quervernetzung von Gelatine A-Nanopartikeln mit Formaldehyd zeigt sich eine deutliche Abnahme der Aminogruppen mit steigender Formaldehydzugabe

(siehe Abbildung 26). Die Formaldehydkonzentration ist im Vergleich zu den Glutaraldehydkonzentrationen sehr hoch, niedrigere Aldehydmengen führten aber zu instabilen Partikeln und verhinderten damit die TNBS-Bestimmung der Aminogruppen. Ein Abtrennen möglicher Gelatine-TNP-Konjugate mit Ultrafiltrationseinheiten wie bei den HSA-Proben war nicht möglich, da kleine Bruchstücke der Gelatine auch durch Ultrafiltrationseinheiten mit einer Ausschlußgrenze von 3.000 Da in das Filtrat gelangten und somit die TNBS-Reaktion weiterhin störten. Die an der Partikeloberfläche resultierenden Aminogruppen nach der Formaldehydhärtung liegen unterhalb der Werte der Glutaraldehydquervernetzung. Da höhere Formaldehydmengen benötigt werden, um stabile Partikel zu erhalten und weniger verfügbare Aminogruppen an der Oberfläche resultieren, scheint Glutaraldehyd der geeignetere Stabilisator für Gelatine-Nanopartikel zu sein.

### **4.1.3 Physikalische Parameter der HSA-Nanopartikel**

Der Prozeß der Desolvatation und der Quervernetzung wurde im vorangegangenen Kapitel ausführlich charakterisiert. Physikalische Parameter der Nanopartikel wie beispielsweise die Partikeldichte wurden in diesem Zusammenhang außer acht gelassen. Sie sollen nun für das Partikelsystem, das nach der Standardmethode der HSA-Nanopartikelpräparation hergestellt wurde (siehe 3.1.1.2), untersucht werden.

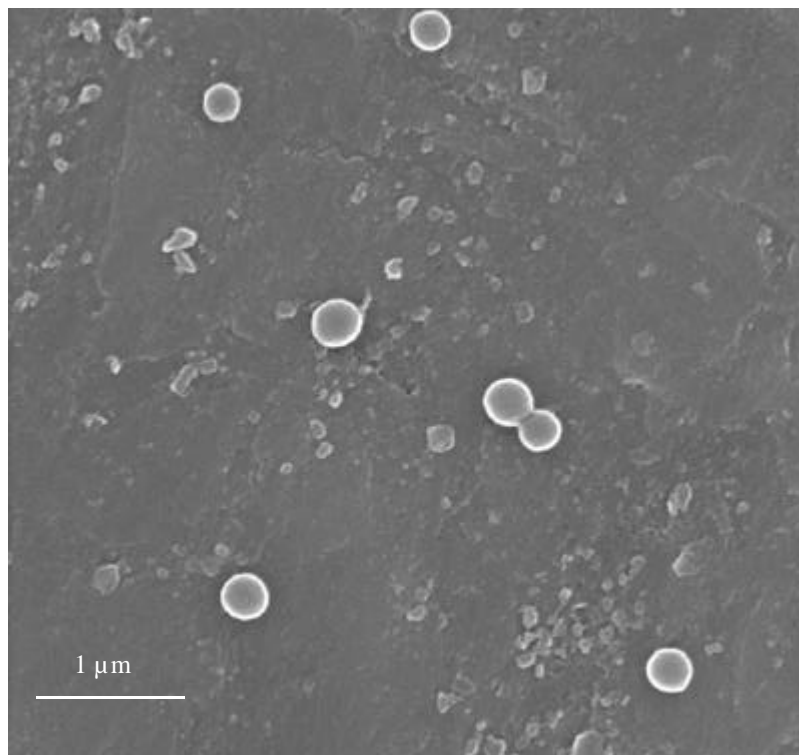
#### **4.1.3.1 Größe und Zetapotential**

Die Abhängigkeit von Partikelgröße und Zetapotential von der Herstellungsmethode wurde bereits in den Abschnitten 4.1.1.3, 4.1.2.3.4, 4.1.2.4.3 und 4.1.2.3.6 aufgezeigt. Die nach der Standardvorschrift hergestellten HSA-Nanopartikel hatten eine mittlere Partikelgröße von 290-400 nm, das Zetapotential lag zwischen -17 und -25 mV gemessen in 0,1 M PBS pH 7,0. Der von Lin et al. (1994) beschriebene Wert von -19 mV für HSA-Nanopartikel bei pH 7,0 kann aufgrund dieser Ergebnisse bestätigt werden.

#### 4.1.3.2 Partikeldichte

Die Partikeldichte der HSA-Nanopartikel wurde für drei Chargen HSA-Nanopartikel mit einem mittleren Partikeldurchmesser von  $341,2 \pm 28,6$  nm bestimmt. Die Auswertung der Messung mit Hilfe der vereinfachten Gleichung (2) (siehe 3.1.2.5) ergab eine mittlere Partikeldichte von  $1,31 \pm 0,025$  g cm<sup>-3</sup>. Die Partikeldichte scheint von der Herstellungsmethode abhängig zu sein, da HSA-Partikel, die per Emulsionsmethode im Zweiphasensystem hergestellt wurden, eine Dichte von  $1,48$  g cm<sup>-3</sup> aufwiesen (MacAdam et al. 1997).

Abbildung 27: SEM-Aufnahme von HSA-Nanopartikeln, die mit der Desolvatationsmethode hergestellt wurden



Die Partikeldichte erlaubt nun eine grobe Abschätzung, aus wievielen HSA-Molekülen ein Nanopartikel besteht, und damit auch, wieviele funktionelle Gruppen ein Nanopartikel trägt bzw. mit wievielen Arzneistoffmolekülen ein Partikel beladen werden kann. SEM-Aufnahmen (Abbildung 27) der HSA-Partikel zeigen runde Partikel mit einer glatten Oberfläche, wie auch schon mehrfach in der Literatur

beschrieben (Chen et al. 1994, Shafi et al. 1995, Esposito et al. 1996, MacAdam et al. 1997). Aus der Kugelgestalt der Partikel, der bestimmten Partikeldichte und einem Molekulargewicht von 65 kDa des HSAs ergibt sich, daß ein durchschnittlicher HSA-Nanopartikel aus rund  $2,5 \cdot 10^5$  HSA-Molekülen besteht. Eine Abschätzung der Anzahl der durchschnittlichen funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche erfolgt in Abschnitt 4.1.4.

### **4.1.4 Bestimmung funktioneller Gruppen an der HSA-Nanopartikeloberfläche**

Wie bereits in 2.2.1.1 dargestellt, enthält das Protein HSA aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung verschiedene freie funktionelle Gruppen. Dazu gehören im wesentlichen die Carboxylgruppen der Asparaginsäure und der Glutaminsäure, die  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins und die Hydroxylgruppen des Serins, des Threonins und des Tyrosins. Da die Hydroxylgruppen aufgrund ihrer im Vergleich zu den Aminogruppen niedrigeren Nukleophilie weniger reaktiv sind, beschränkten sich die quantitativen Bestimmungen auf die Amino- und Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche.

#### **4.1.4.1 Bestimmung der Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche**

Die quantitative Bestimmung der Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche der HSA-Nanopartikel wurde auf verschiedenen Wegen versucht, da in der Literatur mehrere Methoden hierzu beschrieben sind (Hoare and Koshland 1967, Delfino et al. 1983, Uchida et al. 1993, MacAdam et al. 1997).

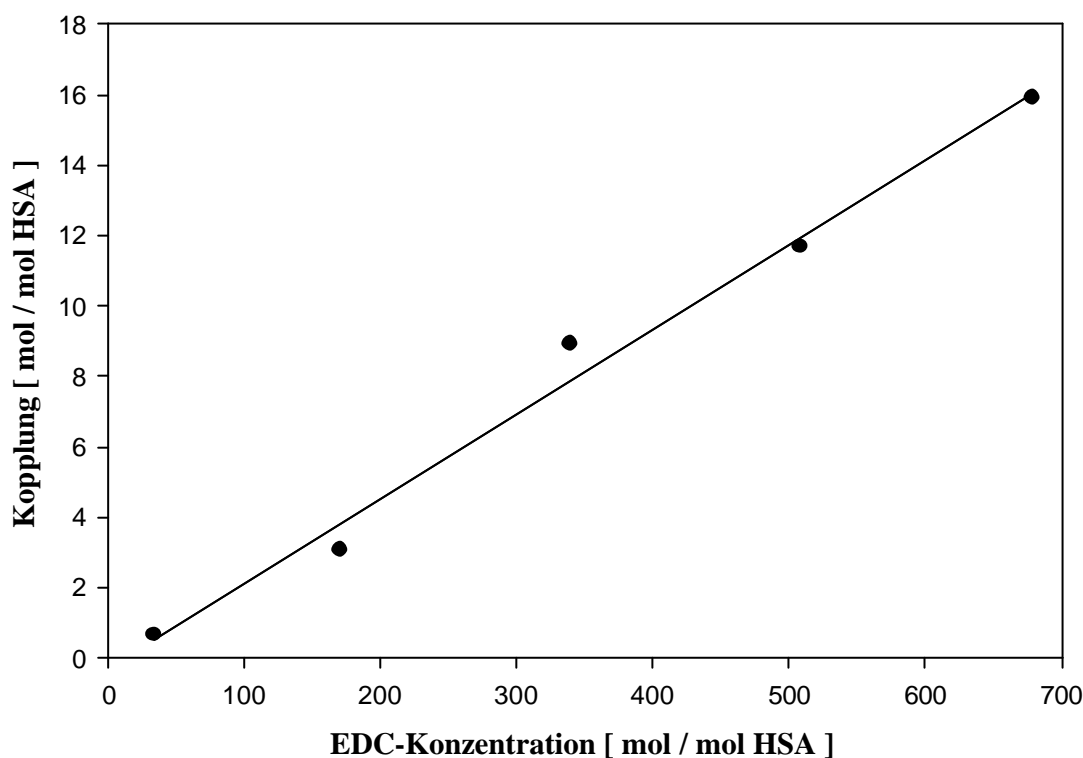
##### *4.1.4.1.1 Bindung von Norephedrin mit EDC*

Norephedrin als primäres Amin wurde mittels EDC und Sulfo-NHS als Kopplungsreagenzien an die Oberfläche von HSA-Nanopartikeln gekoppelt und der Anteil an nicht gebundenem Norephedrin im Überstand mit HPLC bestimmt. Das Ergebnis steigender EDC/Sulfo-NHS-Konzentrationen ist in Abbildung 28 dargestellt.



Die Zunahme der Kopplung war in diesem Konzentrationsbereich bei einer Norephedrinkonzentration von 35 mol pro mol HSA linear. Bei diesen Konzentrationen wurde noch keine maximale Kopplung erreicht, bei höheren Konzentrationen traten jedoch immer wieder Trübungen der Proben aufgrund zu hoher Salzkonzentrationen auf. Eine quantitative Auswertung nach Flockung der Proben durch mit in den Niederschlag eingeschlossenes Norephedrin war nicht möglich, so daß diese Methode nicht zur quantitativen Carboxylgruppenbestimmung genutzt werden konnte.

Abbildung 28: Bindung von Norephedrin x HCl mit EDC/Sulfo-NHS



#### 4.1.4.1.2 Bindung von Glycinmethylester

Mit EDC gekoppelter, radioaktiv markierter Glycinmethylester wurde bereits mehrfach in der Literatur (Delfino et al. 1983) als sehr kleines Molekül zur quantitativen Bestimmung von Carboxylgruppen genutzt. Auf die Radiomarkierung konnte durch die Entwicklung einer HPLC-Methode verzichtet werden.

Als Ergebnis mehrfacher Kopplungsexperimente ergab sich eine mittlere Bindung von  $24,34 \pm 5,92$  ( $n = 4$ ) Glycinmethylestermolekülen pro HSA-Molekül. Die Ergebnisse schwankten stark, weswegen diese Methode nicht weiter verfolgt wurde. Auf was diese Schwankungen zurückzuführen waren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

### *4.1.4.1.3 Bildung von Sulfo-NHS-Estern*

Eine weitere Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung von Carboxylgruppen wurde von Tyllianakis et al. (1994) beschrieben. Dazu wurden die Carboxylgruppen mit EDC und Sulfo-N-hydroxysuccinimid (= Sulfo-NHS) umgesetzt, die Nanopartikel anschließend gewaschen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen, um im Anschluß daran die Sulfo-NHS-Ester an der Partikeloberfläche quantitativ zu bestimmen. Die quantitative Bestimmung der Sulfo-NHS-Ester erfolgte zum einen nach Hydrolyse mit 0,1 N Ammoniumhydroxidlösung und der photometrischen Bestimmung des Überstandes bei 260 nm, zum anderen durch Bestimmung der Sulfo-NHS-Ester an der Partikeloberfläche mit dem BCA-Protein-Assay. Bei beiden Methoden wurden zur Berechnung Sulfo-NHS-Standards mitgeführt, die entsprechend den Proben behandelt wurden.

Die Bestimmungen mit der Ammoniumhydroxidmethode ergaben einen mittleren Carboxylgruppengehalt von  $6,79 \pm 2,35$  pro HSA-Molekül, einen im Vergleich zu den Ergebnissen der übrigen Methoden sehr gering erscheinenden Wert. Die Auswertung über das BCA-Protein-Assay-Reagenz wie von Tyllianakis et al. (1994) beschrieben, war nicht möglich, da BCA, wie bereits in 4.1.1.1 erläutert, mit den verschiedenen funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche diverse Wechselwirkungen eingeht, deren Vielzahl nicht durch entsprechende Vergleiche korrigiert werden konnte. Auch diese Methode konnte also nicht zur Quantifizierung der Carboxylgruppen genutzt werden.

#### 4.1.4.1.4 Bindung von Cystamin mit EDC

Die Quantifizierung der Carboxylgruppen erfolgte durch Bindung des Diamins Cystamin mit EDC an die Carboxylgruppen der Partikeloberfläche, der anschließenden Spaltung der Cystamindisulfidbrücke und der quantitativen Bestimmung der daraufhin an der Partikeloberfläche resultierenden SH-Gruppen mit Ellmans Reagenz. Diese Methode wird in Abschnitt 4.2.4.1 zur Einführung von Sulfhydrylgruppen an die Partikeloberfläche ausführlich beschrieben und diskutiert.

Unter optimalen Reaktionsbedingungen konnte ein Maximalwert von  $20,9 \pm 0,4$  2-Aminoethanthiolgruppen und damit Carboxylgruppen pro HSA-Molekül an der Partikeloberfläche nachgewiesen werden. Dieser Wert von etwa 21 freien Carboxylgruppen pro HSA-Molekül steht in guter Relation zu den Werten der Glycinmethylestermethode mit etwa 24 freien Carboxylgruppen pro HSA-Molekül. Da die Werte der Cystaminbestimmung jedoch weniger starken Schwankungen unterlagen, wurde diese Methode als Methode der Wahl zur Quantifizierung der Carboxylgruppen angewendet. Daraus ergibt sich für einen durchschnittlichen HSA-Nanopartikel, der aus  $2,5 \cdot 10^5$  HSA-Molekülen besteht (siehe 4.1.3.2), eine Anzahl von  $5,0 \cdot 10^6$  Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche.

#### 4.1.4.2 Bestimmung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche

Die quantitative Bestimmung der Aminogruppen mit TNBS wurde bereits ausführlich in den Abschnitten 4.1.2.1, 4.1.2.3.1 bis 4.1.2.3.3 und 4.1.2.4.1 diskutiert. Eine mittlere Aminogruppenzahl von  $\sim 7$  Aminogruppen pro HSA-Molekül für die Partikel, die nach der Standardmethode hergestellt und mit 200 % Glutaraldehyd quervernetzt wurden, ergibt eine Anzahl von etwa  $1,8 \cdot 10^6$  Aminogruppen an der Oberfläche eines HSA-Nanopartikels und damit  $1,8 \cdot 10^6$  mögliche Angriffspunkte zur Kopplung von aminoreaktiven Spacern oder Arzneistoffen über aminoreaktive Spacer.

## **4.2 Einführung von Sulfhydrylgruppen an die Oberfläche von HSA-Nanopartikeln**

Die Bindung von Proteinen mit Arzneistoffen oder Trägersystemen wird meist durch den Einsatz von etablierten, bifunktionalen Crosslinkern erreicht, wobei eine der Bindungsstellen spezifisch mit primären Aminogruppen reagiert, während die andere eine Spezifität für Sulfhydrylgruppen aufweist (siehe auch 2.3.4). Um nun mit solch einem Spacer einen aminogruppenhaltigen Stoff wie z.B. ein Protein an das proteinbasierte, nanopartikuläre Trägersystem zu binden, muß das Trägersystem reaktive Sulfhydrylgruppen an seiner Partikeloberfläche aufweisen (Langer et al. 2000). Die Primärstruktur (siehe 2.2.1.1.2) zeigt jedoch, daß HSA zwar 35 Cystein-Gruppen enthält, davon aber 17 in Disulfidbrücken fixiert sind und deswegen für solche Bindungen nicht zur Verfügung stehen. Die freie 35. SH-Gruppe ist zu 30 % mit Cystein oder Glutathion gekoppelt (Carter and Ho 1994) und scheidet damit auch als Angriffspunkt aus. Die Einführung reaktiver SH-Gruppen an der Partikeloberfläche ist deswegen für den Einsatz der bifunktionalen Crosslinker unerlässlich. Außerdem könnte die Einführung der SH-Gruppen auch die mukoadhäsiven Eigenschaften des Trägersystems verbessern, wie kürzlich von Bernkop-Schnürch et al. (1999) für lösliche Polymere gezeigt wurde.

Im folgenden Kapitel werden 6 Methoden zur Einführung von SH-Gruppen an die Oberfläche von HSA-Nanopartikeln vorgestellt.

### **4.2.1 Bestimmung der reaktiven Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche**

Die reaktiven Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche wurden mit Ellmans Reagenz bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine etablierte und sensitive Methode zur SH-Gruppenbestimmung, die bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wurde (Ellman 1953, 1959, Anderson and Wetlaufer 1975, Riddles et al. 1979).

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) = DTNB = Ellmans Reagenz reagiert mit SH-Gruppen-haltigen Substanzen unter Ausbildung eines gemischten Disulfides (siehe Abbildung 29).

Abbildung 29: Schematische Darstellung der Reaktion von Ellmans Reagenz mit SH-Gruppen

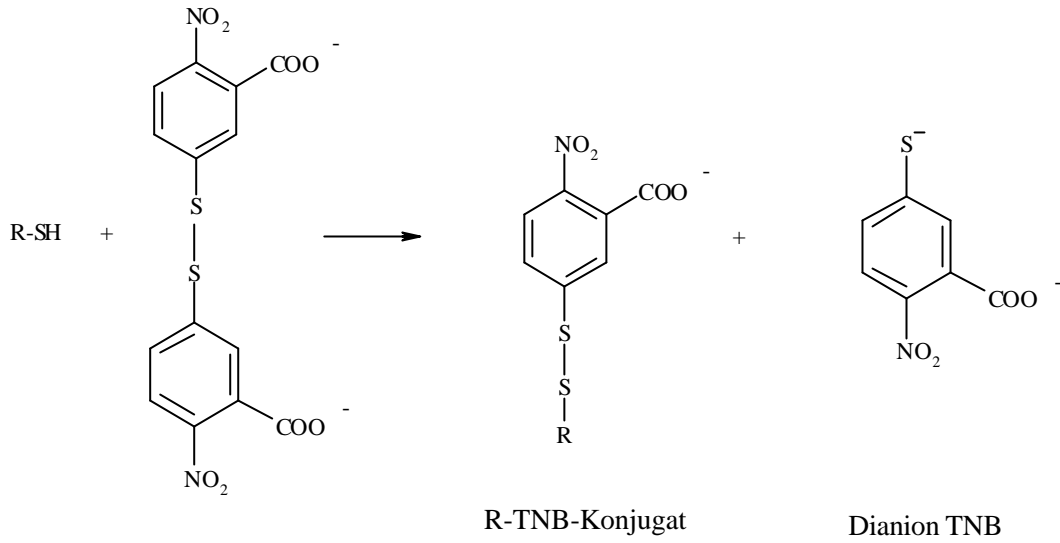
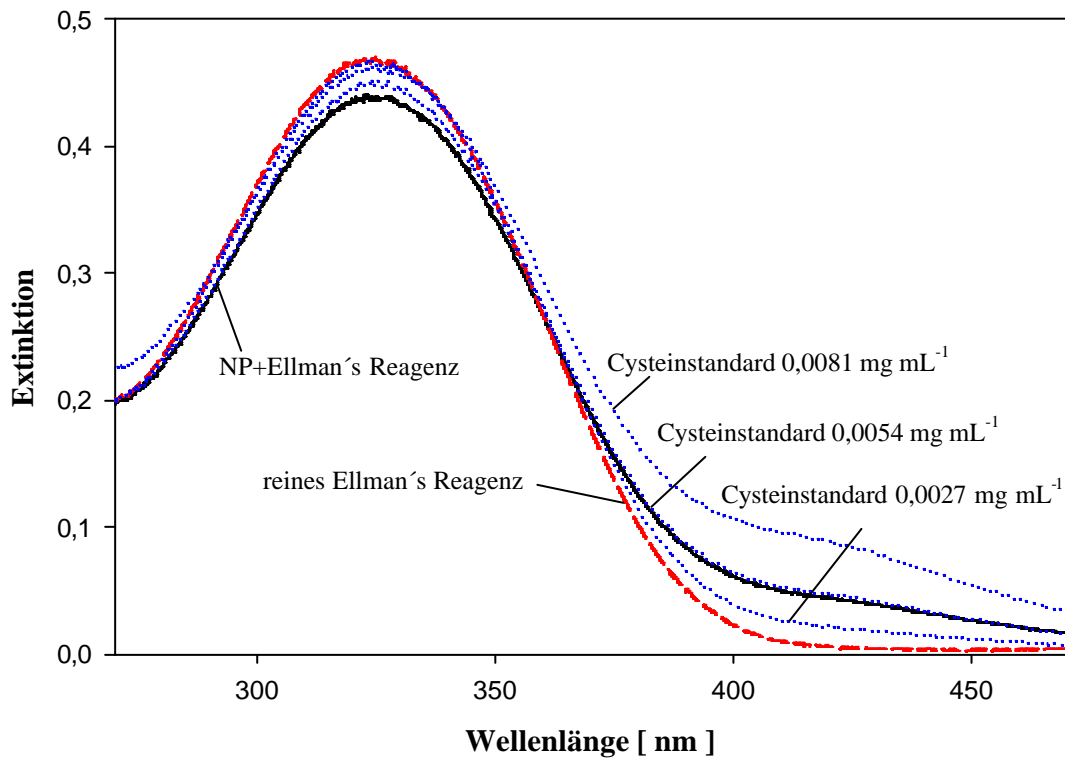


Abbildung 30: Spektrum von Ellmans Reagenz vor und nach der Reaktion mit SH-Gruppenhaltigen Substraten



Das dabei entstehende Dianion  $\text{TNB}^{2-}$  hat ein Absorptionsmaximum mit  $\epsilon \sim 14.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Riddles et al. 1979) bei 412 nm (Spektrum siehe Abbildung 30) und wird nach Abzentrifugieren der TNB-Nanopartikel im Überstand vermessen. Als Standards zur quantitativen Auswertung dienten frisch bereitete L-Cystein-Standards, da das vermessene TNB-Dianion unabhängig von der Art der verwendeten SH-Komponente gebildet wird.

#### 4.2.2 Einführung von Thiolgruppen durch Reduktion von Disulfidbrücken

HSA enthält, wie bereits beschrieben, 17 Disulfidbrücken pro Molekül. Deswegen erscheint es wahrscheinlich, daß nach der Desolvatation und der Quervernetzung auch an der Oberfläche der Partikel Disulfidbrücken lokalisiert sind, die durch Reduktion und Aufspaltung in SH-Gruppen überführt werden können. Zur Reduktion dieser Disulfidbrücken wurde das starke Reduktionsmittel Dithiotreitol (= DTT) eingesetzt (Cleland 1964, Zahler und Cleland 1967). DTT oxidiert hierbei unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke und reduziert das Disulfid zu zwei Thiolgruppen (siehe Abbildung 31). Die schematische Einführung von SH-Gruppen an die Partikeloberfläche mit DTT ist in Abbildung 32 dargestellt.

Abbildung 31: Reaktionsschema der Reaktion von DTT mit Disulfiden

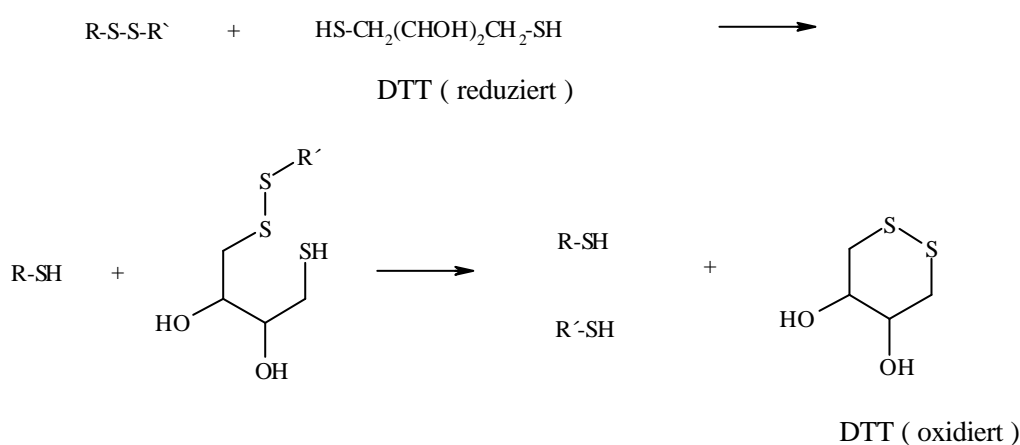
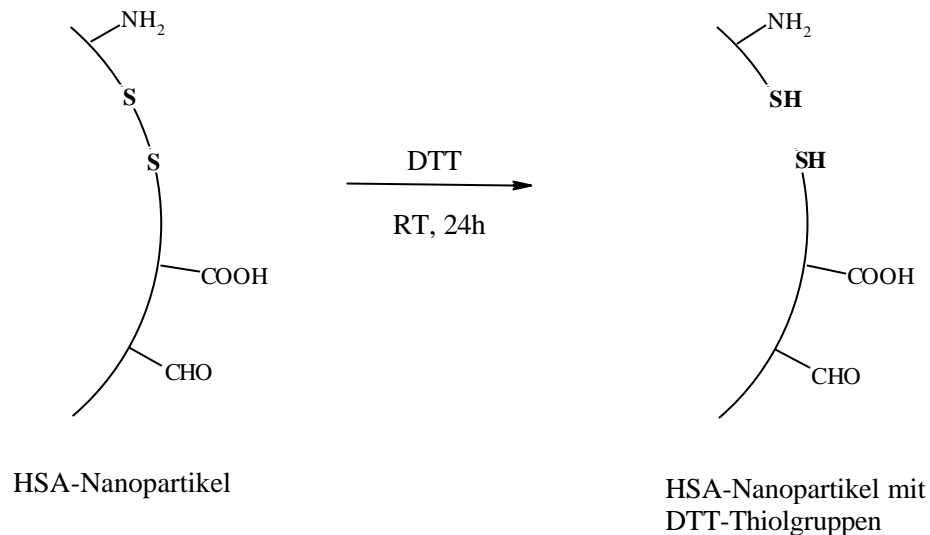


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Einführung von SH-Gruppen mit DTT an der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln

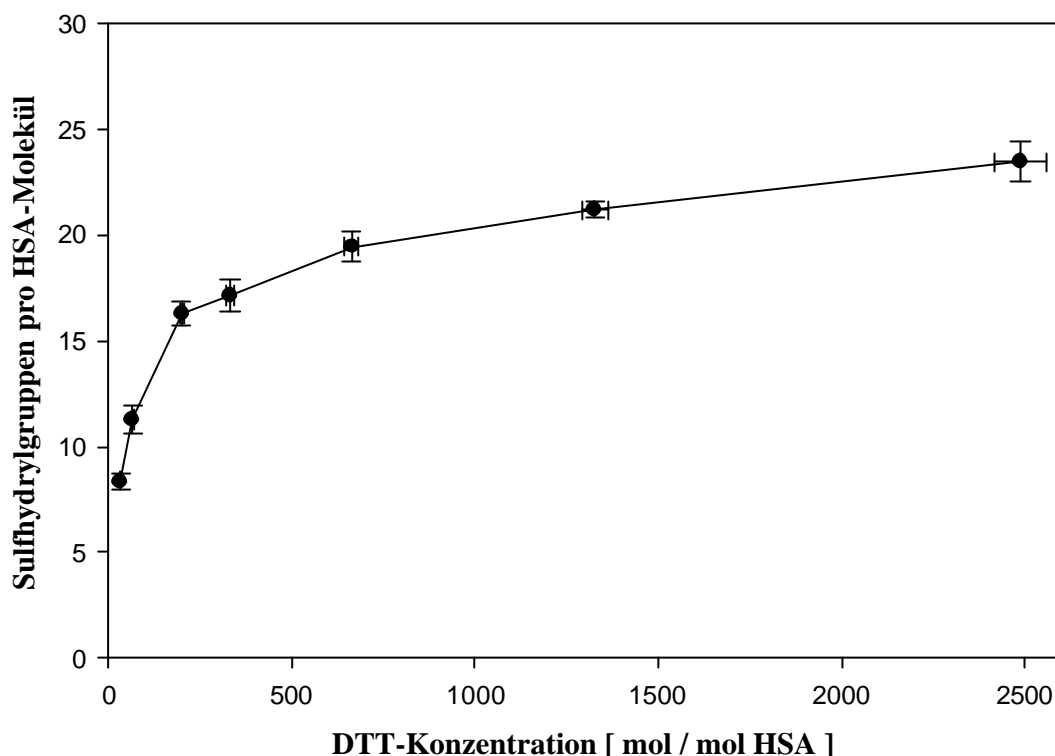


#### 4.2.2.1 Evaluierung der DTT-Konzentration

Zur Evaluierung der SH-Gruppenzahl an der Partikeloberfläche in Abhängigkeit von der zugesetzten DTT-Konzentration wurden steigende DTT-Mengen zur Partikelpräparation zugesetzt und die SH-Gruppen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 graphisch dargestellt.

Die Behandlung der HSA-Partikel mit DTT-Konzentrationen von 34,2 bis 2564,1 mol DTT pro mol HSA führte zu einem signifikanten Anstieg des Sulfhydrylgruppengehaltes an der Partikeloberfläche. Ein maximaler SH-Gruppengehalt von  $23,5 \pm 0,9$  SH-Gruppen pro HSA-Molekül ( $n=3$ ) wurde mit dieser Methode erzielt. Eine weitere Steigerung der DTT-Konzentration resultierte in keiner weiteren signifikanten Steigerung des SH-Gruppengehaltes an der Partikeloberfläche.

Abbildung 33: Reduktive Einführung von SH-Gruppen mit DTT auf der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



### 4.2.2.2 Beendigung der Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten

Um die Reaktionszeit des DTTs zur Spaltung der intramolekularen Disulfidbrücken zu evaluieren, wurde versucht, die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch den Zusatz eines Überschusses an Cystamin zu stoppen. Das Cystamin sollte als Substrat für DTT im Überschuß zur Verfügung stehen und damit eine weitere Reaktion mit den Disulfidbrücken der Partikelmatrix unterbinden. Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Die Werte der Tabelle zeigen, daß durch den Zusatz des Cystamins ein bei allen Proben gleicher Effekt auftrat: es wurden bei allen Proben  $\sim 2$  Sulphydrylgruppen pro HSA-Molekül detektiert, unabhängig von der Reaktionszeit. Der nach 4.2.2.1 ermittelte Wert von  $\sim 22$  SH-Gruppen pro HSA-Molekül wurde jedoch nicht annähernd erzielt. Dies legt die Vermutung nahe, daß durch den Zusatz des Cystamins die eingeführten SH-Gruppen mit den Disulfidbindungen des Cystamins interagieren und es im Sinne einer Redoxreaktion möglicherweise zur Bildung von Disulfiden an der



Partikeloberfläche kommt. Damit wären die ursprünglich eingeführten SH-Gruppen nicht mehr nachweisbar. Eine Evaluierung der DTT-Reaktionszeit konnte deswegen nicht durchgeführt werden.

Tabelle 6: Beendigung der DTT-Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten (n=3)

Zusatz des Cystamins nach [ h ]	Sulphydrylgruppen pro HSA-Molekül	
	Mittelwert	Standardabweichung
0,25	2,08	0,36
0,5	2,21	0,33
1	2,27	0,34
2	2,25	0,25
6	2,42	0,42
kein Zusatz	21,64	2,82

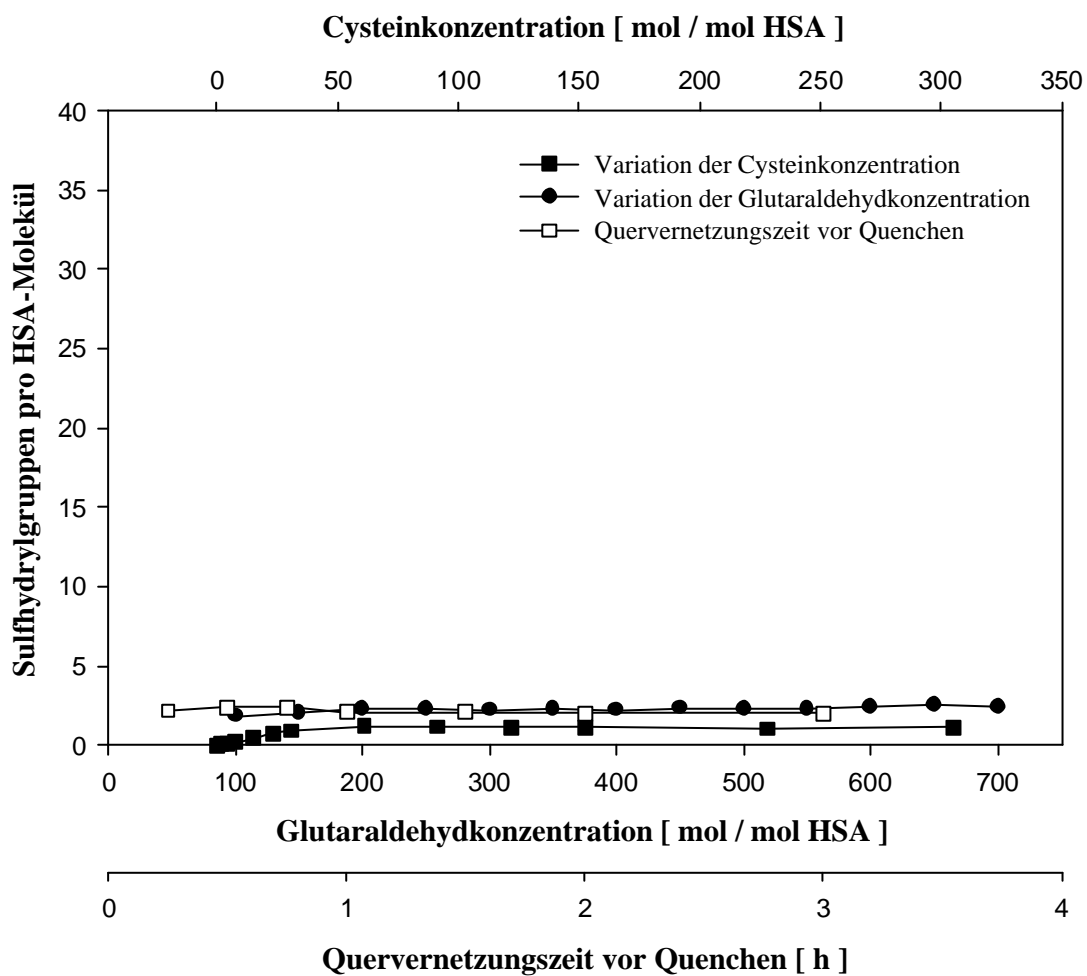
#### 4.2.3 Quenching freier Glutaraldehydgruppen

Das Quenchen reaktiver Aminogruppen mit primären Aminen ist eine weitverbreitete Methode zur Inaktivierung von Aldehydresten oder zur kovalenten Kopplung von primären Aminen an die Oberfläche von Partikeln (siehe auch 2.3.3.3). Je nach gewünschter Oberflächenveränderung wurden Ethanolamin oder Glycin zur Einführung von Hydroxyl- bzw. Carboxylgruppen verwendet (Longo et al. 1982, Roser and Kissel 1993, Irache et al. 1994, Latha and Jayakrishnan 1995, MacAdam et al. 1997). Auch Antikörper und Arzneistoffe wie Doxorubicin und Daunorubicin wurden mit Hilfe dieser Methode an proteinbasierte, partikuläre Trägersysteme gebunden (Akasaka et al. 1988, Golightly et al. 1988, Cummings et al. 1991). Um Sulphydrylgruppen an die Partikeloberfläche einzuführen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Aminosäure L-Cystein und das Diamin Cystamin verwendet.

### 4.2.3.1 Quenching mit L-Cystein

Das Quenchen freier Aldehydgruppen mit L-Cystein wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Coester et al. (2000b) durchgeführt, in der freie Aldehydgruppen an der Oberfläche von Gelatine A-Nanopartikeln mit L-Cystein gequench wurden.

Abbildung 34: Einfluß der Reaktionsbedingungen auf den Gehalt eingeführter Sulfhydrylgruppen beim Quenchen von HSA-Nanopartikeln mit L-Cystein (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Um die Reaktionsbedingungen des Quenchens zu evaluieren, wurden bei einer konstanten Glutaraldehydkonzentration von 200 % (der 100 %-Wert entspricht derjenigen Menge Glutaraldehyd, die zur bivalenten Bindung des Glutaraldehyds an alle 60 Aminogruppen des HSAs notwendig sind) L-Cysteinkonzentrationen bis zu 300 mol pro mol HSA hinzugefügt. Zusätzlich wurde bei einer konstanten

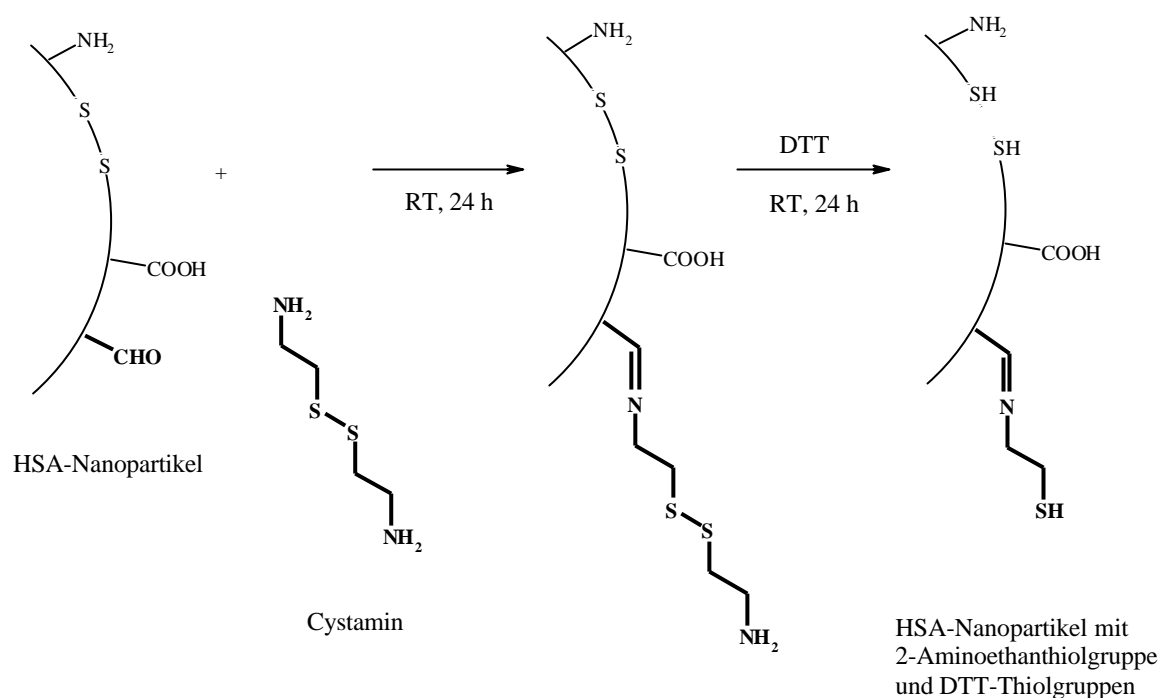
L-Cysteinkonzentration von ~300 mol pro mol HSA die Glutaraldehydkonzentration bis auf 700 % gesteigert sowie die Abhängigkeit der SH-Gruppeneinführung von der vorangegangenen Quervernetzungszeit untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 34 zeigen jedoch, daß mit dieser Methode maximal ~2 SH-Gruppen pro HSA-Molekül eingeführt werden konnten. Eine Steigerung durch Variation der Konzentration war nicht möglich. Auch der Versuch, mögliche Oxidationsprodukte des L-Cysteins mit DTT zu spalten, die bei der Umsetzung gebildet worden sein könnten, verlief erfolglos.

#### **4.2.3.2 Quenching mit Cystamin**

Um zu untersuchen, ob die niedrigen SH-Gruppenzahlen beim Quenchen mit L-Cystein auf eine Kopplung der nukleophilen SH-Gruppe anstelle der Aminogruppe mit der Glutaraldehyd-Carbonylgruppe zurückzuführen ist, wurde das Experiment mit dem Diamin Cystamin vergleichend durchgeführt. Cystamin enthält im Gegensatz zu L-Cystein eine als Disulfid geschützte SH-Gruppe und kann deshalb lediglich mit der Aminogruppe an der Carbonylfunktion angreifen. Da die SH-Gruppen nach der Kopplung des Cystamins an die Partikeloberfläche nicht direkt verfügbar waren, wurden die modifizierten Partikel vor der SH-Gruppenbestimmung mit DTT umgesetzt und erneut aufgereinigt. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 35 aufgezeigt.

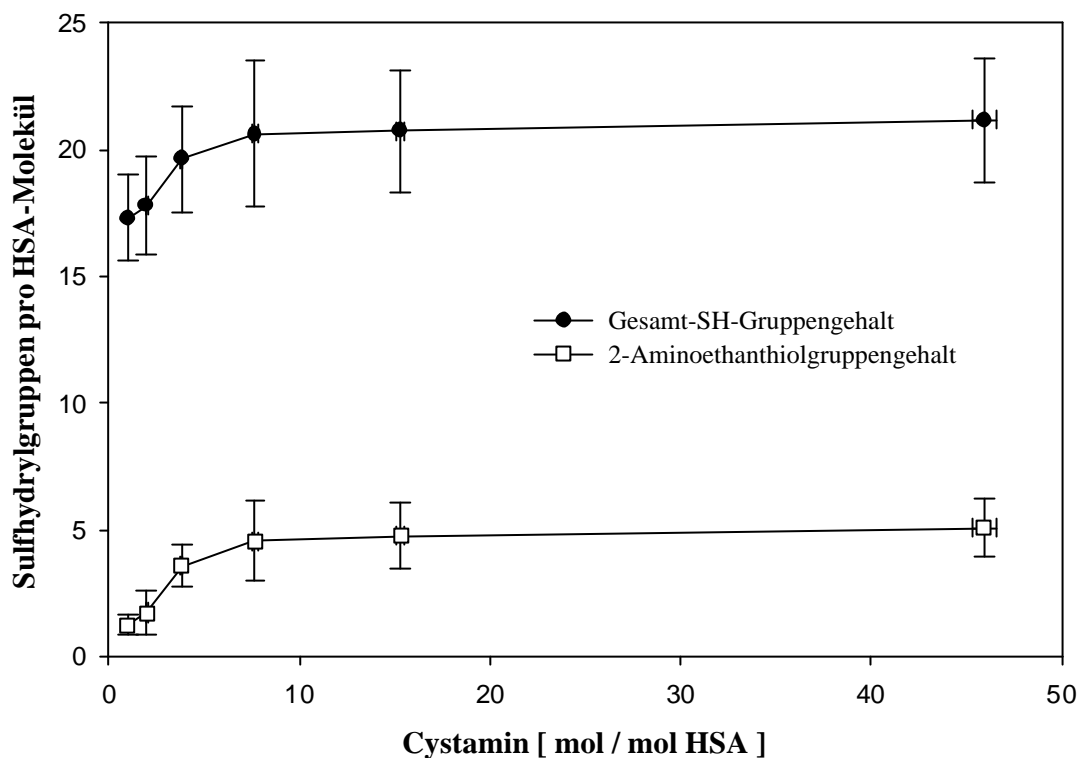
Bei einer konstanten Glutaraldehydkonzentration von 200 % (bezogen auf eine bivalente Bindung des Glutaraldehyds an 60 Aminogruppen des HSAs) wurden steigende Cystaminmengen nach zweistündiger Quervernetzung zu den Präparationen zugesetzt und anschließend mit DTT gespalten. Neben den 2-Aminoethanthiolgruppen, die durch die reduktive Spaltung des Cystamins an der Partikeloberfläche gebildet wurden, wurden auch weitere SH-Gruppen durch die Reduktion der intramolekularen Disulfidbindungen der HSA-Partikelmatrix mit DTT an der Partikeloberfläche eingeführt (siehe 4.2.2).

Abbildung 35: Reaktionsschema der Quenching-Reaktion mit Cystamin an der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln



Der Gehalt an 2-Aminoethanthiolgruppen, die durch die Kopplung von Cystamin eingeführt wurden, berechnete sich aus der Differenz der SH-Gruppen der Cystamin-modifizierten und DTT-behandelten Partikel und den SH-Gruppen reiner, unmodifizierter, DTT-behandelter HSA-Nanopartikel. Die Ergebnisse sowohl der Gesamt-SH-Gruppenzahl an der Partikeloberfläche als auch die 2-Aminoethanthiolgruppenzahlen sind in Abbildung 36 dargestellt. Die Graphik zeigt einen signifikanten Anstieg des SH-Gruppengehaltes mit zunehmender Cystaminkonzentration (1 bis 7,5 mol/mol HSA) von  $1,2 \pm 0,4$  auf  $4,8 \pm 1,3$  SH-Gruppen pro HSA-Molekül und bei weiterer Cystaminzugabe (auf 46 mol/mol HSA) einen leichten Anstieg der 2-Aminoethanthiolgruppen auf  $5,1 \pm 1,1$  SH-Gruppen pro HSA-Molekül. Höhere Cystaminkonzentrationen und höhere Glutaraldehydkonzentrationen führten zu keiner weiteren Verbesserung der Ergebnisse.

Abbildung 36: Sulphydrylgruppen-Einführung durch Quenchen reaktiver Glutaraldehydgruppen mit Cystamin auf der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Die Ergebnisse der Cystaminexperimente zeigen, daß die niedrigen SH-Gruppenzahlen nach L-Cystein-Quenchen nicht auf einen Mangel an reaktiven Carbonylgruppen zurückzuführen sein können, sondern eher das Ergebnis einer Nebenreaktion der nukleophilen SH-Gruppen des Cysteins mit den Aldehydgruppen sind.

#### 4.2.4 Modifikation der Carboxylgruppen

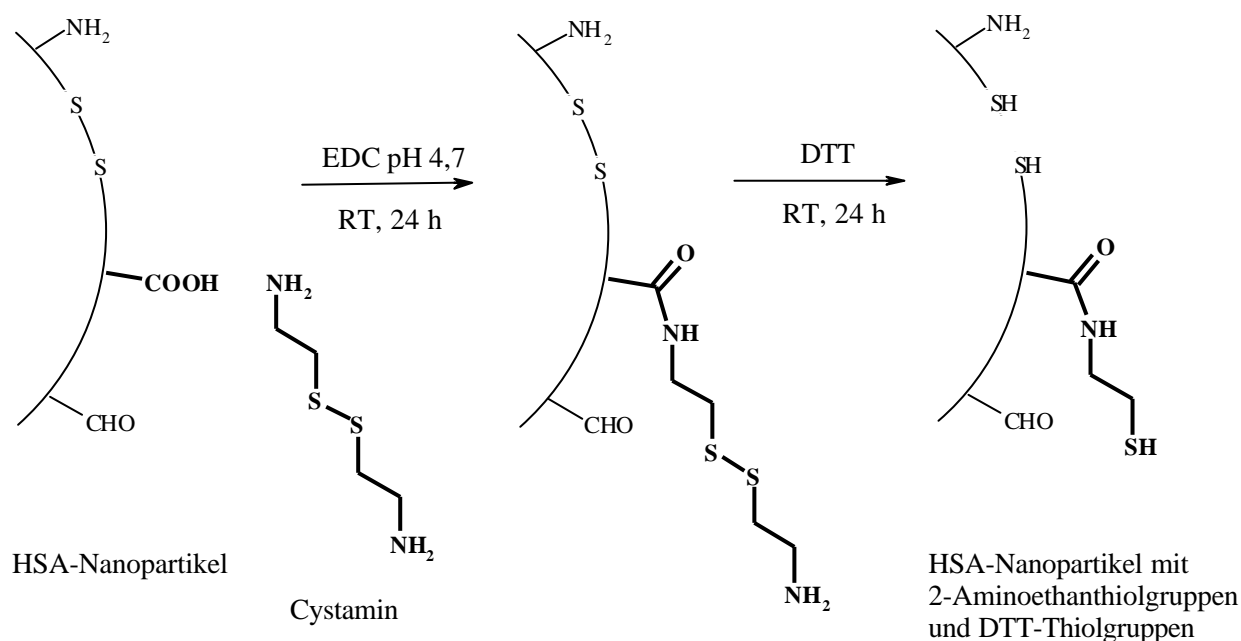
Neben der Umsetzung der verbleibenden Aldehydgruppen und der Spaltung der intramolekularen Disulfidbrücken stellen auch die Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche einen möglichen Angriffspunkt zur Einführung von SH-Gruppen dar. SH-Gruppenhaltige Substrate, die gleichzeitig eine primäre Aminofunktion aufweisen, wurden mit Hilfe eines wasserlöslichen Carbodiimids über eine

Amidbindung an die Carboxylgruppen der HSA-Nanopartikel gekoppelt. Der Reaktionsmechanismus der Carbodiimidreaktion wurde bereits in 2.3.3.1.1 erläutert.

#### 4.2.4.1 Kopplung von Cystamin mit EDC

Für die Kopplung von SH-gruppenhaltigen Substanzen an die Carboxylgruppen mittels EDC-Reaktion wurde erneut Cystamin gewählt, da es neben den Aminogruppen keine weiteren nukleophilen Gruppen enthält und seine Sulfhydrylgruppe in der Disulfidbindung geschützt vorliegt. Wie bereits bei der Kopplung von Cystamin über freie Aldehydgruppen beschrieben, wurde die Disulfidbrücke zur Erzeugung freier SH-Gruppen durch den Zusatz von DTT gespalten (siehe 4.2.3.2).

Abbildung 37: Reaktionsschema der Einführung von SH-Gruppen mit EDC und Cystamin auf der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln



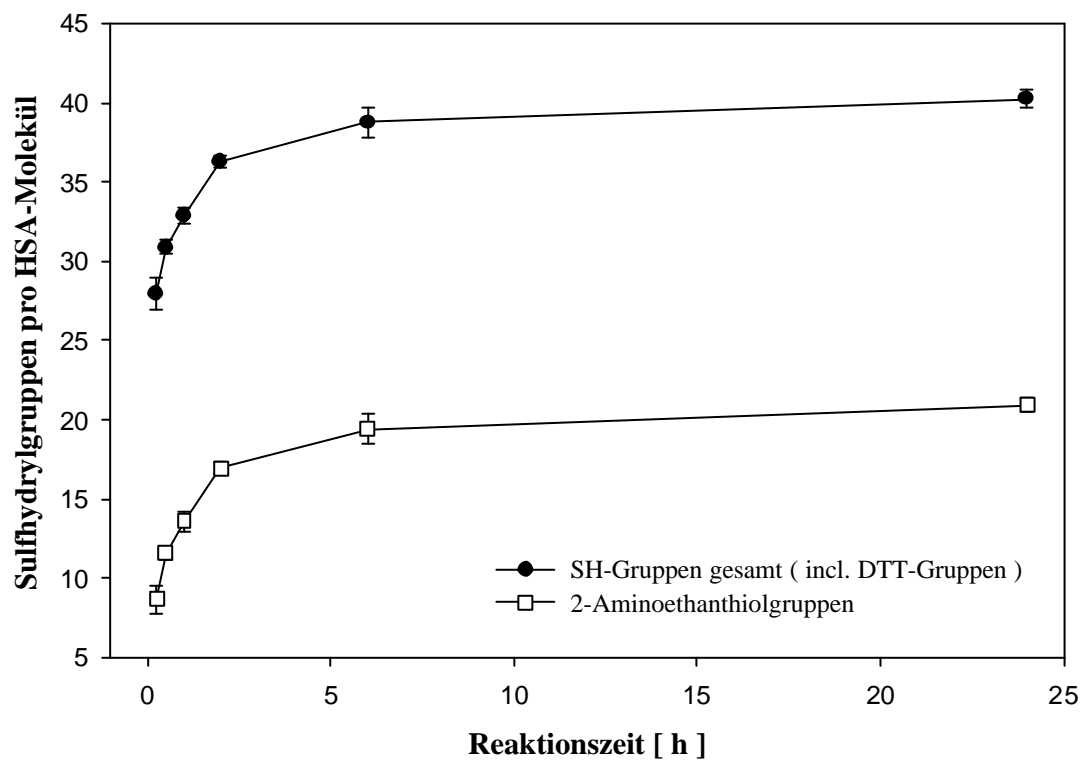
Die Idee der Kopplung von Cystamin und der anschließenden Spaltung mit DTT wurde bereits von Lin et al. (1990) zur Einführung von SH-Gruppen in lösliche

Proteine wie der Carboanhydrase und des adrenocortikoiden Hormones vorgestellt. Zur Anwendung auf partikuläre Systeme mußten Veränderungen hinsichtlich pH-Wert, Reaktionszeit und Substratkonzentrationen vorgenommen werden. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 37 dargestellt.

#### 4.2.4.1.1 Evaluierung der Reaktionszeit

Die Kopplungsreaktion des EDCs wurde durch den Zusatz des starken Nukleophils Hydroxylaminhydrochlorid zu verschiedenen Zeitpunkten beendet.

Abbildung 38: Einfluß der Reaktionszeit der EDC-Kopplungsreaktion von Cystamin an HSA-Nanopartikel auf den Gehalt der eingeführten SH-Gruppen (n=3, Mittelwert  $\pm$  S.D.)



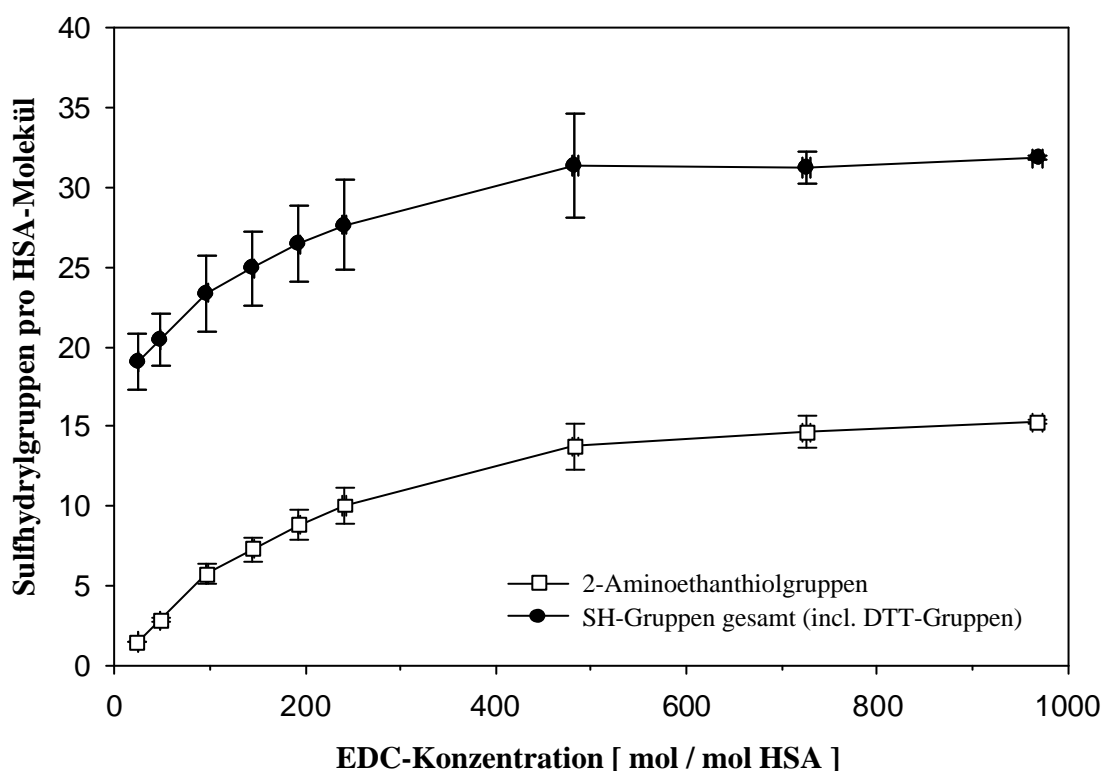
Die Anzahl eingeführter SH-Gruppen stieg mit zunehmender Reaktionszeit deutlich über einen Zeitraum von 24 h an, wie in Abbildung 38 gezeigt. Auch wenn der Hauptteil der Reaktion bereits während der ersten 6 h abläuft, ist während der weiteren 18 h noch ein Anstieg der Sulphydrylgruppenzahl an der Partikeloberfläche zu

verzeichnen, so daß für alle weiteren Experimente, an denen EDC als Kopplungsreagenz verwendet wurde, die Reaktionszeit auf 24 h festgelegt wurde.

### 4.2.4.1.2 Evaluierung der EDC-Konzentration

Bei konstantem Cystamineinsatz von 340 mol pro mol HSA ergab sich bei einem EDC-Zusatz von 25 bis 970 mol EDC pro mol HSA eine signifikante Steigerung der SH-Gruppenzahlen an der Partikeloberfläche wie in Abbildung 39 graphisch dargestellt.

Abbildung 39: Einfluß der EDC-Konzentration bei konstantem Cystaminzusatz auf die Einführung von SH-Gruppen auf die Oberfläche von HSA-Nanopartikeln (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Unter den oben angegebenen Bedingungen ließen sich maximal  $15,2 \pm 0,1$  mol 2-Aminoethanthiolgruppen pro mol HSA nach der Umsetzung mit Cystamin an der Partikeloberfläche nachweisen. Berücksichtigt man die aufgrund der DTT-Reduktion der Disulfidbrücken des Cystamins und des Proteins eingeführten SH-Gruppen

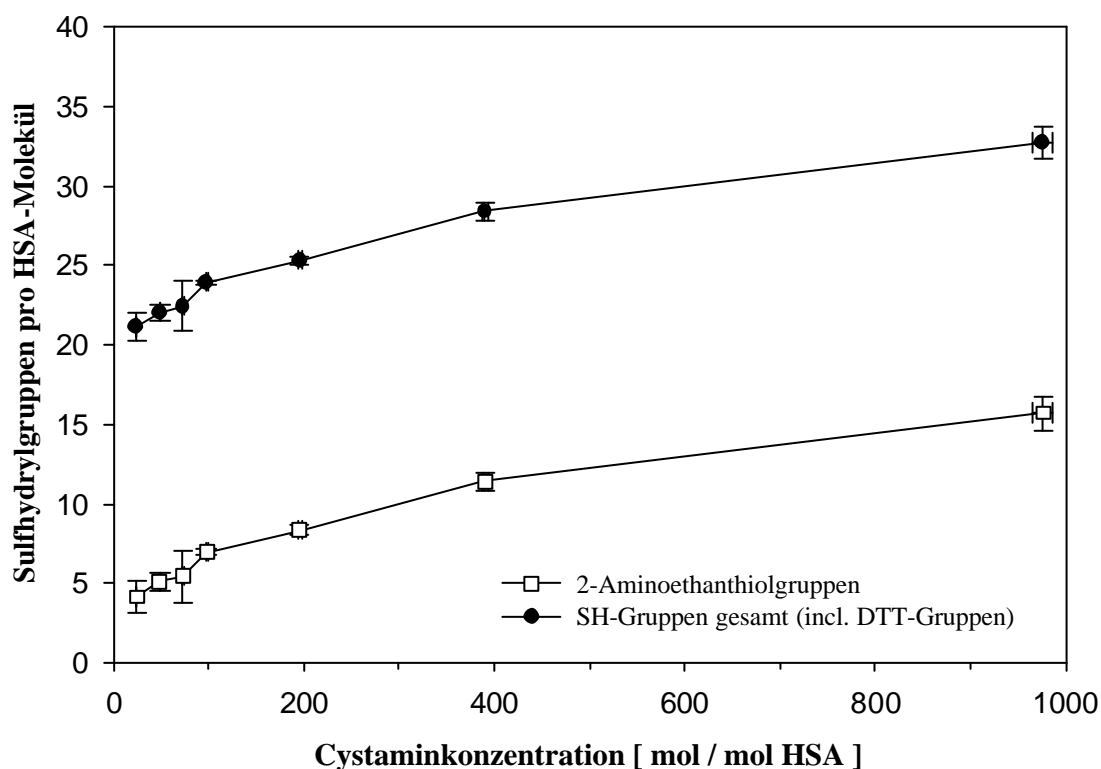


insgesamt, so ergaben sich Gesamt-Sulphydrylgruppennzahlen (2-Aminoethanthiolgruppen und DTT-SH-Gruppen) von bis zu  $31,8 \pm 0,1$  mol pro mol HSA. Da die DTT-Konzentration hier zur Spaltung geringer war (165 mol DTT pro mol HSA) als in den Experimenten zur Evaluierung der DTT-Konzentration (siehe 4.2.2.1), wurde in diesen Experimenten der Maximalwert von 24 DTT-SH-Gruppen, die allein durch den Zusatz des DTTs eingeführt wurden, nicht erreicht.

#### 4.2.4.1.3 Evaluierung der Cystaminkonzentration

Zur Evaluierung des Einflusses der Cystaminkonzentration auf den Gehalt an eingeführten SH-Gruppen wurde eine konstante EDC-Konzentration von 980 mol pro mol HSA gewählt, um die maximale Bindungskapazität des EDCs auszuschöpfen (siehe 4.2.4.1.2).

Abbildung 40: Einfluß der Cystaminkonzentration bei konstanter EDC-Konzentration auf den Gehalt von eingeführten SH-Gruppen an HSA-Nanopartikel (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)

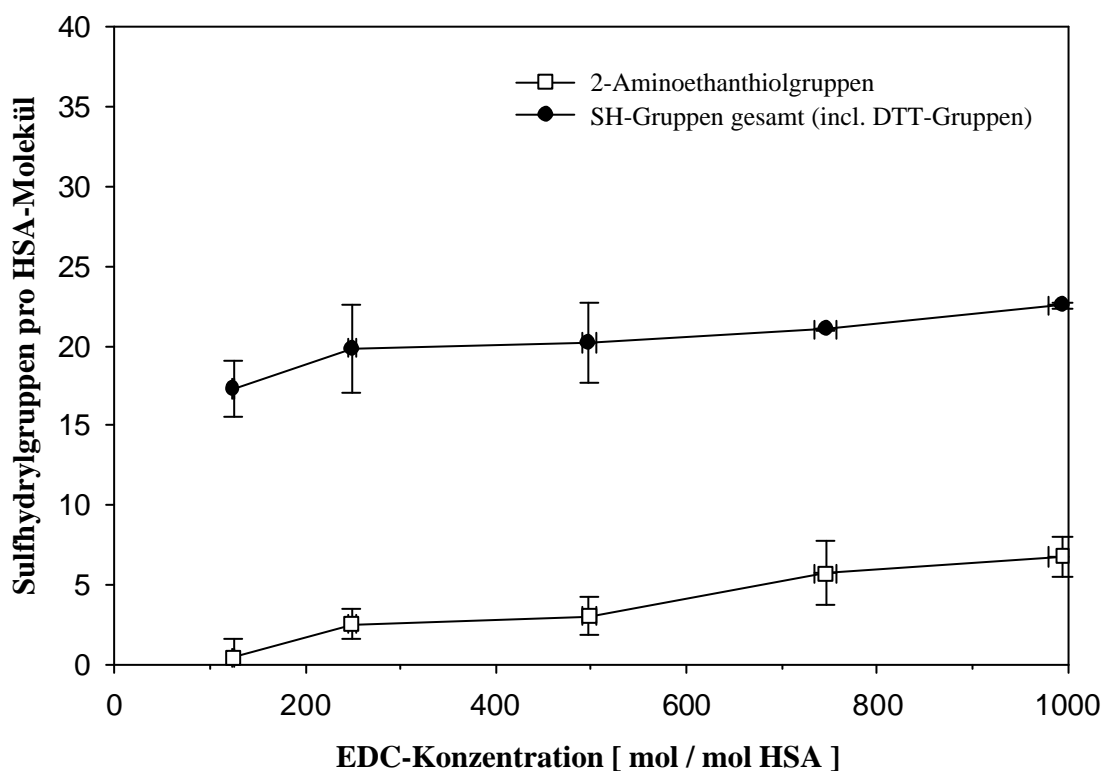


Bei dem Einsatz von Cystaminkonzentrationen von 24 bis 980 mol pro mol HSA zeigte sich ein signifikanter Anstieg der 2-Aminoethanthiolgruppen mit steigendem Cystaminzusatz (siehe Abbildung 40) von  $4,1 \pm 1,0$  auf  $15,7 \pm 1,1$  SH-Gruppen pro HSA-Molekül.

#### 4.2.4.2 Kopplung von L-Cystein mit EDC

Als Vergleich wurden die EDC-Kopplungsexperimente mit L-Cystein als SH-gruppenhaltiger Komponente bei einer konstanten L-Cysteinkonzentration von 230 mol pro mol HSA und steigenden EDC-Konzentrationen wiederholt. Mit Ellmans Reagenz konnten jedoch nahezu keine reaktiven SH-Gruppen an der Partikeloberfläche nachgewiesen werden, was auf eine kompetitive Reaktion der SH-Gruppen mit EDC zurückzuführen sein wird, wie von Carraway und Triplett (1970) veröffentlicht.

Abbildung 41: Einfluß der EDC-Konzentration auf die Bindung von L-Cystein an HSA-Nanopartikel (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



Eine Verbesserung der Ergebnisse wurde durch Umsetzung der EDC-Cystein-Nanopartikel mit DTT zur Reduktion möglicherweise entstandener Oxidations- und EDC-Kopplungsprodukte erreicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt. Die Zunahme der SH-Gruppen mit steigenden EDC-Konzentrationen ist nur gering aber trotzdem signifikant mit einem Maximalwert von  $6,8 \pm 1,3$  Sulfhydrylgruppen pro HSA-Molekül.

Vergleicht man den Maximalwert an eingeführten SH-Gruppen von  $6,8 \pm 1,3$  mol pro mol HSA mit der unter diesen Reaktionsbedingungen (insbesondere den verwendeten Konzentrationen) erzielten SH-Gruppenzahl von  $10,0 \pm 0,1$  mol pro mol HSA bei der Kopplung von Cystamin anstelle des L-Cysteins, so scheint die Kopplungseffektivität der EDC-Bindung mit L-Cystein signifikant geringer als die entsprechende Kopplung des Cystamins. Sowohl die Bildung von Thioestern anstelle von Amidien mit den Carboxylgruppen der Partikeloberfläche als auch die intermolekulare Verknüpfung von Cysteinmolekülen über Thioester und Amide mögen der Grund hierfür sein.

#### **4.2.5 Modifikation der Aminogruppen mit Trauts Reagenz**

Eine weitere Methode zur Einführung von SH-Gruppen in natürliche Polymere ist die Umsetzung mit Trauts Reagenz (= 2-Iminothiolan) (Traut et al. 1973, Lambert et al. 1978, Tarentino et al. 1993). Das Reaktionsschema ist in Abbildung 42 dargestellt. Das primäre Amin reagiert mit 2-Iminothiolan unter Bildung eines instabilen Intermediates, welches dann schnell zu dem erwarteten Reaktionsprodukt (1) abreagiert. Eine mögliche Nebenreaktion stellt allerdings die Bildung des N-substituierten 2-Iminothiolans dar, welches je nach pH-Wert und  $pK_a$  der Aminogruppe der angreifenden Komponente (Singh et al. 1996) in die Thiolkomponente (2) zerfallen kann. Vorteil des Reaktionsproduktes (1) ist, daß die positive Ladung der Aminogruppe durch die Iminogruppe erhalten bleibt, was bei Produkt (2) nicht der Fall ist. Diese Reaktion wurde auf das HSA-Partikelsystem übertragen und Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Konzentrationen sowie der Reaktionszeit evaluiert. Das Reaktionsschema der Einführung von SH-Gruppen mit Trauts Reagenz ist in Abbildung 43 dargestellt.

Abbildung 42: Schema der Reaktion von 2-Iminothiolan mit primären Aminen (nach Singh et al. 1996)

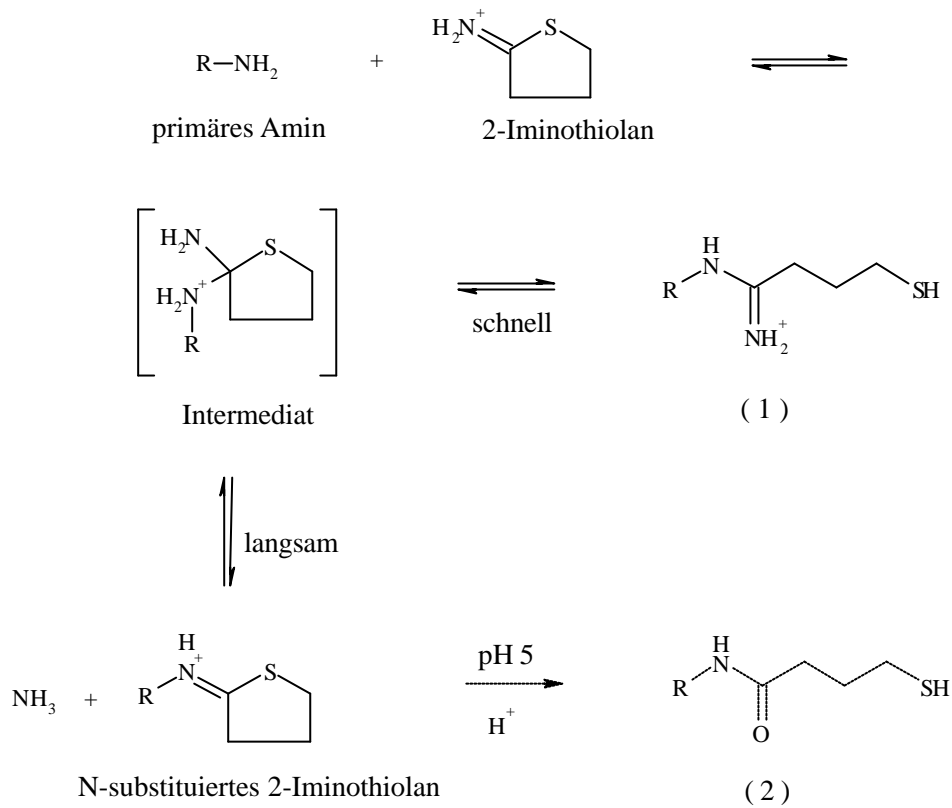
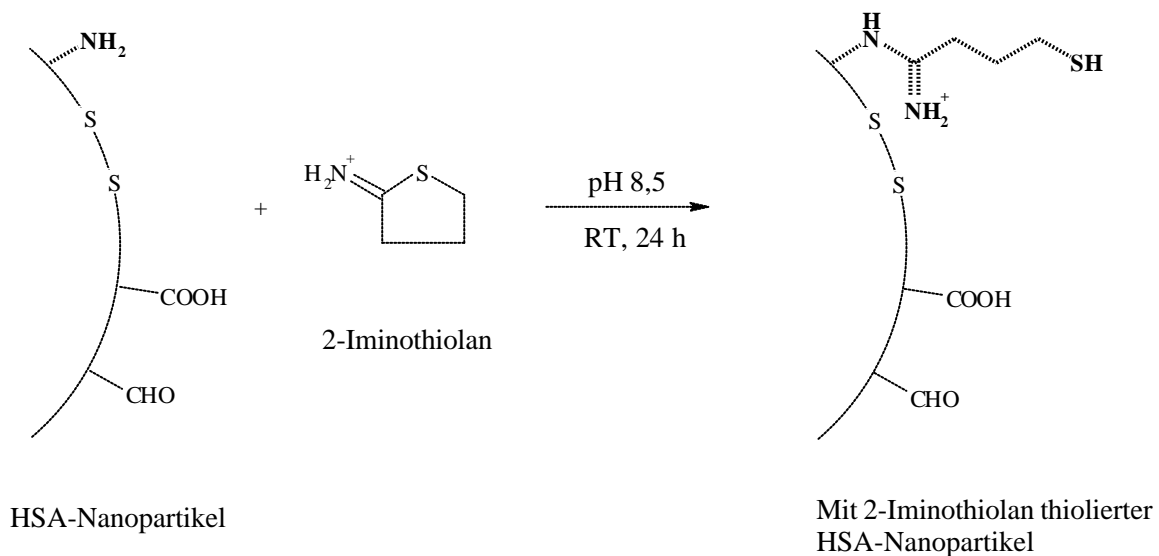


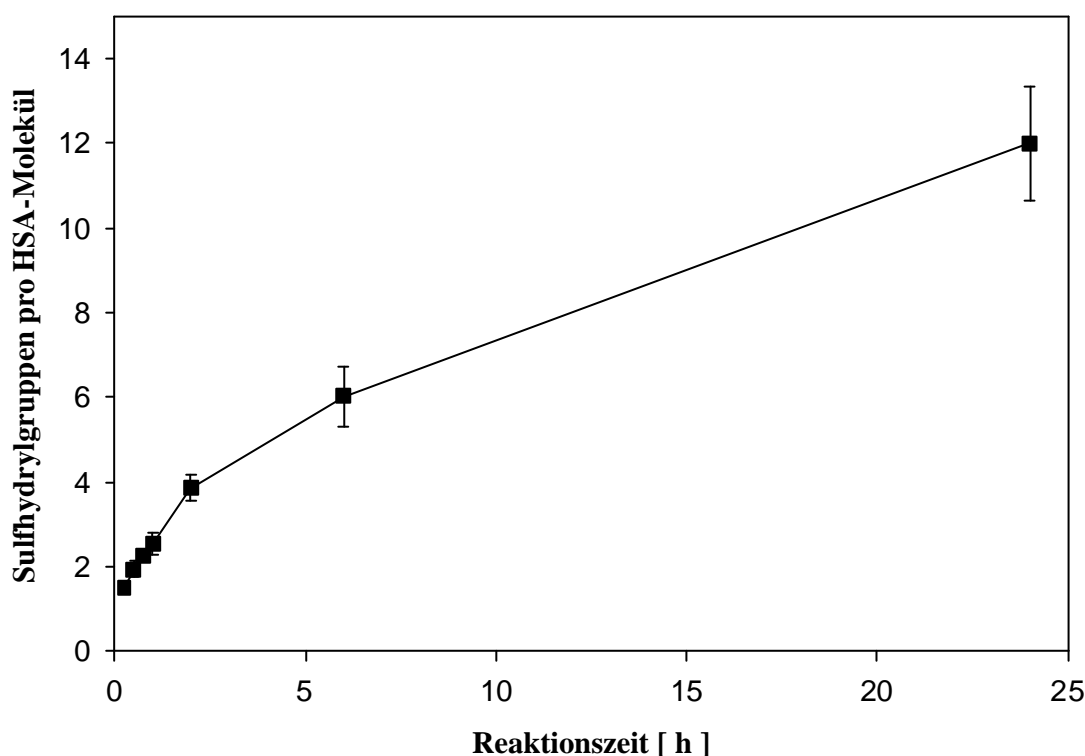
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Einführung von SH-Gruppen an die Partikeloberfläche von HSA-Nanopartikeln mit Trauts Reagenz



#### 4.2.5.1 Evaluierung der Reaktionszeit

Zur Evaluierung der Reaktionszeit wurde die Reaktion nach verschiedenen Zeitintervallen durch den Zusatz eines Überschusses an Hydroxylaminhydrochlorid abgebrochen und die reaktiven SH-Gruppen an der Partikeloberfläche quantifiziert. Wie in Abbildung 44 deutlich zu sehen ist, stieg die Anzahl der SH-Gruppen mit zunehmender Reaktionszeit bis zu 24 h stetig an. Längere Reaktionszeiten wurden nicht untersucht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Reaktionszeit in den folgenden Experimenten auf 24 h festgelegt.

Abbildung 44: Evaluierung der Reaktionszeit bei der Thiolierung von HSA-Nanopartikeln mit Trauts Reagenz (n=3, Mittelwert  $\pm$  S.D.)



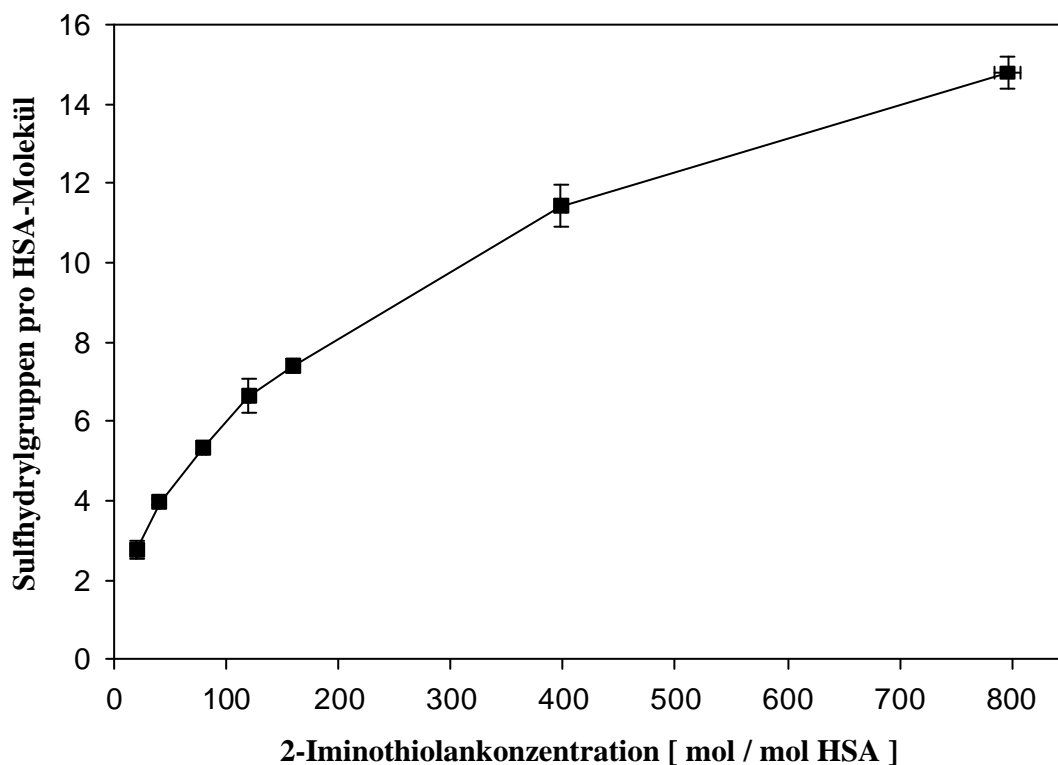
Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten von Singh et al. (1996), die ein instabiles Thiol-Produkt (1) postulierten, welches dann über eine Reaktion erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 0,3 bis 3 h bei 23°C zu dem N-substituierten Iminothiolan abgebaut wird. Sollte dies eintreten, wären auf der Nanopartikeloberfläche keine SH-Gruppen nachweisbar. Da die Reaktion der

Nanopartikelumsetzung bei pH 8,5 durchgeführt wurde, ist auch eine weitere Umlagerung des N-substituierten Iminothiolans bei pH 5 zu dem Thiolprodukt (2) keine mögliche Erklärung.

### 4.2.5.2 Evaluierung der 2-Iminothiolankonzentration

Die Evaluierung des Einflusses der 2-Iminothiolankonzentration auf die Anzahl eingeführter SH-Gruppen ergab eine signifikant steigende Zahl reaktiver SH-Gruppen an der Partikeloberfläche mit zunehmender Trauts Reagenz-Zugabe wie in Abbildung 45 dargestellt. Eine maximale SH-Gruppenzahl von  $14,8 \pm 0,4$  mol pro mol HSA konnte mit dieser Methode erzielt werden.

Abbildung 45: Einfluß der 2-Iminothiolankonzentration auf die eingeführten SH-Gruppen bei der Umsetzung von HSA-Nanopartikeln (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)



#### 4.2.6 Einfluß der SH-Modifikation auf Partikelgröße und Zetapotential

Die SH-Modifikationen an der Nanopartikeloberfläche verändern durch Reaktion mit den funktionellen Gruppen der Partikeloberfläche die physikochemischen Eigenschaften der Partikel, was sich in einer Änderung der Partikelgröße und des Zetapotentials äußern könnte. Die Ergebnisse der PCS-Messung und der Zetapotentialbestimmung sind in Tabelle 7 dargestellt. Der Vergleich mit den unmodifizierten HSA-Partikeln zeigt, daß durch die SH-Gruppeneinführung mit DTT und Trauts Reagenz die Partikelgröße nicht beeinflusst wurde, die mit EDC und Cystamin modifizierten Partikel dagegen waren signifikant vergrößert. Worauf diese Größenzunahme zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise beruht sie auf der Veränderung des Zetapotentials und damit auf veränderten Oberflächeneigenschaften zusammen mit einer gesteigerten Aggregationsneigung.

Tabelle 7: Einfluß der SH-Modifikation bei der Umsetzung von HSA-Nanopartikeln auf Partikelgröße und Zetapotential (n=3)

SH-Gruppeneinführung mit:	Partikelgröße [ nm ]		Zetapotential [ mV ]	
	Mittelwert	S.D.	Mittelwert	S.D.
DTT	345,68	33,24	-25,63	6,65
EDC/Cystamin	426,80	24,47	+46,20	0,42
Trauts Reagenz	339,27	33,84	-31,50	2,84
unmodifizierte HSA-NP	349,63	52,80	-21,47	4,24

Das Zetapotential der DTT-Partikel war erwartungsgemäß mit dem der Ausgangspartikel vergleichbar, da durch die Oberflächenmodifikation mit DTT weder geladene Gruppen eingeführt, noch geladene Gruppen an der Partikeloberfläche umgesetzt wurden. Durch die Umsetzung der Aminogruppen mit Trauts Reagenz dagegen wurde die Anzahl freier und damit positiv geladener Aminogruppen reduziert, die Zahl der Carboxylgruppen blieb jedoch unverändert, was zu einer signifikanten Verringerung des Zetapotentials führte. Die deutlichste Veränderung des Zetapotentials ergab sich bei der SH-Gruppeneinführung mit EDC. Die Reaktion der

Carboxylgruppen mit EDC und Cystamin bedingt ein Wegfallen der negativ geladenen Carboxylgruppen bei gleichbleibender Aminogruppenzahl an der Partikeloberfläche. Neben der Einführung der ungeladenen 2-Aminoethanthiolgruppen kann auch die Bildung von basischen N-Acyl-Harnstoff-Derivaten — eine Nebenreaktion des EDCs im Überschuß (siehe 2.3.3.1.1) — zur Positivierung des Zetapotentials beitragen. Der Einfluß des EDCs auf das Zetapotential wird noch in 4.3.1.1 ausführlicher diskutiert.

#### 4.2.7 Stabilität der SH-modifizierten Nanopartikel in verschiedenen Medien

Die in den vorherigen Kapiteln durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität bezogen sich ausschließlich auf die Lagerung der Zubereitungen in MilliQ-Wasser. Da aber eine Applikation der Nanopartikelpräparation ein isotones Medium erfordert, eine Änderung der Ionenstärke des Dispersionsmediums jedoch Einfluß auf das Zetapotential und damit auch auf die Stabilität der Partikelzubereitungen in den verschiedenen Medien hat, wurde die Partikelgröße der SH-modifizierten Nanopartikel in PBS-Puffer pH 7,4 und isotonischer Kochsalzlösung im Vergleich zu MilliQ-Wasser bestimmt (Ergebnis siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Stabilität SH-modifizierter Nanopartikel in verschiedenen Dispersionsmedien (n=2)

Einführung der SH-Gruppen mit:	Partikelgröße [ nm ]		
	Dispersionsmedium		
	MilliQ-Wasser	PBS-Puffer	0,9% NaCl
DTT	492,6	504,2	495,5
Traut's Reagenz	522,3	528,1	497,9
EDC/Cystamin	506,7	geflockt	537,4

Die DTT-modifizierten Partikel sowie die mit Trauts Reagenz umgesetzten Nanopartikel zeigten in den salzhaltigen Medien im Vergleich zu reinem Wasser kein



verändertes Verhalten. Lediglich die mit EDC und Cystamin versetzten Proben flockten in isotonem PBS-Puffer bei pH 7,4, was auf eine Anlagerung negativer Phosphationen an die positive Partikeloberfläche zurückzuführen sein mag.

#### **4.2.8 Untersuchung der Lagerstabilität der eingeführten Sulfhydrylgruppen**

Die Oxidationsempfindlichkeit von SH-Gruppen ist bekannt. Deswegen wurde im folgenden Kapitel untersucht, inwieweit SH-Gruppen nach ihrer Einführung an der Partikeloberfläche stabil sind bzw. nach bestimmter Lagerdauer noch verfügbar sind. Zu diesem Zweck wurden SH-modifizierte Nanopartikel für 8 Wochen bei 4°C gelagert und die SH-Gruppen in bestimmten Abständen quantifiziert. Da auch die Art der SH-Modifikation einen Einfluß auf die Lagerstabilität haben könnte, wurden Partikelpräparationen der Traut-Nanopartikel, der DTT-Nanopartikel, der EDC-Cystamin-Nanopartikel und der EDC-Cystein-Nanopartikel untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 46 bis 49 dargestellt. Es zeigte sich unabhängig von der SH-Modifikation eine signifikante Abnahme der SH-Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Um die Reaktionsordnung und die Geschwindigkeitskonstante des SH-Gruppenabbaus zu bestimmen, wurden für jede der vier Modifikationsmethoden die Mittelwerte der SH-Gruppenzahlen bei drei verschiedenen SH-Reagenz-Konzentrationen berechnet und die Ergebnisse logarithmisch gegen die Lagerungsdauer aufgetragen (siehe Abbildung 50). Basierend auf einer Reaktionskinetik pseudoerster Ordnung konnten die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der verschiedenen Methoden aus der Steigung der Regressionsgeraden berechnet werden (siehe Tabelle 9). Es resultierte eine mittlere Geschwindigkeitskonstante von  $k = 0,0246 \pm 0,0021 \text{ [d}^{-1}\text{]}$  und ergab somit eine Halbwertszeit der SH-Gruppen von  $t_{1/2} = 28,2 \text{ d}$  auf der Partikeloberfläche. Die Stabilität der eingeführten SH-Gruppen an der Partikeloberfläche ist also demnach, unabhängig von der Art der Einführung, deutlich höher als erwartet. Singh et al. (1996) beschreiben beispielsweise, daß die über Trauts Reagenz eingeführten SH-Gruppen in gelösten Proteinen lediglich eine Halbwertszeit von 1 h aufweisen.

Abbildung 46: Lagerstabilität der DTT-modifizierten HSA-Nanopartikel (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)

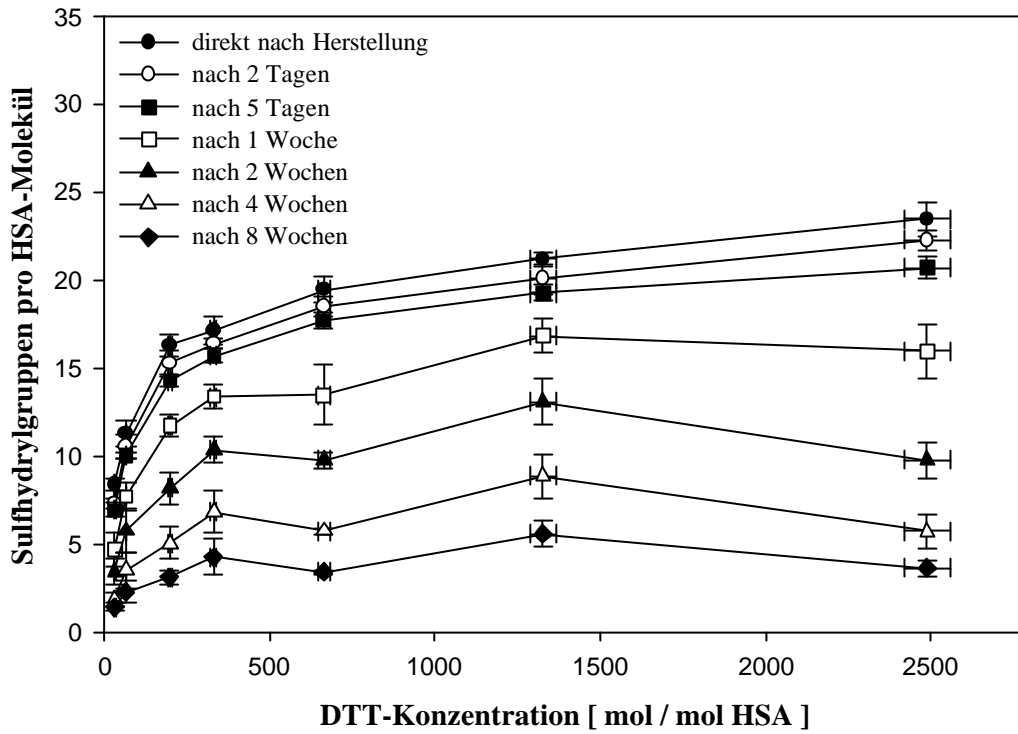


Abbildung 47: Lagerstabilität der EDC/Cystamin-modifizierten HSA-Nanopartikel (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)

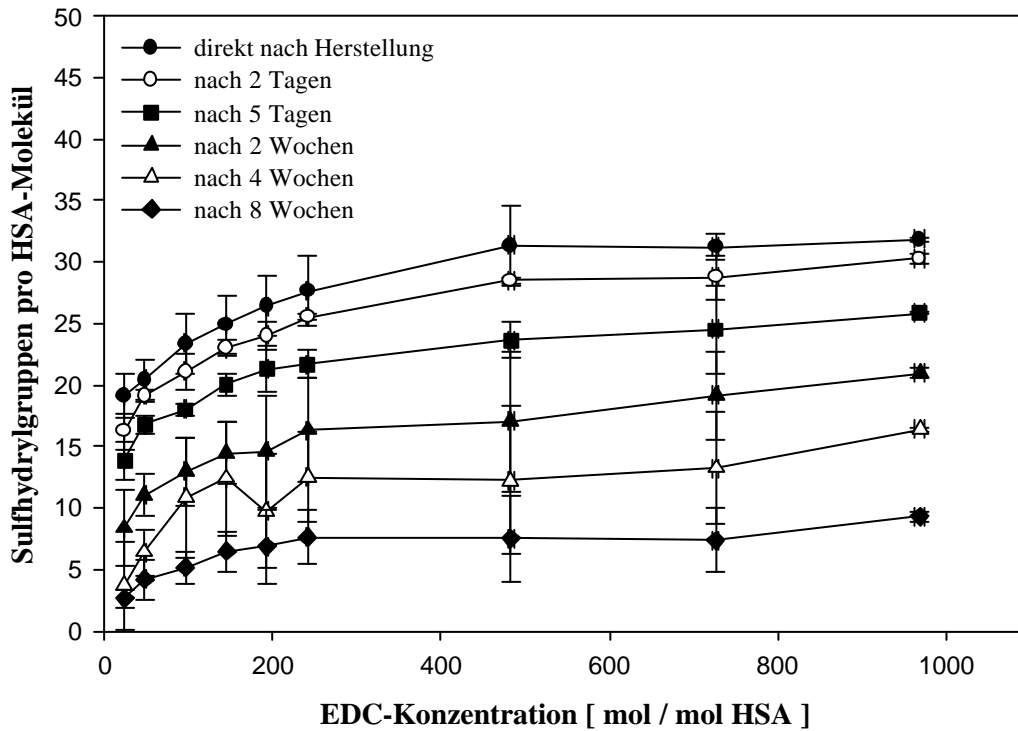


Abbildung 48: Lagerstabilität der EDC/L-Cystein-modifizierten HSA-Nanopartikel (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)

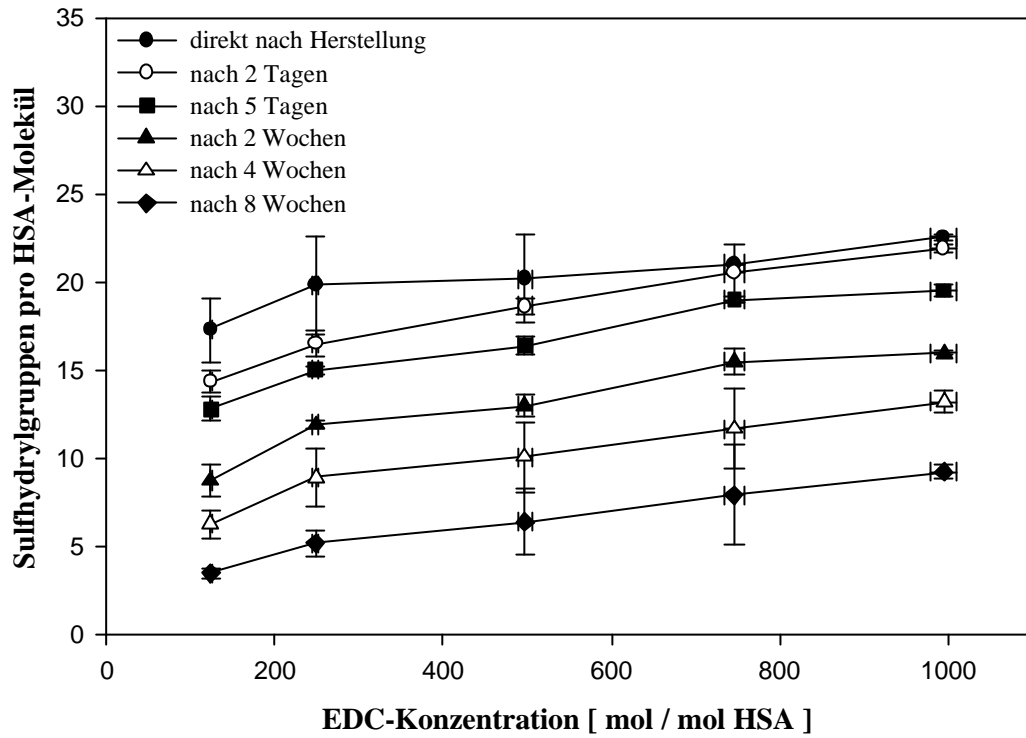


Abbildung 49: Lagerstabilität der mit Trauts Reagenz modifizierten HSA-Nanopartikel (n=3; Mittelwert  $\pm$  S.D.)

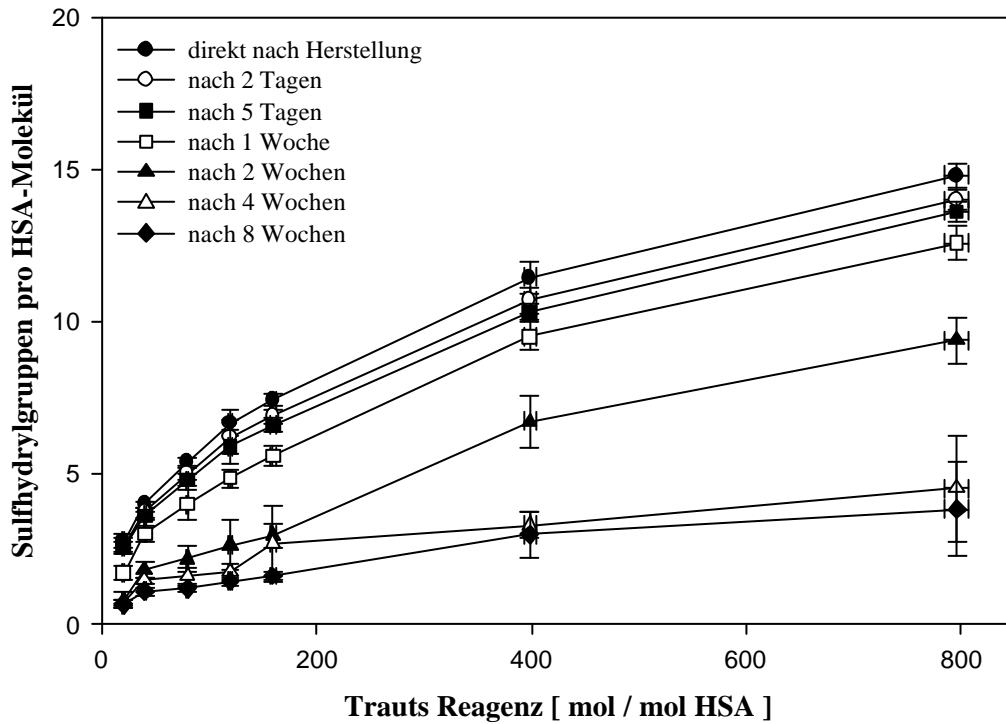
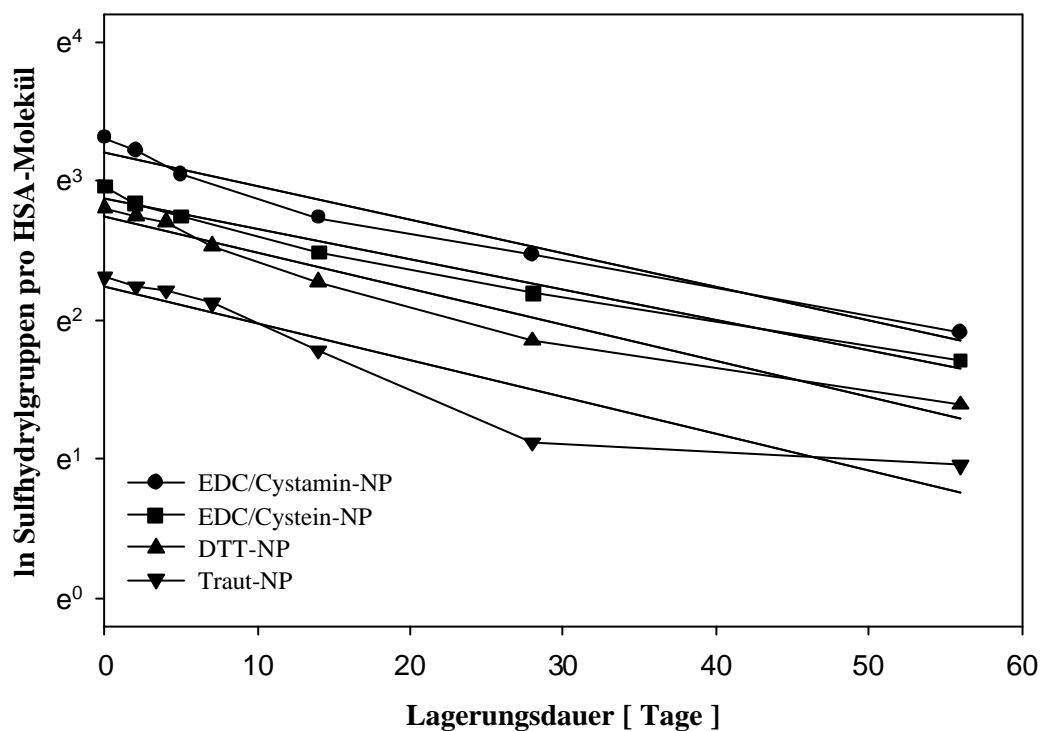


Abbildung 50: Kinetik des SH-Gruppenabbaus auf der Oberfläche von HSA-Nanopartikeln in Abhängigkeit der Methode der SH-Gruppeneinführung



Dieser Befund konnte in diesem Experiment nicht bestätigt werden, was möglicherweise aber auf einen Schutz der SH-Gruppen an der Partikeloberfläche durch die Nanopartikel zurückzuführen sein mag. Dennoch zeigt das Experiment, daß die SH-modifizierten Partikel so bald wie möglich nach der Herstellung verarbeitet werden sollten, da ein Abbau der SH-Gruppen zu verzeichnen ist.

Tabelle 9: Geschwindigkeitskonstanten des SH-Gruppenabbaus

HSA-NP umgesetzt mit:	Geschwindigkeitskonstante k des SH-Gruppenabbaus [ d <sup>-1</sup> ]
DTT	0,02601
EDC/Cystamin	0,02429
EDC/L-Cystein	0,02164
Trauts Reagenz	0,02631

## **4.2.9 Untersuchung der Zytotoxizität mit MTT-Test**

Die auf unterschiedliche Arten eingeführten SH-Gruppen stellen lediglich eine Zwischenstufe bei der Präparation eines Trägersystems dar. Doch auch nach der Umsetzung der SH-Gruppen mit einem SH-Gruppen-reaktiven Spacer werden noch freie SH-Gruppen an der Partikeloberfläche vorhanden sein, die ihrerseits die Toxizität der HSA-Partikel verändern könnten. Da für eine spätere Anwendung in biologischen Systemen die Toxizität eine entscheidende Rolle spielt, wurde der Einfluß der verschiedenen SH-modifizierten Nanopartikelpräparationen auf die Zellviabilität von HeLa-Zellen mit Hilfe des MTT-Tests untersucht.

### **4.2.9.1 Der MTT-Test**

Der wasserlösliche gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid wird durch die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan umgesetzt. Dieser wasserunlösliche Farbstoff wurde nach Auflösung der Zellen in alkalischem Milieu gelöst und photometrisch bei 540 nm vermessen. Die enzymatische Umsetzung zu Formazan kann lediglich in lebenden Zellen erfolgen und somit ist die gemessene Extinktion direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen.

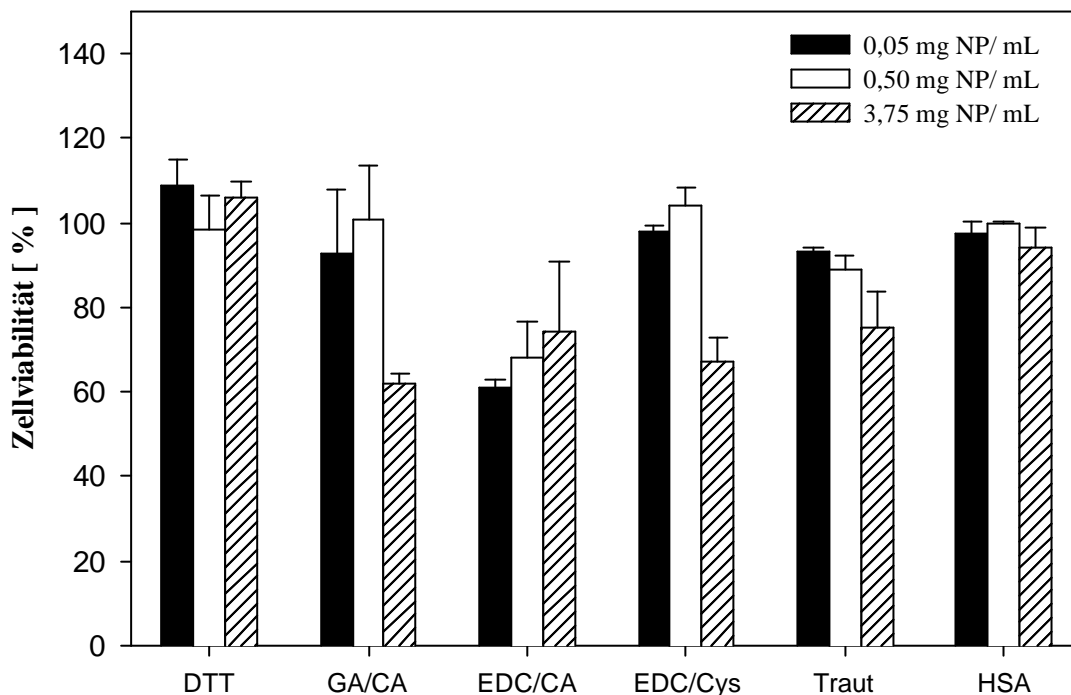
### **4.2.9.2 Zellviabilität SH-modifizierter HSA-Nanopartikel**

Untersucht wurde die Toxizität der DTT-Nanopartikel (DTT), der Traut-Nanopartikel (Traut), der EDC/Cystamin-Nanopartikel (EDC/CA), der EDC/Cystein-Nanopartikel (EDC/Cys) und der Glutaraldehyd/Cystamin-Nanopartikel (GA/CA) im Vergleich zu unmodifizierten HSA-Nanopartikeln bei drei unterschiedlichen Konzentrationen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt.

Reine HSA-Nanopartikel wiesen bei allen drei Konzentrationen so gut wie keine Zelltoxizität auf. Auch die Modifikation mit DTT und 2-Iminothiolan schien die Zellviabilität nicht zu beeinflussen, wobei sich hier eine leichte Dosisabhängigkeit zeigte. Niedrige Konzentrationen der EDC/Cystein und der Glutaraldehyd/Cystamin-Nanopartikel waren ebenfalls so gut wie untoxisch. Hier zeigte sich allerdings bei

hohen Partikelkonzentrationen bereits eine sehr deutliche Toxizität mit einer Zellviabilität von etwa 60 %. Dies galt auch für die EDC/Cystamin-Präparation. Hier war eine deutliche Zelltoxizität bei allen Konzentrationen zu erkennen, was wahrscheinlich auf die extrem hohen EDC-Konzentrationen bei der Herstellung und den daraus resultierenden positiven Ladungen an der Partikeloberfläche zurückzuführen ist (siehe Tabelle 7).

Abbildung 51: Toxizität der SH-modifizierten Nanopartikel



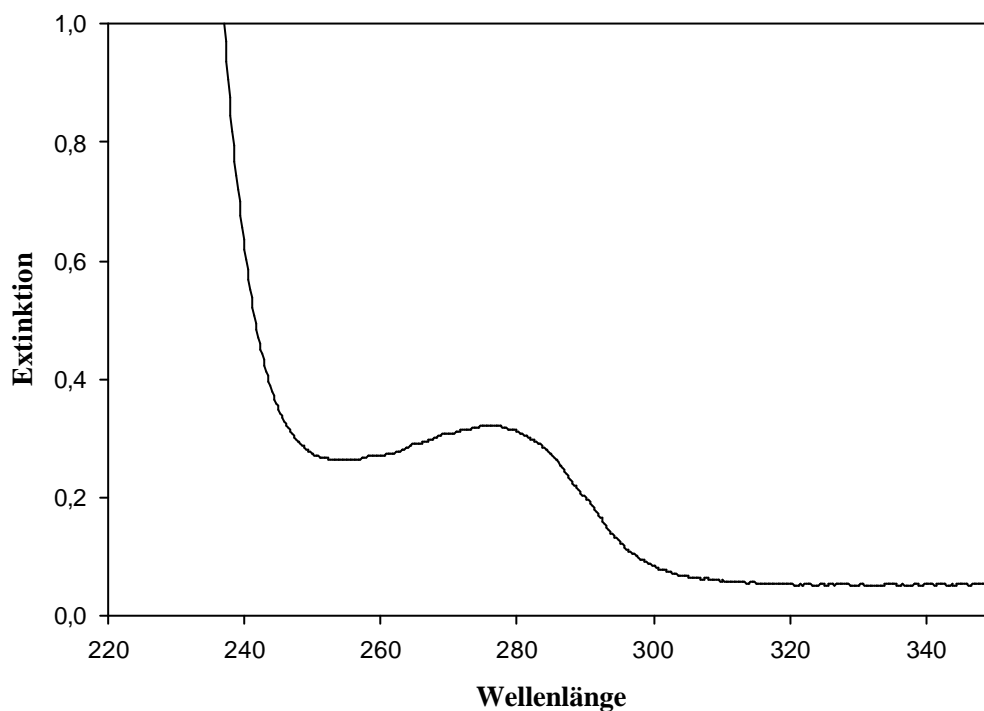
### 4.2.10 Mukoadhäsion der SH-modifizierten HSA-Nanopartikel

Durch die Einführung der SH-Gruppen an die Partikeloberfläche wurden neben der Schaffung von Bindungsstellen für Spacer und bifunktionelle Crosslinker möglicherweise auch die adhäsiven Eigenschaften der Partikel, insbesondere die mukoadhäsiven Eigenschaften verändert. Die Verbesserung der mukoadhäsiven Eigenschaften wurde durch Bindung von Lektinen (Lehr 1994) oder Antikörpern (MacAdam et al. 2000) und die Einführung von SH-Gruppen an Trägersysteme bereits beschrieben (Bernkop-Schnürch et al. 1999, Bernkop-Schnürch and Steininger 2000).

#### 4.2.10.1 Mucin

Über die Struktur, Bildung und Zusammensetzung des Mucins wurde in der Literatur viel berichtet (Meyer and Silberberg 1978, Bernkop-Schnürch et al. 1999, Perez-Vilar and Hill 1999). Mucin besteht aus flexiblen Glykoproteinketten, die über Disulfidbrücken quervernetzt sind. An freie SH-Gruppen oder Disulfidbrücken sollte nach Bernkop-Schnürch et al. (1999) eine Bindung mit anderen Sulfhydrylgruppen möglich sein.

Abbildung 52: Absorptionsspektrum des Mucins



Mucin ist ein sehr heterogenes Polymer, so daß eine quantitative Bestimmung der Bindung des Mucins an Trägersysteme mit einer direkten, spektralphotometrischen Methode nur bedingt möglich ist (Bernkop-Schnürch et al. 1999). Die Messung erfolgte in der Schulter des Absorptionsspektrums bei 276 nm (siehe Abbildung 52). Da sich Mucin bei pH 7,8 nicht vollständig löst, für eine photometrische Bestimmung die Lösung aber klar sein muß, wurden die unlöslichen Mucinbestandteile abzentrifugiert, die Lösung nochmals sterilfiltriert und der Gehalt der Mucinlösung anschließend über Trocknungsverlust bestimmt.

#### 4.2.10.2 Ergebnis der Mucinbindung

Wie bereits oben beschrieben, ist eine quantitative Aussage über die Mucinbindung an die Partikel aufgrund der Heterogenität und der schlechten Lösungseigenschaften des Mucins problematisch. Die Ergebnisse der Bestimmung in Tabelle 10 zeigen aber dennoch eine deutlich stärkere Neigung des Mucins, sich in wesentlich höherem Maße an SH-modifizierte Nanopartikel anzulagern als an reine, unmodifizierte HSA-Partikel. Daneben scheinen die mukoadhäsiven Eigenschaften der mit Trauts Reagenz umgesetzten Partikel gegenüber den mit DTT reduzierten Partikeln deutlich erhöht. Dies mag unter Umständen auf eine sterisch bedingte, unterschiedliche Verfügbarkeit der SH-Gruppen an der Partikeloberfläche zurückzuführen sein (siehe auch 4.4.1.2.3).

Tabelle 10: Mukoadhäsion von SH-modifizierten HSA-Nanopartikeln (n=3)

Einführung der SH-Gruppen mit:	Mucinbindung an Nanopartikel	
	Mittelwert	S.D.
	[ mg/mg NP]	
DTT	0,198	0,135
Trauts Reagenz	0,433	0,303
unmodifizierte HSA-NP	0,028	0,032

#### 4.2.11 Vergleich der verschiedenen Methoden zur SH-Gruppeneinführung

Eine Übersicht über die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen sechs Methoden zur SH-Gruppeneinführung ist in Tabelle 11 gegeben. Sowohl die Art der SH-Gruppenmodifikation inklusive des resultierenden Spacers als auch die maximal erzielten SH-Gruppenzahlen an der Partikeloberfläche und die Umrechnung auf SH-Gruppen pro HSA-Nanopartikel sind aufgeführt. Die Werte in Klammern geben die Gesamtanzahl freier SH-Gruppen inklusive der durch die DTT-Umsetzung eingeführten SH-Gruppen an.



Die Tabelle zeigt, daß eine Einführung von SH-Gruppen über freie Aldehydgruppen des Quervernetzers Glutaraldehyd bei einem vergleichsweise hohen Arbeitsaufwand zu relativ niedrigen Ausbeuten führte. Die Thiolierung mit Trauts Reagenz dagegen war von der Durchführung und der Anzahl der eingeführten SH-Gruppen her eine sehr einfache und effektive Methode; ebenso die Einführung von SH-Gruppen mit EDC und Cystamin. Zwar ist diese Methode aufwendiger als die Umsetzung mit Trauts Reagenz, stellt aber eine Alternative zur Einführung der SH-Gruppen über die Aminofunktionen dar, die gegebenenfalls für andere Modifikationsschritte benötigt werden. Die Kopplung von L-Cystein mit EDC dagegen war wiederum aufgrund von Nebenreaktionen zu uneffektiv.

Tabelle 11: Übersicht über die diversen Methoden zur SH-Gruppeneinführung an der Partikeloberfläche

Reagentien	Zielgruppe	Durch SH-Modifikation eingeführter Spacer	max. SH-Gruppen [mol/mol]	SH-Gruppen gesamt pro HSA-NP
DTT	-S-S-	Protein-SH	24	$6,0 \times 10^6$
Glutaraldehyd Cystamin (DTT)	-NH <sub>2</sub>	Protein-N=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=O	5 (21)	$1,3 \times 10^6$
Glutaraldehyd L-Cystein (DTT)	-NH <sub>2</sub>	Protein-N=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=O COOH	2 (18)	$5,0 \times 10^5$
EDC Cystamin (DTT)	-COOH	Protein-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	21 (44)	$1,1 \times 10^7$
EDC L-Cystein (DTT)	-COOH	Protein-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH COOH	7 (23)	$1,8 \times 10^6$
Trauts Reagenz	-NH <sub>2</sub>	Protein-NH-C(=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	15	$3,8 \times 10^6$

Am erstrebenswertesten mag die Einführung von SH-Gruppen durch die Umsetzung mit DTT erscheinen, da hier hohe SH-Gruppenzahlen mit sehr geringem Aufwand und ohne die Einführung HSA-fremder Strukturen resultierten. Doch die Bindungsversuche in 4.4.1.2.3 zeigten, daß diese durch reduktive Spaltung eingeführten SH-Gruppen zwar mit Ellmans Reagenz nachweisbar waren, aber für eine Bindung mit SH-reaktiven Spacern (in diesem Fall dem Sulfo-MBS) nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung standen. Dies zeigte sich bereits bei den Mucin-Bindungsexperimenten (siehe 4.2.10.2). Wahrscheinlich ist dies auf sterische Gegebenheiten zurückzuführen, da bei der Spaltung der HSA-Disulfidbrücken die SH-Gruppen direkt auf der Partikeloberfläche anfallen und nicht durch einen Spacer für weitere Reaktionen zugänglich gemacht werden.

### **4.3 Einführung funktioneller Gruppen zur Modifikation der Oberflächenladung**

Die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikeloberfläche haben entscheidenden Einfluß auf die Verteilung und Aufnahme der Nanopartikel nach der Applikation. Außerdem wird die Arzneistoffbeladung je nach den physikochemischen Eigenschaften des gewählten Arzneistoffes erheblich von der Oberflächenbeschaffenheit des Trägersystems beeinflusst. Deshalb wurden HSA- und in einigen Fällen auch Gelatine-Nanopartikel mit dem Ziel einer geänderten Oberflächenladung modifiziert und neben der Veränderung des Zetapotentials in der Zellkultur auf eine Veränderung hinsichtlich ihrer Zelladhäsion untersucht.

#### **4.3.1 Herstellung von Nanopartikeln mit positivem Zetapotential**

Unmodifizierte HSA-Nanopartikel weisen wie in 4.1.3.1 bereits erläutert, in 0,01M Phosphatpuffer ein negatives Zetapotential auf. Sollen nun negativ geladene Arzneistoffe, wie beispielsweise DNA-Strukturen (Antisense-Oligonukleotide, Plasmide) an die Oberfläche dieser Trägersysteme adsorbiert bzw. über elektrostatische Wechselwirkungen gebunden werden, wird dies ohne eine Modifikation der Oberflächenladung der Nanopartikel nicht möglich sein.

#### **4.3.1.1 Modifikation von HSA-Nanopartikeln mit EDC**

Die einfachste Methode zur Positivierung von HSA-Nanopartikeln ergibt sich aus der Umsetzung der Partikel mit EDC allein ohne Zugabe eines Nukleophils. Durch die Umsetzung mit EDC steigt das Zetapotential von  $-36,1 \pm 6,3$  mV auf  $+52,1 \pm 5,4$  mV an. Durch die Umsetzung der Carboxylgruppen mit einem Überschuß EDC entstehen, wie in 2.3.3.1.1 beschrieben, N-Acylharnstoffderivate mit zwei protonierbaren Aminofunktionen pro Carboxylgruppe. Die Maskierung und damit der Wegfall der negativ geladenen Carboxylgruppen zusammen mit der Einführung dieser Aminofunktionen bedingt die Ladungsveränderung. Doch die Anlagerung des N-Acylharnstoffderivates ist reversibel. Die Carboxylgruppen lassen sich durch Umsetzung mit 0,1 N NaOH wieder in ihren Ausgangszustand zurückversetzen.

#### **4.3.1.2 Modifikation von HSA-Nanopartikeln mit EDC und Cystamin bzw. EDC und Cholamin**

Um etwaige Nebenreaktionen des EDCs wie inter- und intramolekulare Quervernetzung zu vermeiden, wurde in den folgenden Versuchen das EDC mit den Nukleophilen Cystamin und Cholamin gequenchet und das überschüssige EDC bzw. die N-Acylharnstoffderivate anschließend durch Behandlung mit 0,1 N NaOH wieder abgespalten. Das Reaktionsschema der Umsetzung der HSA-Nanopartikel mit EDC/Cholamin ist in Abbildung 53 dargestellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 54 zeigen ein steigendes Zetapotential in MilliQ-Wasser über einen Konzentrationsbereich von 100 bis 600 mol des Nukleophiles/mol HSA bei einer EDC-Konzentration von 950 mol/mol HSA. Durch Cystamin werden lediglich die Carboxylfunktionen des HSAs maskiert und an deren Stelle primäre und damit protonierbare Aminogruppen eingeführt. Das Cholamin dagegen mit seiner quartären Aminostruktur führt an der Stelle der Carboxylgruppen direkt permanente positive Ladungen ein, was sich bei gleicher molarer Konzentration wie Cystamin in einem höheren Zetapotential äußert. Das Zetapotential der HSA-Partikel ist also über die eingesetzte Cystamin- bzw. Cholaminkonzentration steuerbar.

Abbildung 53: Reaktionsschema der Umsetzung von HSA-Nanopartikeln mit EDC/Cholamin

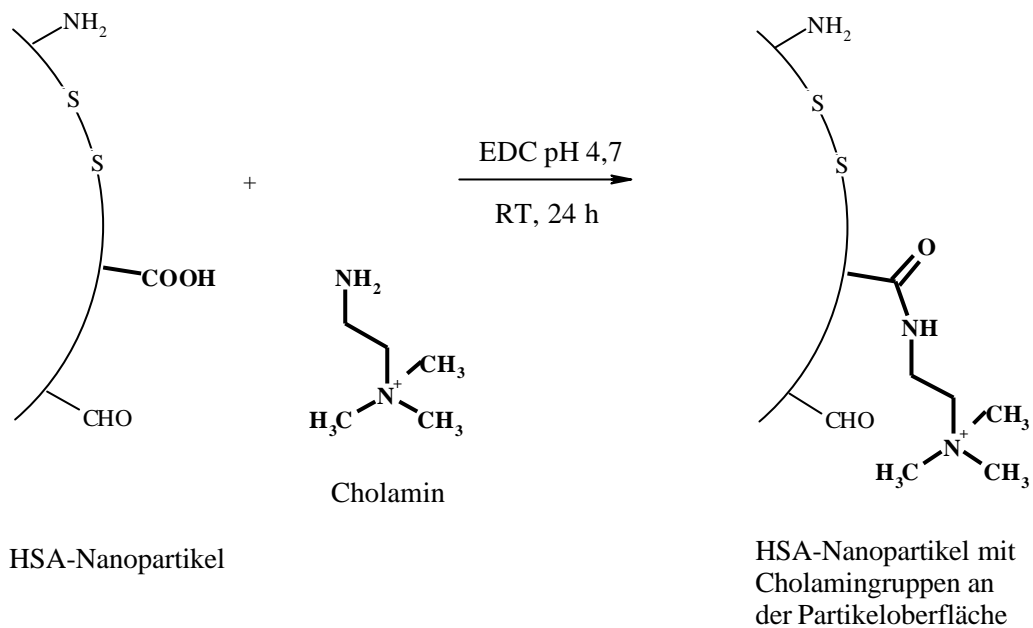
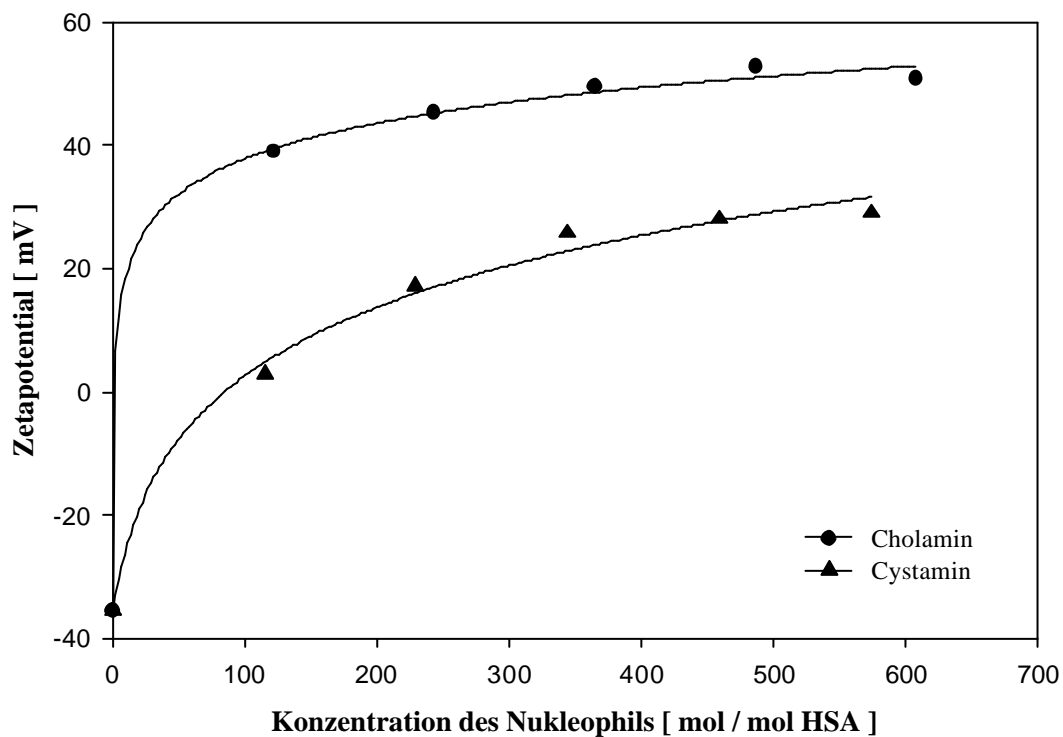


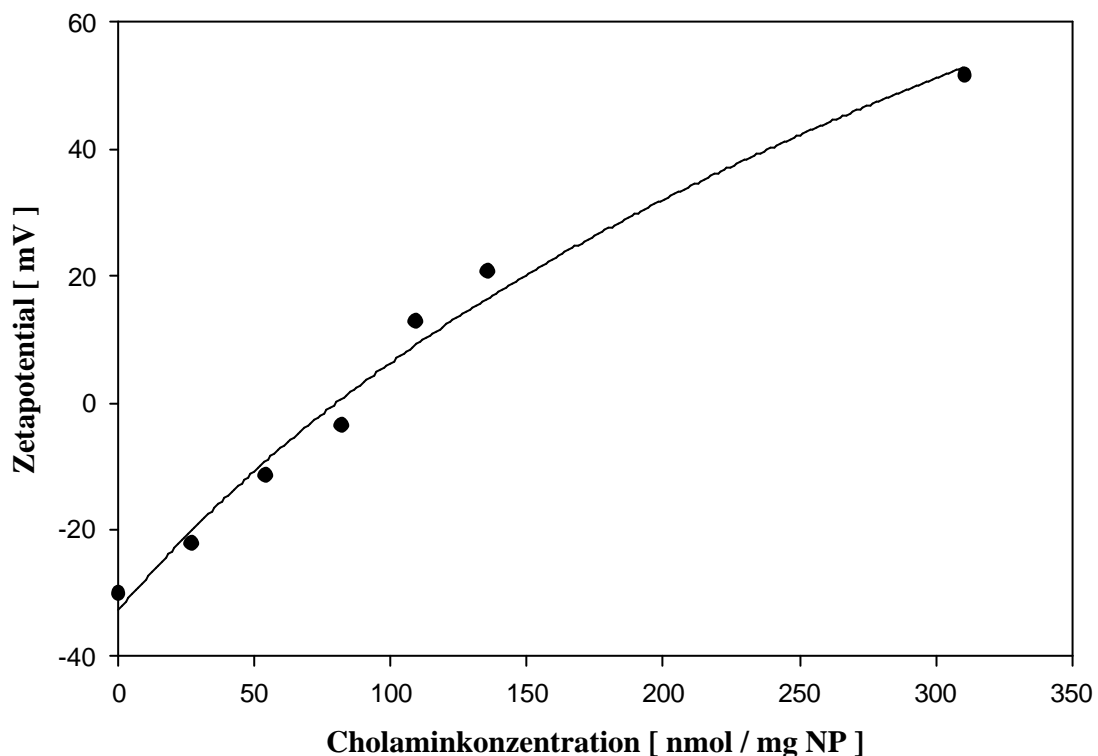
Abbildung 54: Einfluß einer Modifikation von HSA-Nanopartikeln mit EDC/Cystamin bzw. EDC/Cholamin auf das Zetapotential des resultierenden Trägersystems gemessen in MilliQ-Wasser



#### 4.3.1.3 Modifikation von Gelatine-Nanopartikeln mit EDC und Cholamin

Auch das Zetapotential von Gelatine A-Nanopartikeln lässt sich über die Einführung der quartären Aminogruppen des Cholamins steuern. Unmodifizierte Gelatine A-Nanopartikel weisen ein im Vergleich zu unmodifizierten HSA-Nanopartikeln höheres, also positiveres Zetapotential von  $-31,1 \pm 2,9$  mV in MilliQ-Wasser auf. Für eine Modifikation des Zetapotentials waren im Vergleich zu den HSA-Partikeln aufgrund des geringeren Carboxylgruppengehaltes der Gelatine wesentlich geringere Cholaminkonzentrationen erforderlich.

Abbildung 55: Einfluß der Modifikation von Gelatine A-Nanopartikeln mit EDC/Cholamin auf das Zetapotential des resultierenden Trägersystems gemessen in MilliQ-Wasser



#### 4.3.1.4 Modifikation von HSA-Nanopartikeln mit EDC und PEG 400

Bei der Modifikation der Carboxylgruppen mit EDC und PEG 400 wurden die PEG-Ketten anstatt über Amidbindungen als Ester gekoppelt. Auch hier wurden die N-Acylharnstoffderivate mit 0,1 N NaOH abgespalten. Durch die Maskierung der

Carboxylgruppen sollte sich das Zetapotential deutlich verändern, doch zeigte sich keinerlei Unterschied im Vergleich zu den unmodifizierten HSA-Nanopartikeln (siehe Tabelle 12). Eine mögliche Erklärung wäre die Spaltung der Esterbindung bei der NaOH-Behandlung der Partikel im Anschluß an die Kopplung. Eine Modifikation der Partikel hätte damit nicht stattgefunden, was aber nicht weiter überprüft wurde.

### 4.3.2 Maskierung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche

Eine Verringerung des Zetapotentials von HSA-Nanopartikeln sollte durch eine Maskierung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche der HSA-Nanopartikel erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden die Aminogruppen mit Acetanhydrid, mit Bernsteinsäureanhydrid, mit DTPA-Anhydrid und mit Jodessigsäure sowohl in neutralem als auch in alkalischem Milieu umgesetzt.

Tabelle 12: Einfluß der Oberflächenmodifikation von HSA-Nanopartikeln auf das Zetapotential des resultierenden Trägersystems.

Modifikation der Partikel- oberfläche mit	Zetapotential [ mV ]					
	Zellkulturmedium		10mM PB pH 7,0		1mM KCl	
	Mittelw.	S.D.	Mittelw.	S.D.	Mittelw.	S.D.
EDC / Cystamin	-23,7	3,3	-2,85	7,8	+21,5	8,0
EDC / PEG 400	-34,4	2,8	-40,9	3,0	-47,0	3,5
Acetanhydrid	-31,4	----	-27,7	----	-18,6	----
Bernsteinsäureanhydrid	-30,2	----	-33,4	----	-54,8	----
DTPA-Anhydrid	-33,4	----	-43,5	----	-57,2	----
Jodessigsäure neutral	-35,8	5,7	-40,3	3,5	-47,4	0,5
Jodessigsäure alkalisch	-29,8	3,4	-30,3	0,8	-47,6	5,5
unmodifizierte NP	-35,7	5,4	-42,2	3,4	-49,2	3,4

Die Umsetzung mit Jodessigsäure erfolgte bei verschiedenen pH-Werten, da in der Literatur für unterschiedliche pH-Werte unterschiedliche Reaktionsmechanismen beschrieben sind (siehe auch 2.3.3.4) (Gurd 1967, Shafi et al. 1995, MacAdam et al.

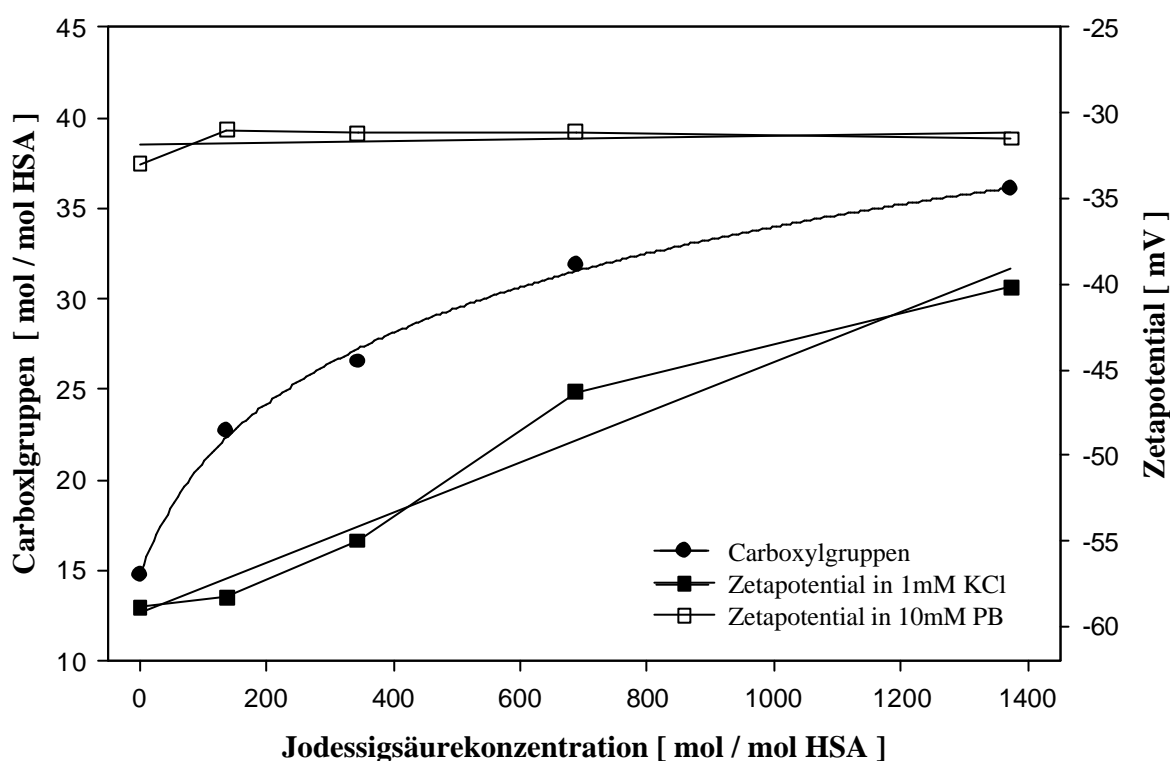
1997). So reagieren wie bereits in 2.3.3.4 beschrieben, bei pH-Werten  $> 2$  Methionylreste, bei  $\text{pH} > 5$  Histidinreste, bei  $\text{pH} > 7$  Aminogruppen und bei  $\text{pH} > 9$  zusätzlich phenolische Gruppen. Durch die Umsetzung der Nanopartikel in neutralem und in stark alkalischem Milieu sollte die Partikeloberfläche also in unterschiedlichem Ausmaß mit Jodessigsäure reagieren.

Die Maskierung der Aminogruppen mit Acetanhydrid sollte durch die Überführung der Aminofunktionen in Amidbindungen zu einer deutlichen Reduktion der Oberflächenladung führen. Doch wie die Ergebnisse in Tabelle 12 zeigen, stieg das Zetapotential in Abhängigkeit vom Medium im Vergleich zu unmodifizierten HSA-Nanopartikeln sogar sehr deutlich an. Diese Veränderung des Zetapotentials weist eindeutig auf eine Modifikation der Oberfläche hin, auch wenn sich das Zetapotential nicht in der erwarteten Weise veränderte. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Umsetzung mit den anderen Reagenzien (siehe Tabelle 12). Die Modifikation mit Bernsteinsäureanhydrid, DTPA-Anhydrid und Jodessigsäure sollte neben der Maskierung der Aminogruppen durch die Einführung weiterer Carboxylgruppen im Vergleich zu Acetanhydrid zu einer stärker ausgeprägten Reduktion des Zetapotentials führen. Die erwartete Reduktion des Zetapotentials durch Einführung carboxylgruppenhaltiger Reste an die Aminofunktionen ließ sich jedoch lediglich für die Modifikation mit DTPA- und Bernsteinsäureanhydrid in 1mM KCl-Lösung zeigen. Bei den übrigen Modifikationen kam es trotz der Einführung von Carboxylgruppen oder der alleinigen Maskierung der Aminogruppen wie im Fall des Acetanhydrids sogar zu einem Anstieg des Zetapotentials.

Um zu überprüfen, ob bei der Modifikation mit Jodessigsäure tatsächlich eine Einführung von Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche statt fand, wurden die COOH-Gruppen quantitativ bestimmt. Das Ergebnis in Abbildung 56 zeigt, daß die Umsetzung unter alkalischen Bedingungen mit steigenden Jodessigsäurekonzentrationen zu einer stetigen Zunahme des Carboxylgruppengehaltes führte. Statt einer Reduktion des Zetapotentials sieht man aber auch hier mit zunehmender Jodessigsäurekonzentration eine stetige Zunahme des Zetapotentials in 1mM KCl-Lösung. In Phosphatpuffer pH 7,0 dagegen änderte sich das Zetapotential nicht. Dieses

Phänomen wird allein auf eine Überkompensation der Carboxylgruppen, also auf die Anlagerung von Gegenionen aus dem Medium zurückzuführen sein, die sich um so stärker an der Scherebene der Partikel aufhalten, je stärker die Oberflächenladung des Partikels ist.

Abbildung 56: Abhängigkeit der Anzahl freier Carboxylgruppen und des Zetapotentials von der eingesetzten Jodessigsäurekonzentration bei der Modifikation von HSA-Nanopartikeln



Da zu einer weiteren Verwendung des Trägersystems die Einführung von Thiolgruppen an der Partikeloberfläche von Bedeutung ist und eine Thiolierung der Jodessigsäure (JE)-modifizierten Partikeloberfläche mit Trauts Reagenz aufgrund der Maskierung der Aminogruppen problematisch sein könnte, wurden zur Klärung dieser Frage die Partikel mit Trauts Reagenz umgesetzt (Umsetzung siehe 3.2.5.4), und die Aminogruppen in Abhängigkeit vom Ausmaß der Modifikation bestimmt.

Die Anzahl der eingeführten SH-Gruppen nahm mit steigendem Carboxylgruppengehalt deutlich auf nahezu Null ab, wie in Tabelle 13 dargestellt. Doch auch die Umsetzung mit NaOH scheint die Oberfläche der Partikel so zu



verändern, daß die Thiolierung mit Trauts Reagenz im Vergleich zu reinen HSA-Partikeln erheblich vermindert wird. Worauf dies zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Experimente nicht geklärt werden.

Tabelle 13: Einführung von Thiolgruppen mit Trauts Reagenz an mit Jodessigsäure (JE) unter alkalischen Bedingungen modifizierte HSA-Nanopartikel

HSA-Nanopartikel modifiziert mit:	COOH-Gruppen [mol/mol HSA]	SH-Gruppen nach Thiolierung [ mol/mol HSA ]
unmodifiziert	19,5	14,5
1 N NaOH	14,7	4,3
137 mol JE/mol HSA	22,7	1,5
343 mol JE/mol HSA	26,5	1,2
687 mol JE/mol HSA	31,9	0,7
1373 mol JE/mol HSA	36,1	0,4

### 4.3.3 Einfluß der Oberflächenmodifikation auf die Zelladhäsion

Zellmembranen weisen durch ihren hohen Anteil an Phospholipiden eine negative Ladung auf. Da HSA-Nanopartikel in Zellkulturmedium ein negatives Zetapotential besitzen (siehe Tabelle 12), erscheint die Adhäsionsneigung der HSA-Nanopartikel gering. Zellkulturexperimente dagegen zeigten, daß reine HSA-Nanopartikel sehr stark an Zellen adhärten, was zu Verklumpungen der Zellen und damit u.U. sogar zum Absterben der Zellen führte (siehe Abbildung 57). Eine mögliche Erklärung ist, daß negative große Moleküle und Partikel mit negativen Oberflächen durch Ladungsverschiebung und Dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkungen miteinander interagieren können und es damit als Folge zu einer Adhäsion der HSA-Partikel an die Zellmembran kommt.

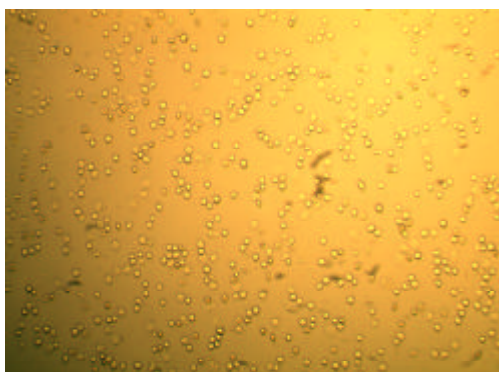
Um zu untersuchen, welche der Oberflächeneigenschaften die Zelladhäsion beeinflussen, wurden die verschieden oberflächenmodifizierten Nanopartikelpräparationen in einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  in-vitro mit frisch isolierten, primären humanen Lymphozyten (siehe 3.4.4.1) 1 h bei  $37^\circ\text{C}$

inkubiert und die Zelladhäsion der Partikel nach 5-fachem Waschen sowohl im Lichtmikroskop als auch im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Da HSA-Nanopartikel eine relativ starke Eigenfluoreszenz aufweisen, konnte hierbei auf ein Fluoreszenzlabel verzichtet werden.

### 4.3.3.1 Screening verschieden oberflächenmodifizierter HSA-Nanopartikel

Die Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen sind in Abbildung 57 dargestellt. Die mit EDC/Cystamin-modifizierten Partikel zeigten die mit Abstand am stärksten ausgeprägte Zelladhäsion. Deutlich sind hier große Bereiche von Zellaggregation zu erkennen, was auch auf eine erhebliche Anzahl toter Zellen schließen läßt. Da das Zetapotential dieser Präparation in Zellkulturmedium durch die Anlagerung von Medium-Proteinen negativ ist (siehe Tabelle 12), kann diese Verklumpung nicht auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativen Zellmembran und positiv geladenen Partikeln zurückgeführt werden. Außerdem weisen Gelatine A-Nanopartikel, die nahezu keine Zelladhäsion zeigten (siehe Abbildung 57), in 1mM KCl-Lösung ein Zetapotential von  $-0,2$  mV auf. Das Zetapotential allein kann also nicht ausschlaggebend für die Zelladhäsion sein. Da Aminogruppen für die Zellbindung der Partikel von Bedeutung sind, liegt der Schluß nahe, daß die Anzahl dieser funktionellen Gruppen für die starke Zelladhäsion verantwortlich ist.

Abbildung 57: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen von Lymphozyten-Suspensionen, die mit verschiedenen oberflächenmodifizierten Partikelpräparationen bei einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  1h inkubiert wurden



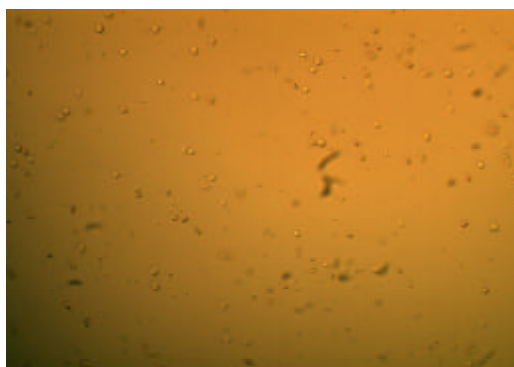
Durchlicht



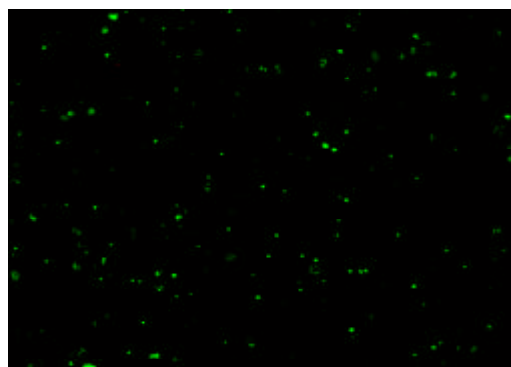
Fluoreszenz

Lymphozytenkontrolle

Fortsetzung Abbildung 57

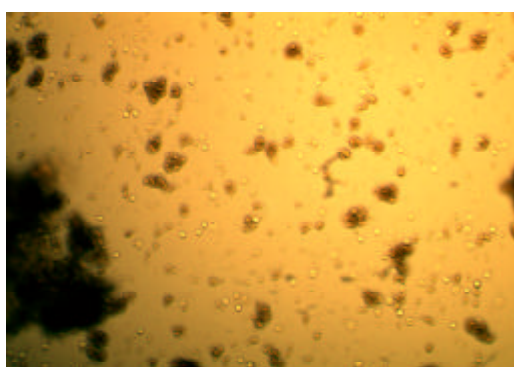


Durchlicht



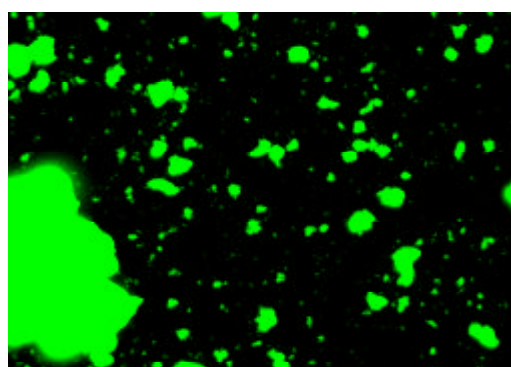
Reine HSA-NP

Fluoreszenz

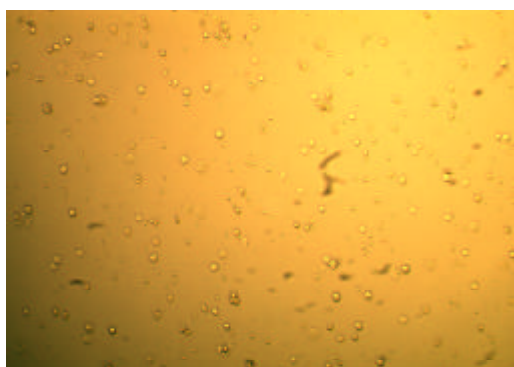


Durchlicht

HSA-NP mit EDC/Cystamin

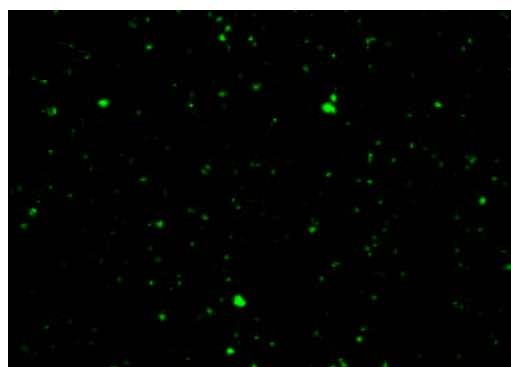


Fluoreszenz

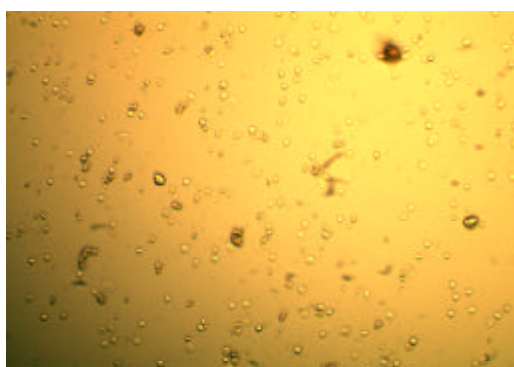


Durchlicht

HSA-NP mit EDC/PEG 400

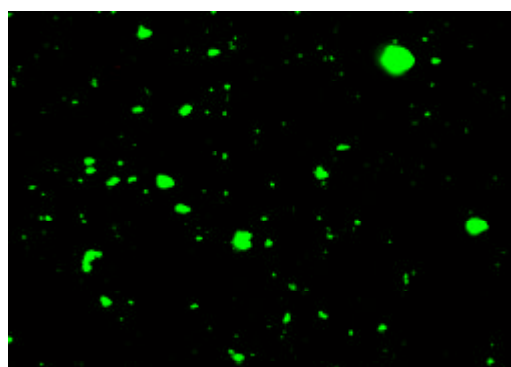


Fluoreszenz



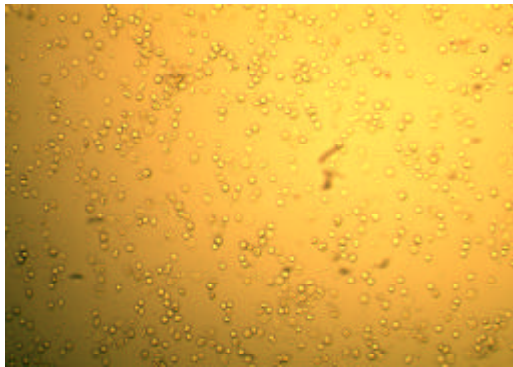
Durchlicht

HSA-NP mit Acetanhydrid



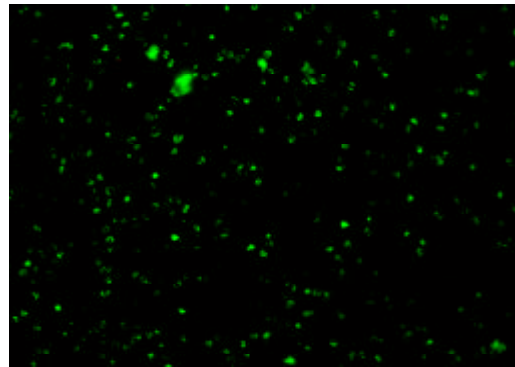
Fluoreszenz

Fortsetzung Abbildung 57

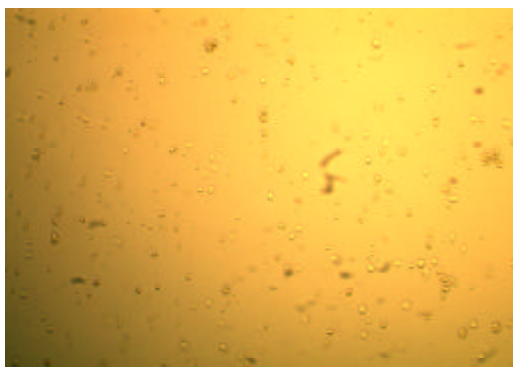


Durchlicht

HSA-NP mit Bernsteinsäureanhydrid

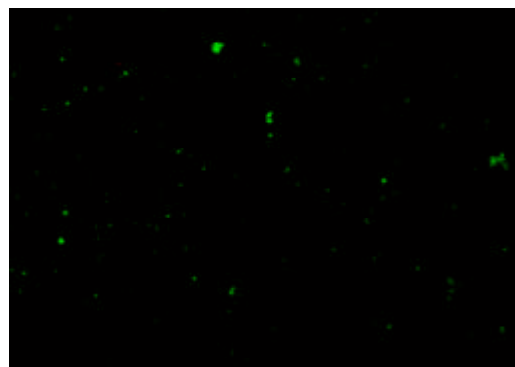


Fluoreszenz

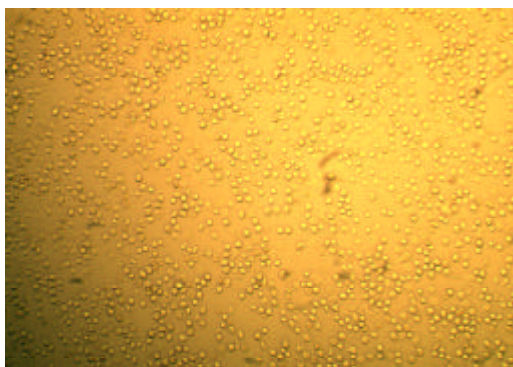


Durchlicht

HSA-NP mit DTPA-Anhydrid



Fluoreszenz

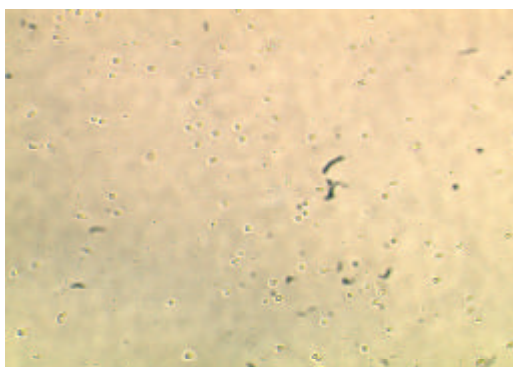


Durchlicht

HSA-NP mit Jodessigsäure



Fluoreszenz



Durchlicht

Gelatine-NP



Fluoreszenz

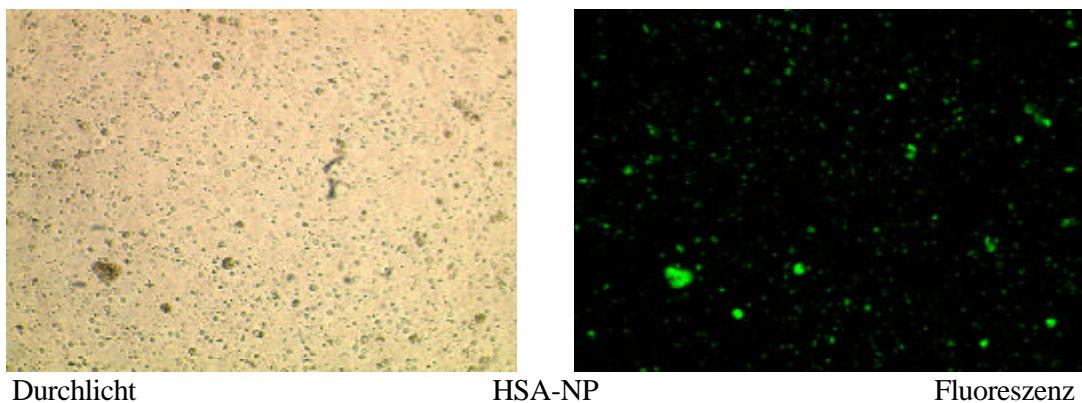
Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, daß Gelatine-A-Nanopartikel deutlich weniger freie Aminogruppen an ihrer Oberfläche aufweisen als HSA-Nanopartikel (siehe 4.1.2.5). Auch weisen die extrem adhäsiven EDC/Cystamin-modifizierten Partikel im Vergleich zu unmodifizierten Nanopartikeln durch die Bindung des Diamins Cystamin deutlich mehr Aminogruppen auf.

Abbildung 57 zeigt für die übrigen Zubereitungen mit maskierten Aminogruppen eine wesentlich niedrigere Fluoreszenz und damit niedrigere Zelladhäsion. Besonders hebt sich hierbei die Partikelpräparation hervor, die in alkalischem Milieu mit Jodessigsäure umgesetzt wurde. Hier ist annähernd keine Fluoreszenz zu erkennen und die Zellen sind morphologisch in guten Zustand, was auf eine gute Verträglichkeit der Partikel schließen läßt. Die übrigen Aminogruppen-maskierten Zubereitungen zeigen eine im Vergleich zu den reinen HSA-Partikeln niedrigere, doch immer noch deutlich erkennbare Adhäsion.

#### 4.3.3.2 Jodessigsäure-modifizierte HSA-Nanopartikel

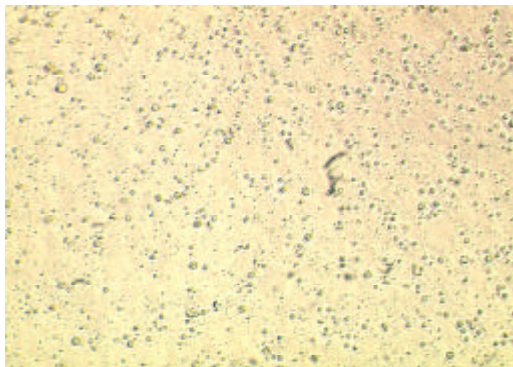
Da die Ergebnisse der im alkalischen Milieu umgesetzten Jodessigsäure-Präparationen sehr vielversprechend waren, wurde die Abhängigkeit der Zelladhäsion von der bei der Umsetzung verwendeten Jodessigsäurekonzentration untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 58 dargestellt.

Abbildung 58: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen von Lymphozyten-Suspensionen, die mit modifizierten HSA-Nanopartikeln in einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  1h inkubiert wurden

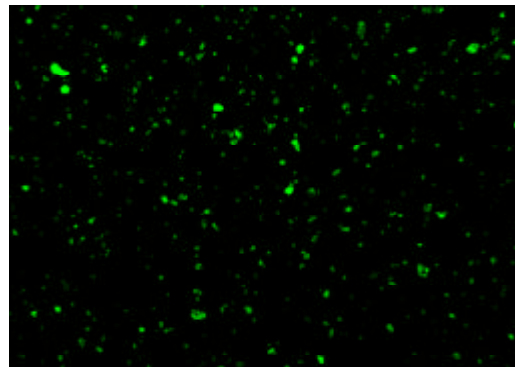




Fortsetzung Abbildung 58

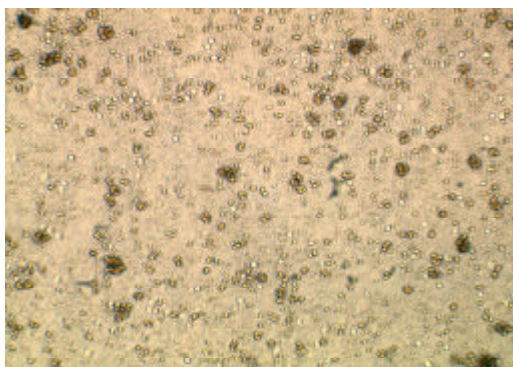


Durchlicht

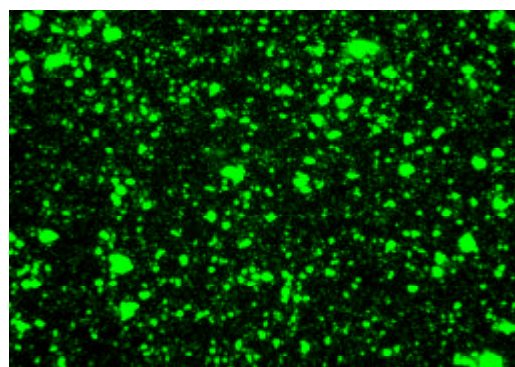


Fluoreszenz

HSA-NP mit NaOH

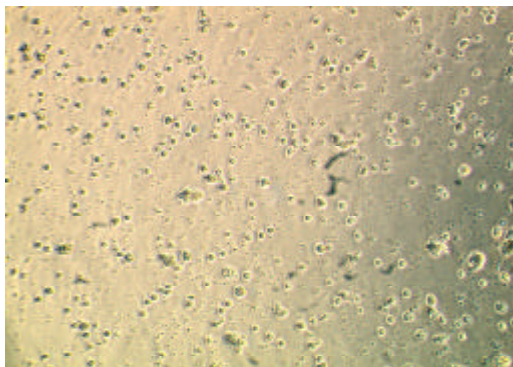


Durchlicht

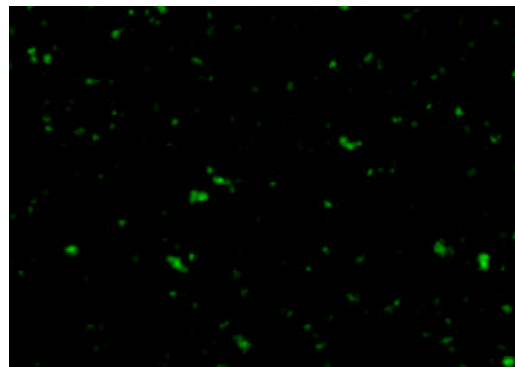


Fluoreszenz

HSA-NP mit EDC/Cystamin

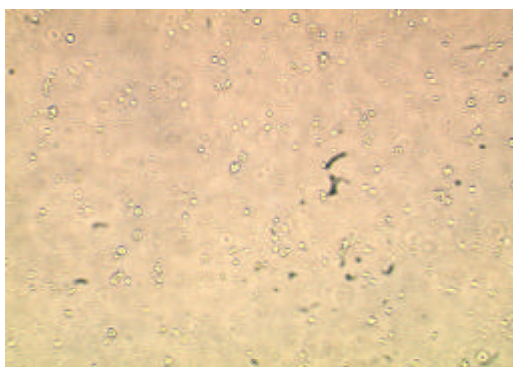


Durchlicht

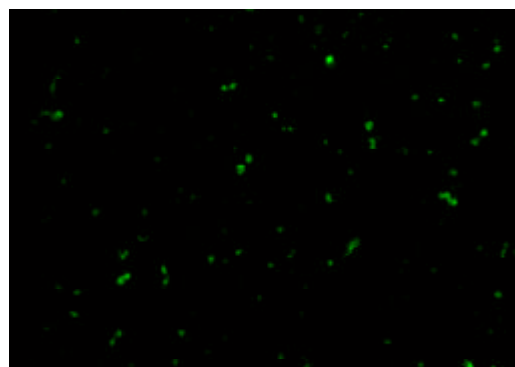


Fluoreszenz

HSA-NP mit 20µL Jodessigsäure



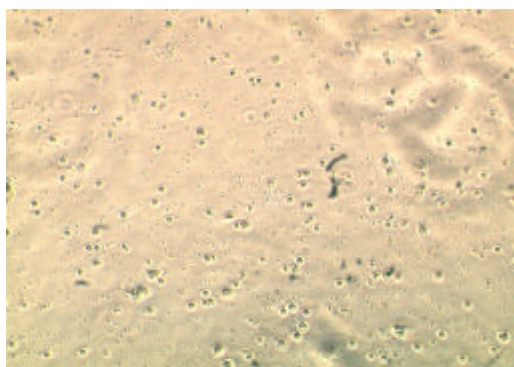
Durchlicht



Fluoreszenz

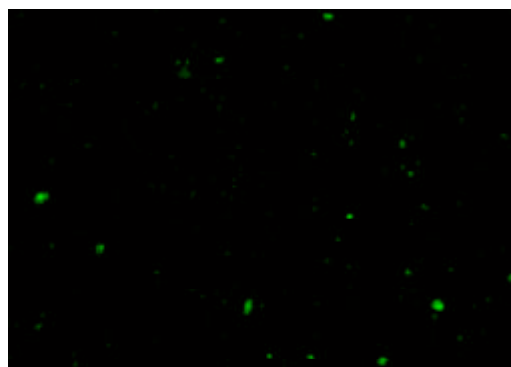
HSA-NP mit 50µL Jodessigsäure

Fortsetzung Abbildung 58

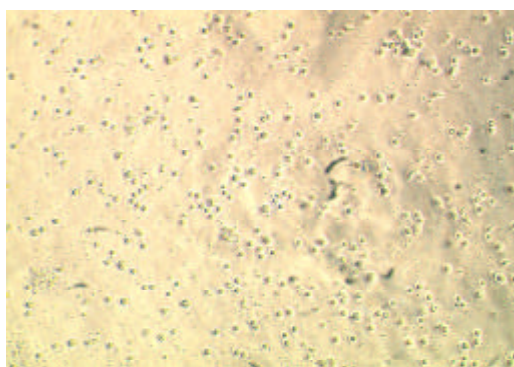


Durchlicht

HSA-NP mit 100µL Jodessigsäure

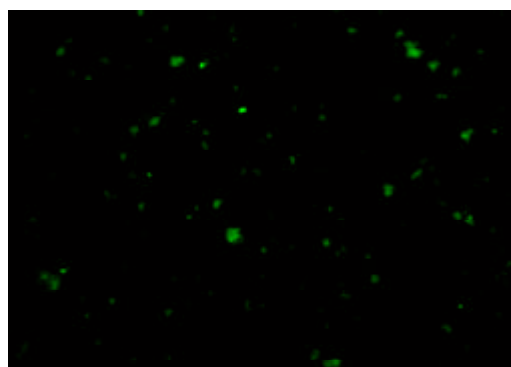


Fluoreszenz

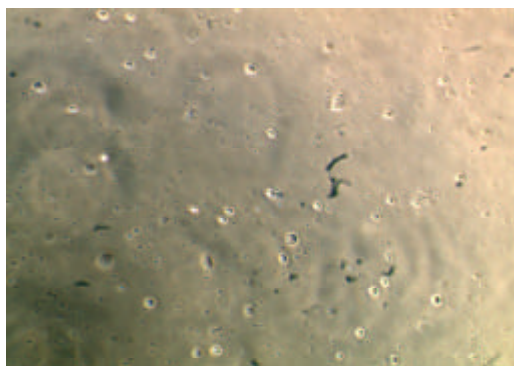


Durchlicht

HSA-NP mit 200µL Jodessigsäure

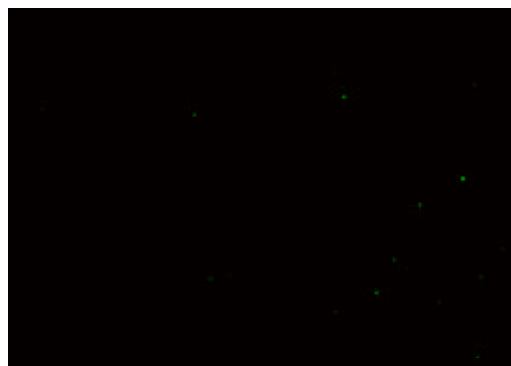


Fluoreszenz



Durchlicht

HSA-NP mit 200µL Jodessigsäure 0,1mg NP/mL

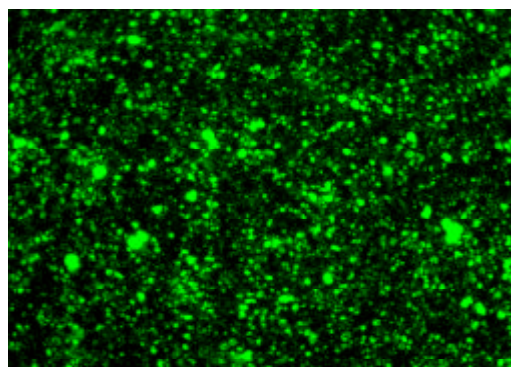


Fluoreszenz

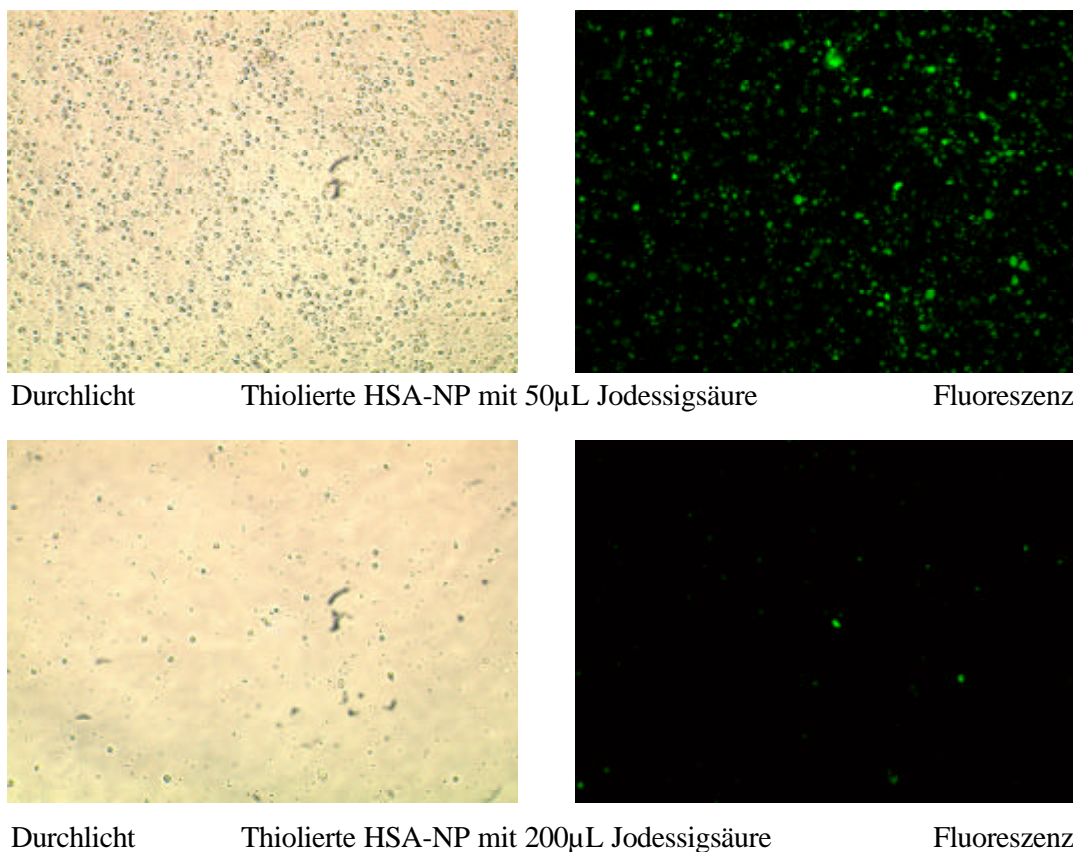


Durchlicht

Thiolierte reine HSA-NP



Fluoreszenz



Als Negativkontrolle dienten auch hier die EDC/Cystamin-modifizierte Partikel. Die Lymphozytenleerkontrolle kann Abbildung 57 entnommen werden. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzerscheinungen mit steigender Zahl eingeführter Carboxylgruppen. Berücksichtigt werden sollten bei der Betrachtung die stark schwankenden Zellzahlen.

Durch die Thiolierung scheint die Zelladhäsion wieder anzusteigen. Die Abnahme der Fluoreszenz bei den mit den thiolierten Partikeln inkubierten Zellen nimmt auch hier mit zunehmender Jodessigsäuremodifikation ab. Doch dies ist wohl eher auf eine mit zunehmender Jodessigsäuremodifikation abnehmende Thiolierung (siehe Tabelle 13) zurückzuführen, als auf den Einfluß der Jodessigsäuremodifikation. Die Oberflächenmodifikation der HSA-Partikel durch ausschließliche Behandlung mit NaOH, die sich wie in 4.3.3.2 beschrieben, in einer Veränderung des Zetapotentials und einer Verminderung der reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken mit DTT an der Partikeloberfläche bemerkbar machte, verminderte die Zelladhäsion nicht.



Die Zelladhäsion ist also stark von den Oberflächeneigenschaften der eingesetzten Partikelpräparation abhängig. Je stärker ausgeprägt die Oberflächenmodifikation ist, desto unterschiedlicher ist auch die Zelladhäsion. Aus den Abbildungen kann geschlossen werden, daß die Zelladhäsion umso stärker ist, je mehr Aminogruppen auf der Partikeloberfläche verfügbar sind. Ähnliches gilt für die Einführung von Thiolgruppen. Umgekehrt führt eine Maskierung der Aminogruppen zu einer deutlich verminderten Zelladhäsion.

## **4.4 Bindung funktioneller Proteine an die Partikeloberfläche**

Nach der Evaluierung der Herstellungsmethode, der Charakterisierung des resultierenden nanopartikulären Systems und der Oberflächenmodifikation folgte die Bindung verschiedener Proteine an die Partikeloberfläche. Zunächst wurden die Bindungsparameter mit Modellproteinen evaluiert, um anschließend zeigen zu können, daß die kovalente Bindung eines funktionellen Proteins wie beispielsweise eines Enzyms unter Erhalt der Funktionalität an das Trägersystem möglich ist. Als heterobifunktionaler Crosslinker zur Bindung der funktionellen Proteine wurde Sulfo-MBS gewählt.

### **4.4.1 Evaluierung der Sulfo-MBS-Bindung von Modellproteinen**

Sulfo-MBS ist ein heterobifunktionaler Crosslinker, der zum einen eine selektive Bindungsstelle für SH-Gruppen, zum anderen eine selektive Bindungsstelle für Aminogruppen aufweist. Über diesen Crosslinker sollten nun Proteine unter Erhalt ihrer Funktionalität an die SH-modifizierten Nanopartikel gebunden werden. Die Evaluierung der Sulfo-MBS-Bindung wurde hinsichtlich der Bindungsparameter wie Sulfo-MBS-Konzentration, pH-Wert, Aktivierungszeit sowie der Konzentration und der Größe des zu bindenden Proteins untersucht. Auch die Abhängigkeit der Bindungsrate von den Eigenschaften des Partikelsystems wurde berücksichtigt.

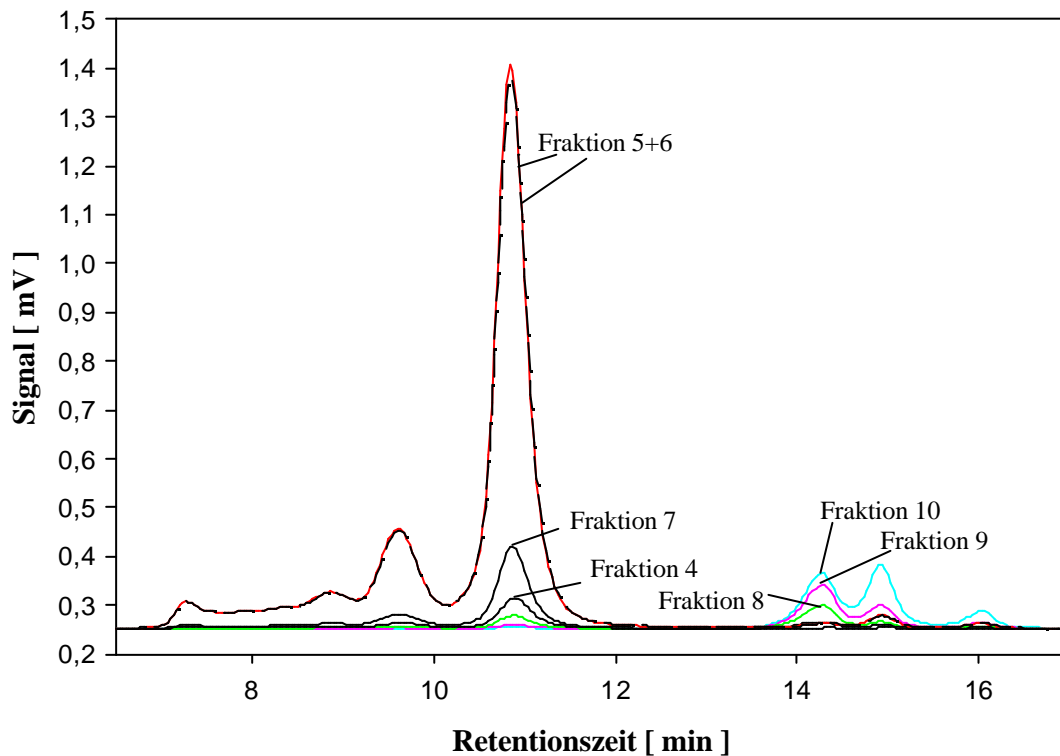
Die Quantifizierung der Bindung erfolgte sowohl mit Gelpermeationschromatographie (GPC) als auch direkt spektralphotometrisch bei 279 nm. Da die Auswertung der

Gelpermeationschromatographie mit einer Detektion bei 279 nm zu vergleichbaren Ergebnissen wie die direkte photometrische Bestimmung bei dieser Wellenlänge führte, wurden zur Auswertung der folgenden Untersuchungen lediglich die Daten der spektralphotometrischen Analytik herangezogen.

#### 4.4.1.1 Evaluierung der größenaußschlußchromatographischen Aufreinigung aktivierter Proteine am Beispiel des HSAs

Zwischen der Aktivierung eines Proteins mit Sulfo-MBS und der Bindung des aktivierten Proteins an SH-modifizierte Nanopartikel mußte das jeweilige aktivierte Protein aufgereinigt werden, um freies, nicht abreagiertes Sulfo-MBS abzutrennen. Das freie Sulfo-MBS hätte andernfalls mit den SH-Gruppen an der Nanopartikeloberfläche reagieren können und damit eine Bindung des aktivierten Proteins mit den Partikeln behindern oder im äußersten Fall sogar unterbinden können.

Abbildung 59: Evaluierung der Säulenaufreinigung von mit Sulfo-MBS-aktiviertem HSA unter Anwendung der Gelpermeationschromatographie



Zur Charakterisierung der Säulenreinigung wurde HSA mit Sulfo-MBS aktiviert und über eine D-Salt™-Größenausschlußsäule aufgereinigt. Das Eluat der Säule wurde in Fraktionen von 0,5 mL aufgefangen und mittels GPC auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Als Modellprotein wurde zunächst HSA verwendet. Die Chromatogramme in Abbildung 59 zeigen, daß Fraktion 4 bereits einen geringen Anteil Protein enthielt und die Fraktionen 5 und 6 den Hauptanteil des aktivierten Proteins beinhalteten. Ab Fraktion 7 nahm der Proteingehalt stark ab. In den Fraktionen 8 bis 10 war bereits eine deutliche Zunahme des niedermolekularen Sulfo-MBS erkennbar. Aus diesem Grund wurden generell nur die Fraktionen 5 und 6 aufgefangen, vereinigt und zur Kopplung an das thiolierte Trägersystem verwendet.

#### **4.4.1.2 Bindung von HSA als Modellprotein**

Um die Bindungsparameter der kovalenten Bindung von Proteinen an HSA-Nanopartikel mit Hilfe des heterobifunktionalen Crosslinkers Sulfo-MBS zu evaluieren, wurden zunächst Bindungsstudien mit einem Modellprotein bekannter Struktur durchgeführt. Da viele Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit HSA durchgeführt wurden, HSA eine definierte Struktur aufweist und von der molekularen Dimension im Bereich der später verwendeten Enzyme und Antikörper liegt, wurde auch hier HSA als Modellprotein gewählt.

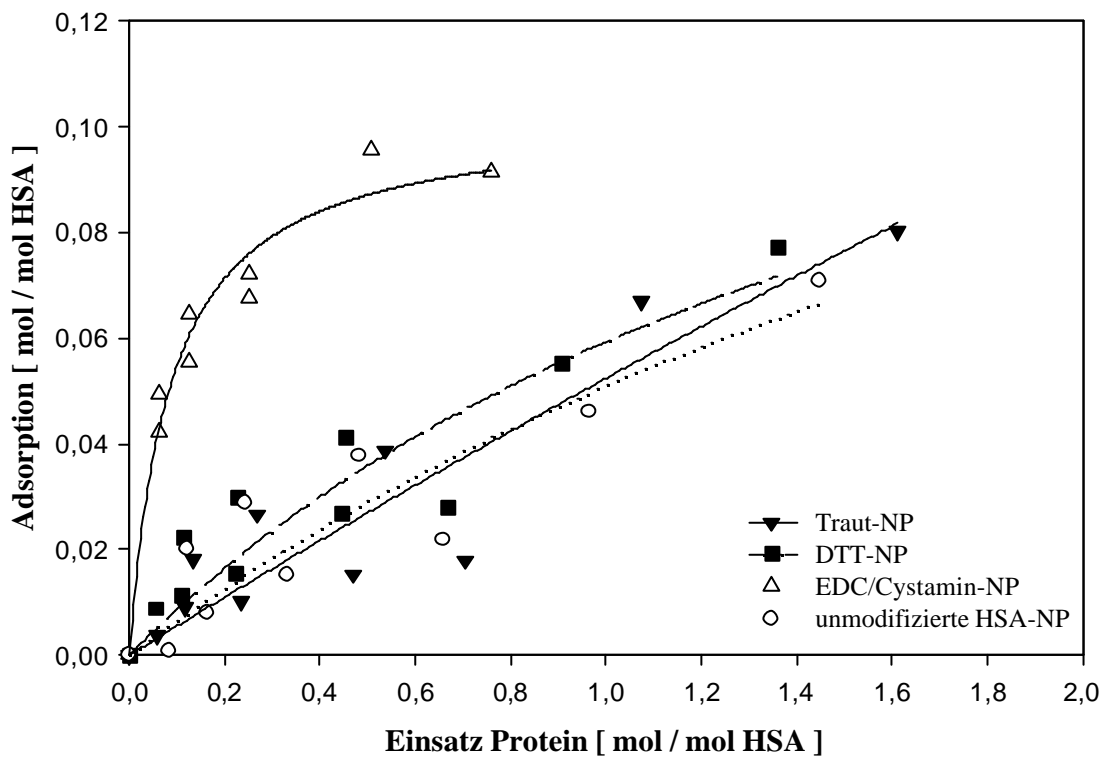
##### *4.4.1.2.1 Adsorptionsisothermen von HSA an SH-modifizierte HSA-Nanopartikel*

HSA hat im Körper unter anderem die Funktion der Adsorption verschiedenster gelöster Blutbestandteile, so daß bei HSA-Nanopartikeln mit einer nicht zu vernachlässigenden Adsorption der gelösten Proteine an die Partikeloberfläche zu rechnen ist. Nach Norde et al. (1987) werden sich in den gängigen Konzentrationsbereichen lediglich dicht gepackte Monolayer und keine Multilayer ausbilden. Durch die Adsorption des HSAs an eine Partikeloberfläche verändert sich die Struktur des HSAs: Im Vergleich zum nativen HSA wird der Anteil an helikaler Struktur um 20-30 % erniedrigt, wobei die Strukturveränderung unabhängig vom Sorbens ist (Norde et al. 1987). Dieser Aspekt mag für die adsorptive Bindung

funktioneller Proteine von Bedeutung sein, die nach der adsorptiven Bindung aufgrund einer Strukturveränderung in ihrer Funktionalität eingeschränkt sein können.

Um eine durch die Adsorption vorgetäuschte zu hohe kovalente Bindung zu ermitteln, wurden die Adsorptionsisothermen des nichtaktivierten HSAs an die Nanopartikel bestimmt. Da auch die SH-Modifikation einen Einfluß auf die Adsorptionsrate haben könnte, wurden die Isothermen des nichtaktivierten HSAs an Traut-Nanopartikel, an EDC/Cystamin-Nanopartikel und an DTT-Nanopartikel sowie die des aktivierten HSAs an unmodifizierte HSA-Nanopartikel bestimmt. Die Adsorptionsisothermen an vier verschiedene Partikelspezies sind in Abbildung 60 dargestellt.

Abbildung 60: Graphische Darstellung der Adsorptionsisothermen von gelöstem HSA an verschieden SH-modifizierte HSA-Nanopartikel



Wie von Norde et al. (1987) beschrieben, stellen die Adsorptionsisothermen von globulären Proteinen, zu denen auch das HSA zählt, keine high-affinity-Isothermen dar, sondern zeigen zu Beginn lediglich eine begrenzte Steigung. Die Adsorption an Traut-Nanopartikel und DTT-Nanopartikel ist mit der Adsorption des aktivierten HSAs an unmodifizierte Nanopartikel vergleichbar. Die EDC/Cystamin-Partikel

dagegen zeigen aufgrund ihrer positiven Oberflächenladung (siehe 4.3.1.2) eine signifikant höhere Adsorptionsneigung gegenüber dem unter neutralen Bedingungen negativ geladenen HSA (IEP  $\approx$  5,3; Carter and Ho 1994).

Aus den Regressionskurven ergeben sich die in Tabelle 14 dargestellten Gleichungen für die Adsorption, die in den folgenden Kapiteln als Grundlage für die Berechnung der Adsorption bei der jeweiligen Konzentration verwendet wurden.

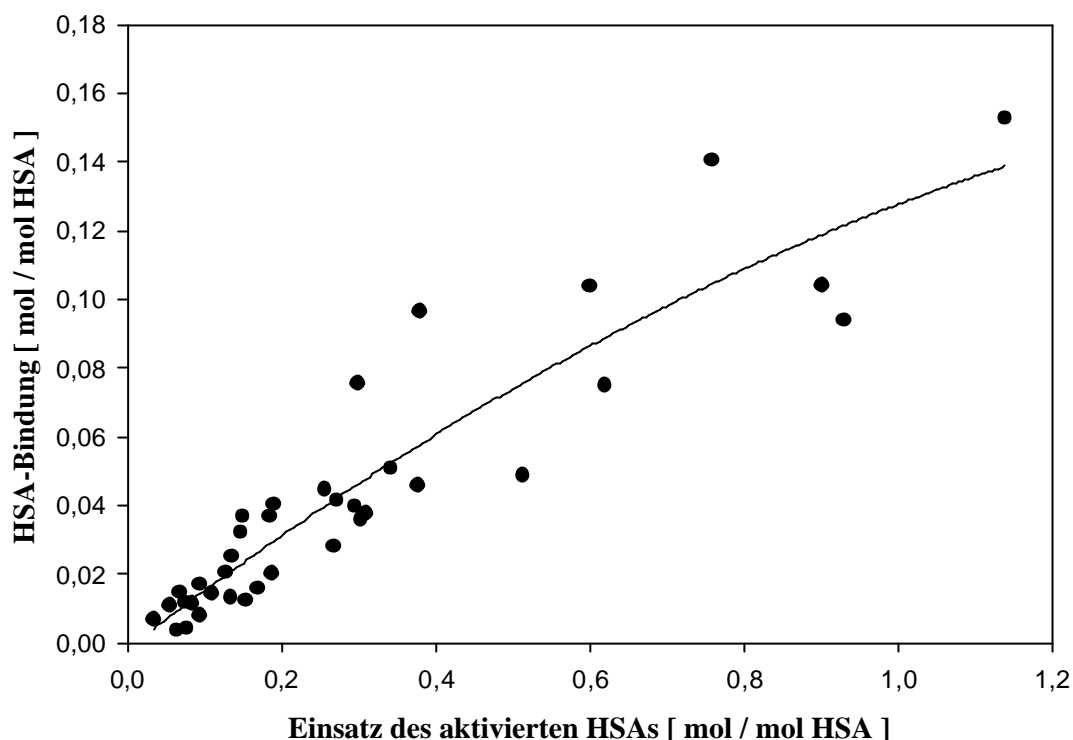
Tabelle 14: Mathematische Darstellung der Adsorptionsisothermen des HSAs an verschieden SH-modifizierte HSA-Nanopartikel

Korrelationsfunktion	$y = \frac{a \cdot x}{1 + b \cdot x}$	$y = \text{Adsorption [mol/mol]}$ $x = \text{Proteineinsatz [mol/mol]}$	
	a	b	r <sup>2</sup>
Traut-HSA-NP	0,0548	0,0584	0,8546
DTT-HSA-NP	0,0907	0,5285	0,8554
EDC/Cystamin-HSA-NP	1,2720	13,1800	0,9443
unmodifizierte HSA-NP	0,0620	0,3187	0,8310

#### 4.4.1.2.2 Einfluß der HSA-Konzentration auf die Bindungsrate

Die Bindungsrate des mit Sulfo-MBS-aktivierten HSAs an SH-modifizierte Nanopartikel ist wie die Adsorption deutlich abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Abbildung 61 stellt die Bindung an Traut-Nanopartikel graphisch dar. Die Berechnung der Bindung wurde um den adsorptiv gebundenen Anteil gemäß 4.4.1.2.1 korrigiert. Die Graphik zeigt, daß durch den Einsatz höherer Konzentrationen des aktivierten HSAs durchaus noch höhere Bindungsraten zu erwarten sind. Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Abbildung 61: Einfluß der Konzentration des aktivierten HSAs auf die kovalente Bindung an durch Trauts Reagenz modifizierte HSA-Nanopartikel



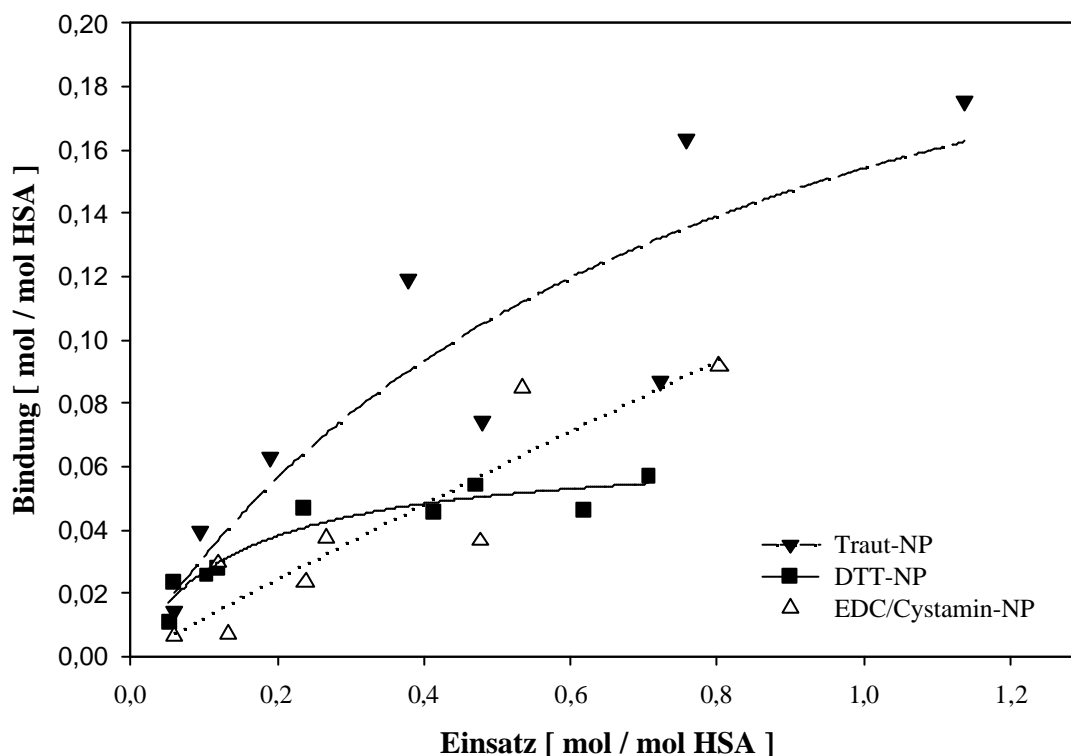
#### 4.4.1.2.3 Bindung von HSA an verschieden SH-modifizierte HSA-Nanopartikel

Da eine unterschiedliche Einführung der SH-Gruppen auch einen Einfluß auf das Bindungsverhalten des aktivierten HSAs haben könnte, wurden die Bindungsexperimente mit verschiedenen HSA-Konzentrationen an unterschiedlich modifizierten Partikelpräparationen durchgeführt. Verglichen wurden Traut-Nanopartikel, DTT-Nanopartikel und EDC/Cystamin-Nanopartikel. Die Graphik in Abbildung 62 zeigt eine deutlich stärkere Bindung des HSAs an Traut-Nanopartikel als an DTT- und EDC/Cystamin-modifizierte Partikel.

Die im Vergleich niedrige Bindungsrate der DTT-Partikel mag auf sterische Faktoren zurückzuführen sein, da bei der Spaltung der Disulfidbrücken der Partikelmatrix die SH-Gruppen direkt an der Partikeloberfläche eingeführt werden und somit aus sterischen Gründen für den Angriff des Sulfo-MBS schwer zugänglich sind. Der quantitative Nachweis von Thiolgruppen mit dem vergleichsweise kleinen Molekül DTNB (Ellmans Reagenz) dagegen ist problemlos möglich.

Bei der Modifikation mit EDC/Cystamin wird ein dem Trauts Reagenz entsprechender Spacer eingeführt, was zu einer vergleichbaren Zugänglichkeit der SH-Gruppen führen sollte. Durch die vergleichsweise starken Adsorptionseffekte des HSAs an diese Partikel wird aber wahrscheinlich der Angriff des aktivierten HSAs erschwert und damit die kovalente Bindung zurückgedrängt. Die effektivste Methode zur kovalenten Kopplung von Sulfo-MBS-aktivierten Proteinen ist daher die Modifikation der Nanopartikel mit Trauts Reagenz.

Abbildung 62: Kovalente Bindung von Sulfo-MBS-aktiviertem HSA an verschieden SH-modifizierte HSA-Nanopartikel



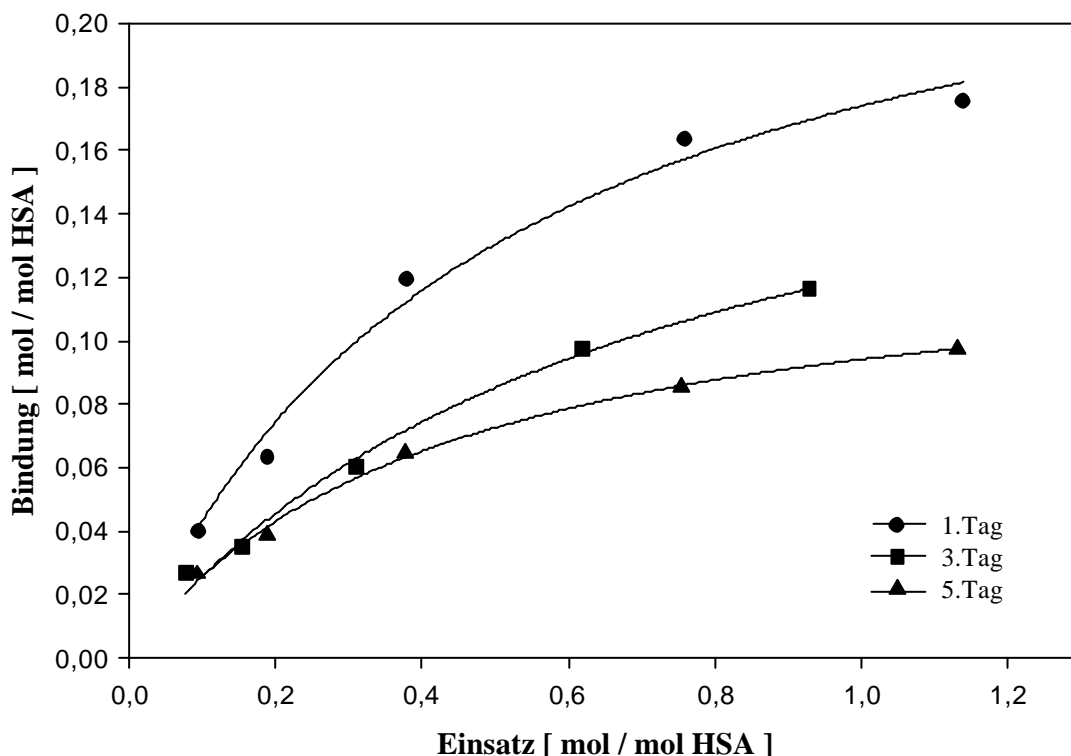
#### 4.4.1.2.4 Einfluß des Alters der SH-Modifikation auf die Bindungsrate

Der Abbau der Thiolgruppen über einen Zeitraum von 8 Wochen wurde bereits in 4.2.8 evaluiert. Doch da, wie im vorherigen Kapitel gezeigt, die Nachweisbarkeit von Thiolgruppen mit Ellmans Reagenz nicht automatisch mit deren Verfügbarkeit bei Kopplungsreaktionen gleichzusetzen ist, wurden die drei unterschiedlich SH-modifizierten Nanopartikelpräparationen im Abstand von mehreren Tagen unter

identischen Bedingungen mit Sulfo-MBS-aktiviertem HSA umgesetzt und die Bindungsraten verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abbildung 63 für Traut-Nanopartikel, in Abbildung 64 für DTT-Nanopartikel und in Abbildung 65 für EDC/Cystamin-Nanopartikel dargestellt.

Bei HSA-Nanopartikeln, die mit Trauts Reagenz modifiziert wurden, ist eine Reduktion der Bindungsrate im Verlauf von 5 Tagen deutlich erkennbar. Es ergab sich eine mittlere Abnahme über den gesamten Konzentrationsbereich von  $36,8 \pm 17,7 \%$  vom 1. auf den 3. Tag und eine mittlere Abnahme von  $30,8 \pm 15,8 \%$  vom 3. auf den 5. Tag. Der Verlust an Bindungsvermögen der thiolierten Partikel war also wesentlich stärker als der in 4.2.8 mit Ellmans Reagenz bestimmte Abbau der SH-Gruppen ausgeprägt.

Abbildung 63: Kovalente Bindung von Sulfo-MBS-aktiviertem HSA an Traut-Nanopartikel in Abhängigkeit der Lagerzeit der thiolierten Nanopartikel



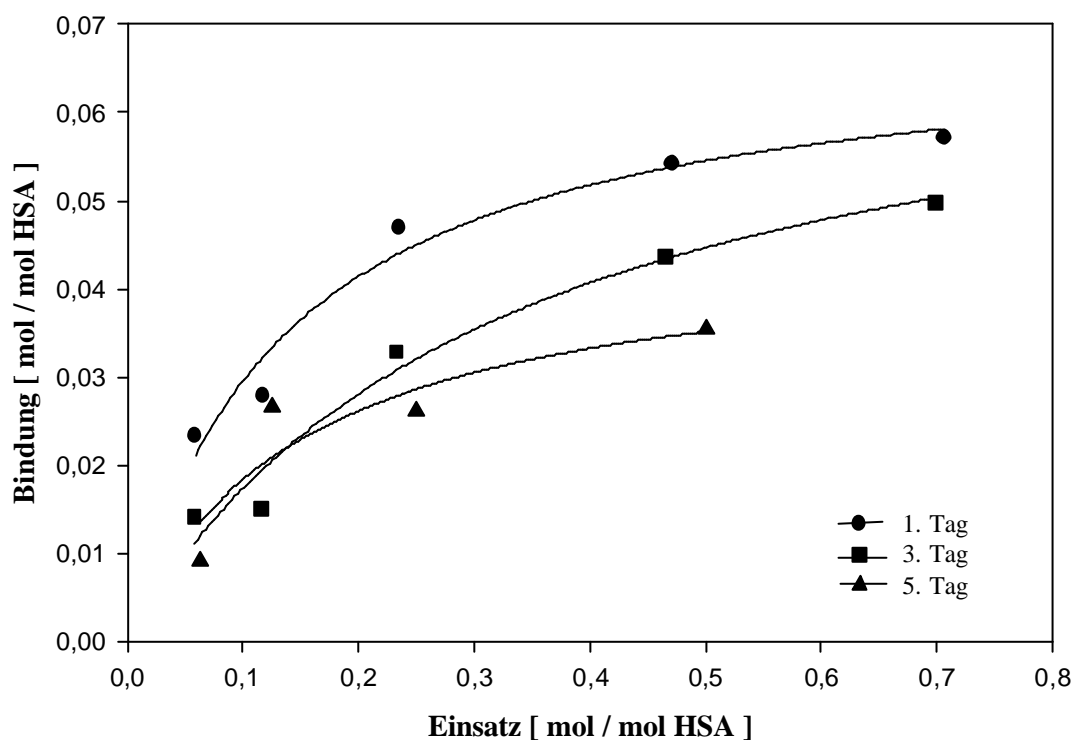
Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen ist die bevorzugte Degradation der außenliegenden und damit zugänglichsten Thiolgruppen, die auch primär für die



Kopplung des Sulfo-MBS-aktivierten HSAs benötigt werden. Die weiter innen liegenden Thiolgruppen scheinen geschützter zu sein und damit langsamer abgebaut zu werden, aber für eine Bindung größerer Moleküle wie Proteinen aus sterischen Gründen nicht mehr zur Verfügung zu stehen, wobei eine Erfassung mit Ellmans Reagenz dennoch möglich ist.

Ähnlich ist die Situation bei den DTT-Nanopartikeln (Abbildung 64). Hier war die Bindungsrate von Beginn an sehr niedrig (siehe 4.4.1.2.3), verringerte sich aber auch hier im Mittel um  $25,4 \pm 0,6$  % über zwei Tage, während die durch Ellmans Reagenz nachweisbaren SH-Gruppen wesentlich länger verfügbar waren.

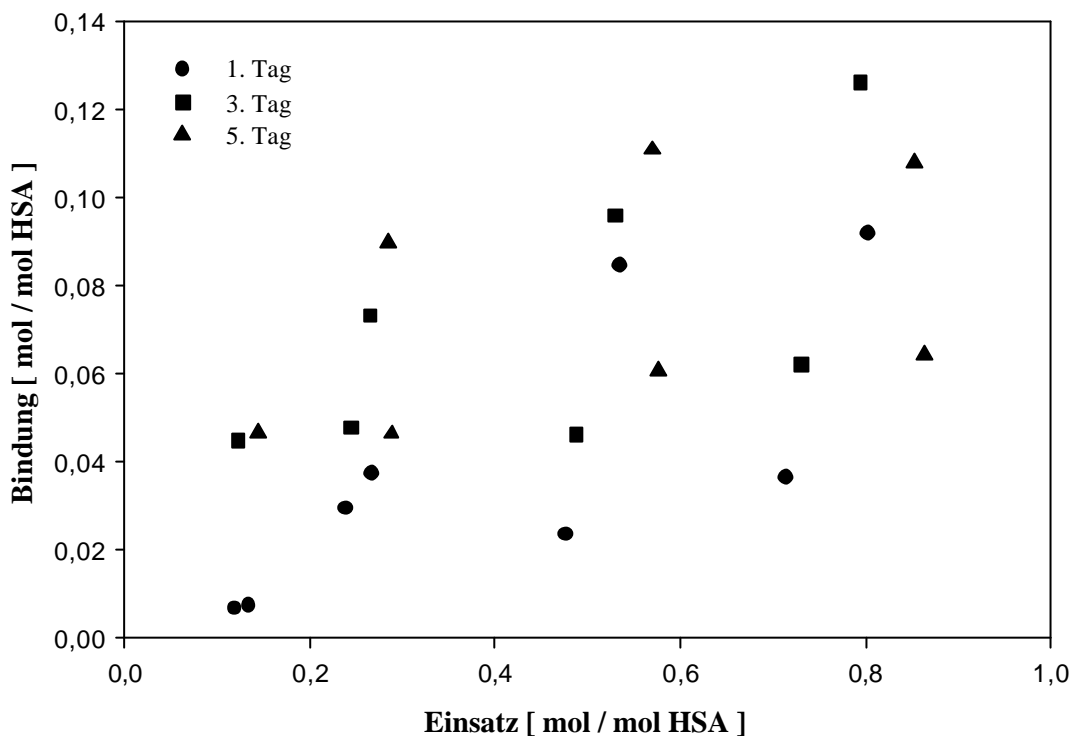
Abbildung 64: Kovalente Bindung von Sulfo-MBS-aktiviertem HSA an DTT-Nanopartikel in Abhängigkeit der Lagerzeit der thiolierten Nanopartikel



Anders verhält es sich bei den EDC/Cystamin-modifizierten Nanopartikeln (Abbildung 65). Hier ließ sich über die Dauer von 5 Tagen kein Abbau der Thiolgruppen hinsichtlich ihrer Bindungskapazität von aktiviertem HSA zeigen. Denkbar ist ein Schutz der kovalent gebundenen Thiolgruppen durch die großen Mengen an adsorbiertem HSA (siehe 4.4.1.2.1). Allerdings ist im Falle der

EDC/Cystamin-modifizierten Nanopartikel eine Aussage aufgrund der stark streuenden Werte problematisch.

Abbildung 65: Kovalente Bindung von Sulfo-MBS-aktiviertem HSA an EDC/Cystamin-Nanopartikel in Abhängigkeit der Lagerzeit der thiolierten Nanopartikel



#### 4.4.1.2.5 Einfluß des pH-Wertes auf die Bindungsrate

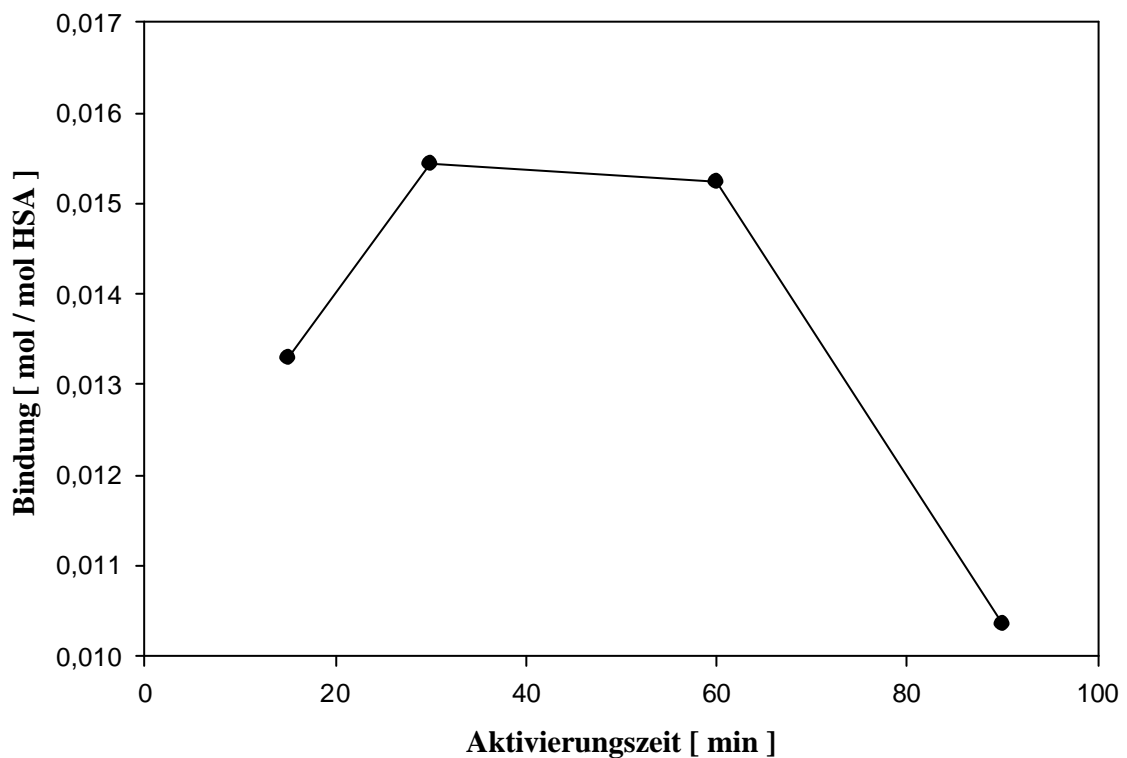
Die Bindungsversuche des Modellproteins HSA an SH-modifizierte HSA-Nanopartikel wurden sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 7,5 durchgeführt. Hintergrund dieser Evaluierung ist die pH-abhängige Stabilität der SH-reaktiven Maleinimidstruktur des Sulfo-MBS und zum anderen die pH-Abhängigkeit der Reaktion der NHS-Gruppe mit den primären Aminogruppen des Proteins. Die Aktivierung des Proteins sollte zwischen pH 7-9 durchgeführt werden, da hier die Reaktivität der aminoreaktiven NHS-Gruppe am stärksten ist. Andererseits sollte die Maleinimidstruktur bei pH-Werten von 6,5-7,0 gelagert werden, da hier die Stabilität am höchsten ist. Ein Vergleich der Bindungsraten zeigte jedoch keinerlei Einfluß des pH-Wertes im Bereich 6,5-7,5. Deswegen wurde für alle folgenden Untersuchungen pH 6,5 gewählt.

#### 4.4.1.2.6 Einfluß der Aktivierungszeit auf die Bindungsrate

Da die Maleimidstruktur in wäßrigen Lösungen nur sehr begrenzt stabil ist, muß die Aktivierung des zu koppelnden Proteins, also die Reaktion der NHS-Gruppierung des Sulfo-MBS mit den Aminofunktionen des Proteins rasch erfolgen. Um eine optimale Aktivierungsdauer zu ermitteln, wurde die Aktivierung zu verschiedenen Zeitpunkten abgebrochen und das aktivierte Protein an SH-modifizierte Partikel gebunden.

Das Ergebnis in Abbildung 66 zeigt, daß eine maximale Bindung bei Aktivierungszeiten zwischen 30 und 60 min zu erwarten ist. Bei längerer Aktivierungszeit zersetzt sich die Maleimidstruktur, und die Bindungsrate an das SH-modifizierte Trägersystem verringert sich. Für alle folgenden Versuche wurde deshalb die Aktivierungszeit auf 30-45 min festgelegt.

Abbildung 66: Einfluß der Aktivierungszeit von gelöstem HSA mit Sulfo-MBS auf die Bindung an mit DTT thiolierte HSA-Nanopartikel



#### 4.4.1.2.7 Einfluß der Sulfo-MBS-Konzentration auf die Bindungsrate

Für die Aktivierung durch Sulfo-MBS ist gemäß Arbeitsprotokoll des Anbieters ein 25-50-facher molarer Überschuß im Vergleich zum Protein vorgesehen. Zur Evaluierung dieses Parameters wurden Sulfo-MBS-Konzentrationen mit einem molaren Verhältnis von 26 bis 106 mol pro mol HSA eingesetzt. Ein Einfluß auf die Bindungsrate konnte aber nicht festgestellt werden, weshalb für alle folgenden Versuche Sulfo-MBS-Konzentrationen zwischen 26-50 mol pro mol HSA gewählt wurden.

#### 4.4.1.3 Bindung von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht

Zur Evaluierung der Bindungsparameter wurde auch der Einfluß des Molekulargewichtes des zu bindenden Proteins und damit der Protein- bzw. Molekülgröße auf die Bindungsrate untersucht.

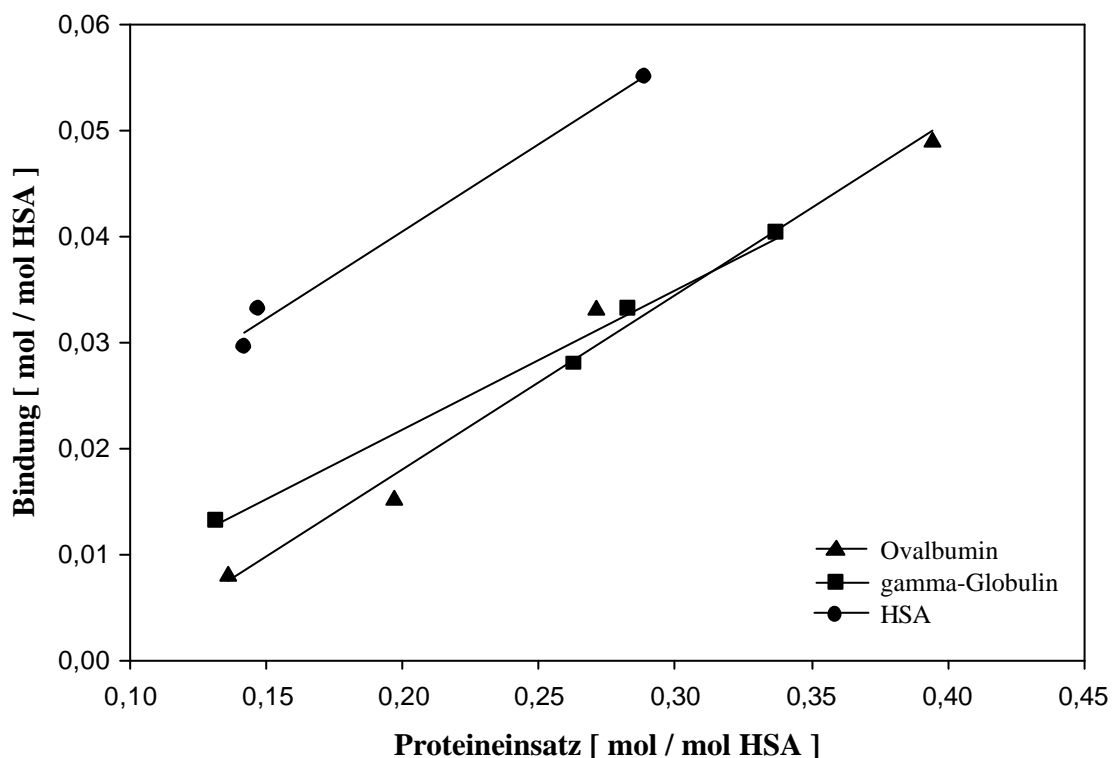
Tabelle 15: Adsorptionsverhalten von Ovalbumin und  $\gamma$ -Globulin an HSA-Nanopartikel

	Lineare Regression des Adsorptionsverhaltens		
	Achsenabschnitt	Steigung	Korrelation
Ovalbumin	0,0159	0,0622	0,9803
$\gamma$ -Globulin	0,0066	0,0320	0,9963

Ovalbumin mit einem Molekulargewicht von 44 kDa und  $\gamma$ -Globulin mit einem Molekulargewicht von 156 kDa wurden im Vergleich zu HSA (65 kDa) mit Sulfo-MBS bei verschiedenen Konzentrationen an Traut-Nanopartikel gebunden, sowie das Adsorptionsverhalten des nichtaktivierten Proteins an die SH-modifizierten Nanopartikel bestimmt. Die Ermittlung der Adsorptionsraten für Ovalbumin und  $\gamma$ -Globulin an Traut-Nanopartikel ergab in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1-0,4 mg Protein pro mg Nanopartikel einen annähernd linearen Zusammenhang, der in Tabelle 15 dargestellt ist.

Unter Berücksichtigung dieser und der für HSA an Traut-Nanopartikel ermittelten Adsorption (siehe 4.4.1.2.1) ergab sich für die kovalente Bindung der unterschiedlich großen Proteine das in Abbildung 67 dargestellte Bild. Die Bindungsrate des HSAs liegt folglich höher als die der anderen Proteine, was möglicherweise auf einen höheren Gehalt bzw. eine höhere Verfügbarkeit der Aminogruppen des HSAs zurückzuführen ist. Eine Abhängigkeit von der Molekülgröße bzw. dem Molekulargewicht ist nicht zu erkennen, da  $\gamma$ -Globulin mit seinem 3-fach höheren Molekulargewicht eine dem Ovalbumin vergleichbare molare kovalente Bindung aufweist.

Abbildung 67: Kovalente Bindung verschiedener Proteine an Traut-Nanopartikel in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinmenge



#### 4.4.2 Bindung von HSA mit verschiedenen Crosslinkern

Neben Sulfo-MBS werden noch eine Vielzahl anderer bifunktionaler Crosslinker angeboten, von denen hier nun einige im Vergleich zum Sulfo-MBS hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht werden sollten.

Die Strukturen der Reagenzien sind in Tabelle 16 dargestellt. Es wurden für die Bindungsstudie die gleichen molaren Verhältnisse der eingesetzten Reagenzien gewählt wie für die Sulfo-MBS-Bindungsversuche.

Tabelle 17 zeigt die Bindungsergebnisse des Experimentes. Deutlich ist zu sehen, daß unter den gegebenen Bedingungen die Crosslinker Sulfo-SMCC, DTBP und DTSSP zu wesentlich geringeren Bindungsraten führten als Sulfo-MBS. Bei den homobifunktionalen Crosslinkern ist die geringere Bindungsrate auf Nebenreaktionen zurückzuführen, die durch Quervernetzung sowohl der Partikel als auch der zu bindenden Proteine auftreten können.

Tabelle 16: Strukturen der eingesetzten Crosslinker

Struktur	Chemische Bezeichnung	Abkürzung	Molekulargewicht [ Da ]	Spacerlänge [ Å ]	Typ u. Reaktivität gegenüber -NH <sub>2</sub> -SH
	m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysulfosuccinimide	Sulfo-MBS	416,2	9,9	x x heterobifunktional
	Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat	Sulfo-SMCC	436,4	11,6	x x heterobifunktional
	Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidat x2 HCl	DTBP	309,3	11,9	x homobifunktional
	3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat]	DTSSP	608,5	12,0	x homobifunktional
	Sulfosuccinimidyl 2-[m-azido-o-nitro-benzamido]ethyl-1,3'-dithiopropionat	SAND	570,5	18,5	x heterobifunktional

Die niedrigeren Bindungsraten des Sulfo-SMCC sind möglicherweise auf unzureichend evaluierte Reaktionsbedingungen zurückzuführen. Lediglich der photoreaktive Crosslinker SAND konnte mit Sulfo-MBS vergleichbare Bindungsraten erzielen. Ein prinzipieller Vorteil des SANDs liegt darin, daß eine Einführung von SH-Gruppen und damit eine Oberflächenmodifikation der Nanopartikel nicht notwendig ist, da beide Endgruppen des Spacers aminoreaktiv sind. Durch die Einführung einer photoreaktiven Gruppe an einem Ende des Spacermoleküls wurde aber trotzdem die Selektivität hinsichtlich der Aminogruppen des Trägersystems und der des zu bindenden Proteins gewahrt, so daß unerwünschte Nebenreaktionen wie bei den homobifunktionalen Crosslinkern nicht auftraten. Weiterführende Untersuchungen mit diesem Crosslinker wurden nicht durchgeführt.

Tabelle 17: Bindung von HSA an Traut-Nanopartikel mit verschiedenen Crosslinkern

Crosslinker	Bindung [mol/mol HSA]	
	Konz. des aktivierten Proteins [mg/mg NP]	
	0,1	0,2
Sulfo-MBS	0,0133	0,0197
Sulfo-SMCC	0,0017	0,0047
SAND	0,0154	0,0252
DTSSP	0,0008	-----
DTBP	0,0082	0,0071

#### 4.4.3 Bindung von Enzymen

Nach der Evaluierung der Bindungsparameter sollte dieses Bindungsschema für Proteine an HSA-Nanopartikel nun auf funktionelle Proteine angewendet werden, um zu zeigen, daß die Funktionalität des gebundenen Proteins auch nach der Bindung an die Partikeloberfläche erhalten bleibt. Als funktionelle Proteine wurden verschiedene Enzyme und das Avidinderivat NeutrAvidin™ gewählt.

Zunächst wurden die Versuche mit Enzymen durchgeführt. Als Standard-Enzymassays wurden alkalische Phosphatase und  $\beta$ -Galaktosidase gewählt, die beide p-Nitrophenol aus ihren Substraten, dem p-Nitrophenylphosphat bzw. dem p-Nitrophenylgalaktosidat, freisetzen.

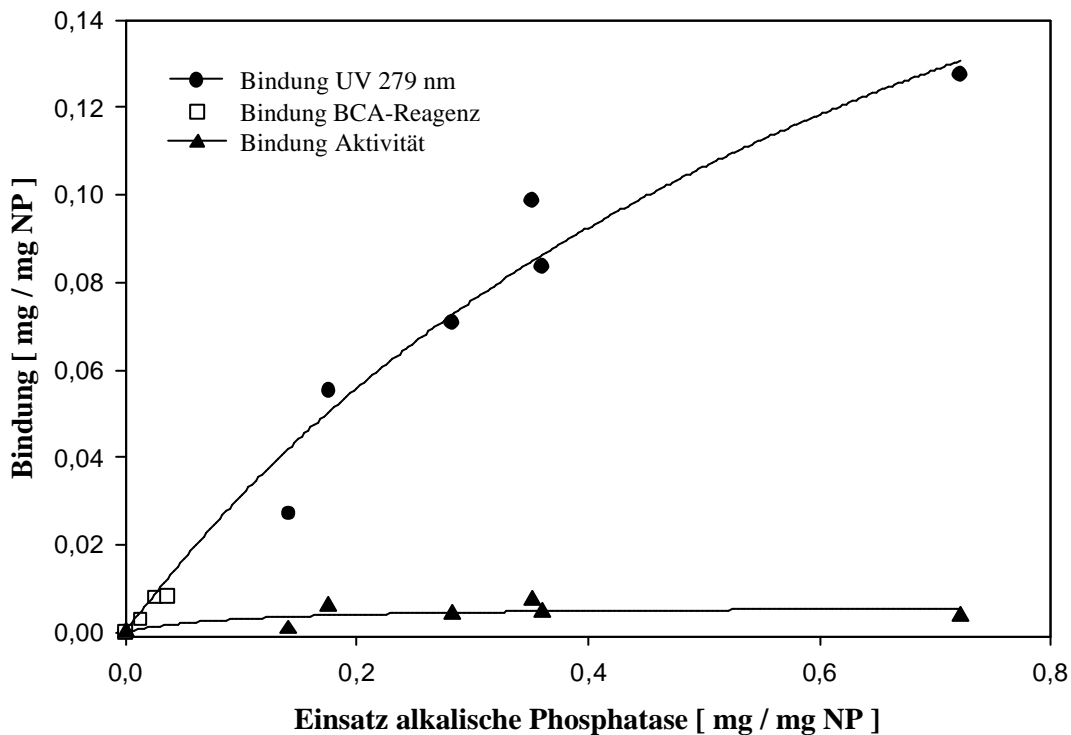
#### 4.4.3.1 Bindung der alkalischen Phosphatase (Verschnitt)

Als erstes wurden Bindungsstudien mit einer alkalischen Phosphatase durchgeführt, die zu einem erheblichen Anteil mit einem anderen unbekanntem Protein oder Proteingemisch verschnitten war.

##### 4.4.3.1.1 Bindungsraten

Die verschnittene alkalische Phosphatase wurde in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen an SH-modifizierte Nanopartikel gebunden.

Abbildung 68: Bindung der alkalischen Phosphatase (Verschnitt) an HSA-Nanopartikel, die mit Trauts Reagenz thioliert wurden





Die Quantifizierung der Bindungsrate erfolgte zum einen über eine direkte photometrische Bestimmung bei 279 nm, zum anderen über eine Bestimmung mit dem BCA-Protein Reagenz. Zusätzlich wurde die Aktivität des gebundenen Enzyms an der Partikeloberfläche ermittelt und aus der Aktivität wiederum auf die Enzymbindung geschlossen. Eine Bestimmung der Bindung mit GPC war nicht möglich, da das Verschnittprotein eine Auswertung der Chromatogramme nicht erlaubte.

Abbildung 68 zeigt, daß die Beladung der Partikel mit dem Enzym nach der UV-Bestimmung von der Größenordnung her mit der Beladung des HSAs an die Partikel vergleichbar war. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität dagegen wies darauf hin, daß entweder das Enzym bei der Bindung an die Partikeloberfläche inaktiviert wurde oder daß die Bindung in Wahrheit wesentlich niedriger lag, als die Quantifizierung mittels UV-Detektion vermuten ließ.

#### *4.4.3.1.2 Mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität*

Um mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität auszuschließen, wurden eine Reihe von Faktoren überprüft, die die Bestimmung negativ beeinflussen könnten. Doch alle in Tabelle 18 aufgeführten Faktoren konnten als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

Eine plausible Erklärung für die niedrige enzymatische Aktivität der Enzyme an der Partikeloberfläche trotz der hohen Bindungsrate bietet die Gegenwart des Verschnittproteins. Verschiedene Proteine lassen sich mit Sulfo-MBS unterschiedlich gut aktivieren. Denkbar ist, daß das Verschnittprotein wesentlich stärker mit dem Sulfo-MBS reagiert. Deshalb standen im Vergleich zu dem aktivierten Enzym mehr Sulfo-MBS-Gruppen, also reaktive Maleimidstrukturen zur Verfügung, die dann wiederum entsprechend vermehrt mit den SH-Gruppen an der Partikeloberfläche reagieren konnten. Durch den überproportional hohen Anteil an gebundenem Verschnittprotein liegt der Anteil an kovalent gebundener alkalischer Phosphatase aber wesentlich niedriger, als durch die Bindungsbestimmung erwartet werden kann, da bei den Bestimmungsmethoden nicht zwischen Enzym und Verschnittprotein unterschieden werden kann.

Tabelle 18: Mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität von alkalischer Phosphatase (Verschnitt) an Traut-Nanopartikel

Einflußfaktor	Ergebnis
Adsorption des Mg <sup>2+</sup> an die HSA-NP	kein Einfluß
Adsorption des p-Nitrophenols an die HSA-NP	kein Einfluß
Inaktivierung der alkalischen Phosphatase im Ultraschall	kein Einfluß
Bestimmung freier SH-Gruppen der alkalischen Phosphatase	kein Einfluß
Abspaltung der alkalischen Phosphatase beim Waschen	kein Einfluß
Inaktivierung des Enzyms durch die Gegenwart der NP	kein Einfluß

#### 4.4.3.2 Bindung der reinen alkalischen Phosphatase

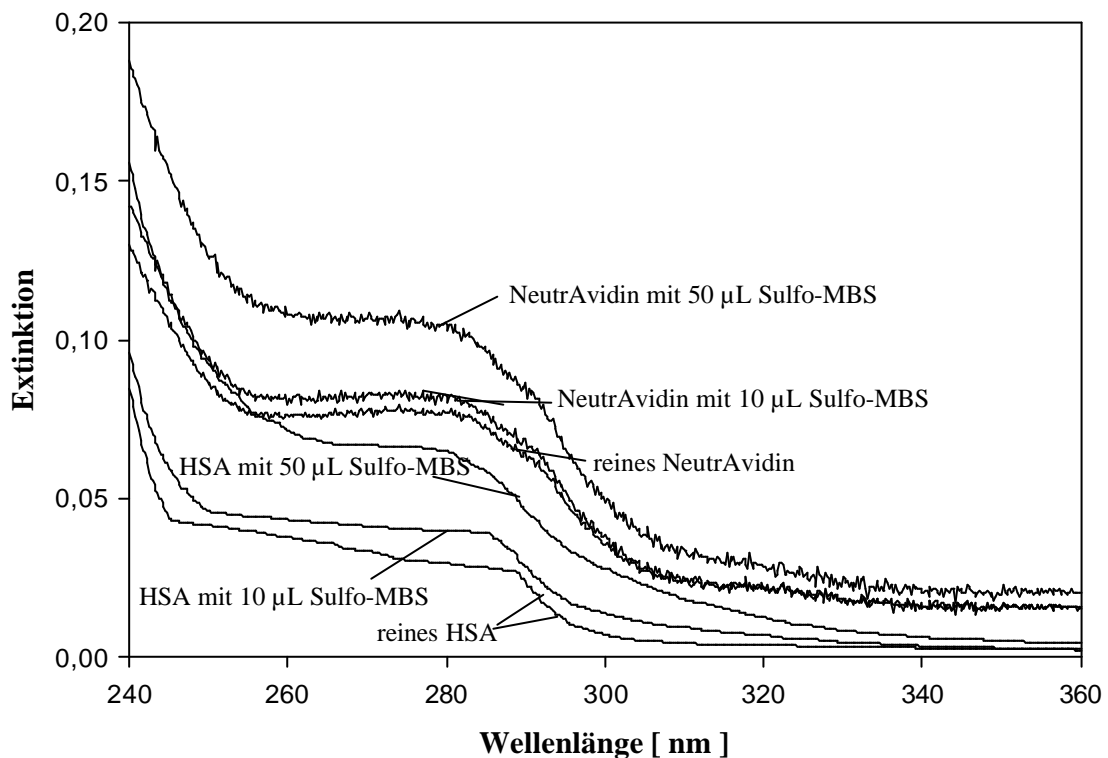
Um diese Nebenreaktionen des Verschnittproteins auszuschließen, wurden die Bindungsexperimente mit reiner alkalischer Phosphatase wiederholt. Aktivitätsverluste des gelösten Enzyms durch die Aktivierung mit Sulfo-MBS wurden nicht beobachtet. Die Ergebnisse in Tabelle 19 zeigen für die photometrische Quantifizierung der Bindung bei gleichem Proteineinsatz eine deutlich niedrigere Bindungsrate als für die verschnittene alkalische Phosphatase (siehe Abbildung 68). Dies bestätigt die Annahme aus 4.4.3.1.2, daß das Verschnittprotein deutlich stärker gebunden wurde als das Enzym.

Tabelle 19: Bindung reiner alkalischer Phosphatase mit Sulfo-MBS an HSA-Nanopartikel, die mit Trauts Reagenz thioliert wurden

Menge an eingesetzter alkalischer Phosphatase [mg/mg NP] n=2		Beladung [ mg/mg NP]				
Mittelwert	S.D.	UV 279 nm		GPC 220 nm	Aktivität	
		Mittelwert	S.D.		Mittelwert	S.D.
0,2948	0,0702	0,0110	0,0001	0,0026	0,0008	0,0003
0,5896	0,1405	0,0622	0,0006	0,0047	0,0026	0,0003

Der erhebliche Unterschied zwischen der berechneten Beladung und der bestimmten enzymatischen Aktivität führte zu einer erneuten Beladungsbestimmung mit GPC bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm. Das Spektrum des mit verschiedenen Sulfo-MBS-Konzentrationen aktivierten HSAs und des reines HSAs in Abbildung 69 zeigt eine deutliche Verschiebung des Spektrums nach der Sulfo-MBS-Aktivierung. Das Maximum bei 279 nm wird durch die Aktivierung überproportional verstärkt, während bei anderen Wellenlängen lediglich eine allgemeine Anhebung des Spektrums erkennbar ist.

Abbildung 69: Spektralphotometrisches Spektrum des mit verschiedenen Sulfo-MBS-Konzentrationen aktivierten HSAs und Fluorescein-NeutrAvidins™



Unter der Annahme, daß die einzelnen Proteinmoleküle statistisch unterschiedlich stark mit Sulfo-MBS aktiviert werden, und damit der unterschiedliche Anteil an Sulfo-MBS auch zu einer unterschiedlichen Absorption bei 279 nm führt, bedingt die Bindung des stark Sulfo-MBS-modifizierten Proteins eine wesentlich stärkere Abnahme der Extinktion als die Bindung eines weniger stark aktivierten Proteins. Da davon auszugehen ist, daß ein Protein um so wahrscheinlicher an SH-Gruppen bindet,

je mehr Sulfo-MBS-Moleküle das Protein aktivieren, bedeutet dies, daß es zuerst zu einer überproportional hohen Abnahme der Extinktion bei 279 nm kommt und damit höhere Bindungsraten vorgetäuscht werden, als tatsächlich erreicht wurden. Die Auswertung bei 220 nm scheint gegen die unterschiedliche Sulfo-MBS-Aktivierung weniger empfindlich zu sein als eine Auswertung bei 279 nm. Die Werte der Beladung liegen in der Größenordnung von der über die Enzymaktivität durch Umsetzung mit p-Nitrophenylphosphat ermittelten Bindungsrate. Daß die Verschiebung des Spektrums nach der Aktivierung mit Sulfo-MBS nicht nur eine Erscheinung bei der Umsetzung des HSAs mit diesem Crosslinker ist, zeigt die Darstellung eines anderen, ebenfalls mit Sulfo-MBS-aktivierten Proteins, dem im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Fluorescein-NeutrAvidin™.

Die Bindung der alkalischen Phosphatase mit Sulfo-MBS führte also zu einer kovalenten Bindung des Enzyms unter Erhaltung der enzymatischen Aktivität. Aussagen über Verluste der Enzymaktivitäten durch die Bindung an die Partikel waren mit diesen Analytikmethoden nicht möglich. Allerdings erscheint es unwahrscheinlich, daß die Bindung des aktivierten Proteins noch zu einem Aktivitätsverlust führt, da der direkte Eingriff in die Enzymstruktur, also die Aktivierung des gelösten Enzyms selbst, keinen Aktivitätsverlust verursacht.

### **4.4.3.3 Bindung der $\beta$ -Galaktosidase**

Um Aussagen über die Bindung an dieses Trägersystem nicht nur auf ein Enzym zu beschränken, wurde noch ein weiteres Enzym, die  $\beta$ -Galaktosidase, zu Bindungsstudien gewählt. Auch hier handelte es sich um ein verschnittenes Protein, allerdings wurde anstelle von Proteinen Stärke zum „Verschneiden“ verwendet, die die weiteren Untersuchungen nicht negativ beeinflusste.

Das Ergebnis der  $\beta$ -Galaktosidase-Bindung (siehe Tabelle 20) bestätigt das Resultat der Untersuchungen mit der alkalischen Phosphatase: Die mit BCA ermittelten Bindungsraten liegen deutlich höher als die mit GPC bei 220 nm ermittelten Daten, wobei die GPC-Daten mit dem Ergebnis der Aktivitätsbestimmung gut harmonisieren.

Tabelle 20: Bindung von  $\beta$ -Galaktosidase an HSA-Nanopartikel, die mit Trauts Reagenz thioliert wurden, in Abhängigkeit des gewählten analytischen Verfahrens

Methode	Bindung [mg /mg NP]
BCA	0,0021
GPC 220 nm	0,0006
Aktivität	0,0005

#### 4.4.4 Bindung von biotinylierten Antikörpern an Avidin-konjugierte Nanopartikel

Die Bindung von Antikörpern an Arzneiträgersysteme ist ein seit langem genutztes Prinzip des Targetings bestimmter Zielgewebe oder -zellen (Leserman et al. 1980, Illum et al. 1983, Akasaka et al. 1988, Velge-Roussel et al. 1996). Als Zielzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit primäre Lymphozyten (= PBLs = peripheral blood lymphocytes) gewählt, die am Tag des Versuches frisch aus humanem Spenderblut isoliert wurden (siehe 3.4.4.4.1). PBLs gehören im Gegensatz zu Makrophagen nicht zu den phagozytierenden Zellen, so daß eine Aufnahme des kolloidalen Trägersystems in das Zellinnere nur über eine rezeptorvermittelte Endozytose erfolgen kann. Der charakteristische Rezeptor der T-Lymphozyten ist der sogenannte T-Zell-Rezeptor (TCR). Neben diesem Rezeptor sind noch eine Reihe anderer Moleküle, die nicht-kovalent mit den Ketten des TCR assoziiert sind, an den Prozessen der Lymphozytenaktivierung beteiligt. Bei diesen assoziierten Molekülen unterscheidet man zwischen CD2, CD3, CD4, CD8 CD11a und LFA-3 (Klein 1991). Auf nahezu allen menschlichen Lymphozyten, gleichgütig ob in ruhendem oder aktiviertem Zustand, werden CD2, CD3 und CD5 exprimiert (Klein 1991). Aufgrund dieser ubiquitären Expression auf den T-Lymphozyten wurde das CD3-Antigen als Targetstruktur gewählt und versucht, durch Kopplung von Antikörpern gegen das CD3-Antigen an das Trägersystem ein Targeting dieser Zellen zu erzielen, wenn möglich verbunden mit einer rezeptorvermittelten Aufnahme des Trägersystems in die Zellen.

Das CD3-Antigen des menschlichen Organismus besteht aus drei Ketten, der CD3 $\gamma$ -, der CD3 $\delta$ - und der CD3 $\epsilon$ -Kette (Janeway and Travers 1997, Terhorst et al. 1986). Die Funktion des CD3-Antigens in der Zelle ist noch unklar, man geht aber davon aus, daß CD3 das Aktivierungssignal vom TCR an andere Moleküle der Zelle bzw. intrazelluläre Kompartimente weiterleitet (Klein 1991, Terhorst et al. 1986). Die CD3-Proteine enthalten Sequenzen, die es ihnen ermöglichen, nach der Stimulierung des TCR mit zytosolischen Proteintyrosinkinasen zu assoziieren und so das Signal in das Zellinnere zu übertragen (Janeway and Travers 1997). Eine Bindung des CD3s mit CD3-Antikörpern führt zu einer Blockade der T-Zellfunktion. Beispielsweise kommt es bei der Reaktion des CD3-Antikörpers OKT3 durch Internalisierung zu einer selektiven Entfernung des CD3-Antigens von der Zelloberfläche. 24 h nach der Internalisierung werden sie wieder an der Zelloberfläche exprimiert (Norman 1995) Dieser Mechanismus eignet sich zur Induktion einer Immunsuppression. Das OKT3 bindet dabei an die  $\epsilon$ -Kette des CD3-Antigens. Generell hängt die Wirkung der CD3-Antikörper allerdings von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Monozyten ab: In Gegenwart der Monozyten üben die CD3-Antikörper eine mitogene Wirkung aus, in deren Abwesenheit führen sie zu einer Blockade der T-Zellen (Ledbetter et al. 1986, Tsoukas et al. 1987).

Die CD3-Antikörper wurden aus Kostengründen nicht wie die Enzyme oder die anderen Modellproteine direkt mit Sulfo-MBS an die Partikeloberfläche gebunden, da hier die Bindungsraten relativ niedrig liegen (siehe 4.4.1 und 4.4.3) und vergleichsweise hohe Antikörperkonzentrationen hätten eingesetzt werden müssen, um eine nachweisbare Bindung zu erzielen. Um hohe Verluste des Antikörpers zu vermeiden wurden die Antikörper als biotinylierte Antikörper über das Biotin-Avidin-Bindungssystem an die Partikeloberfläche gebunden.

### **4.4.4.1 Die Biotin-Avidin-Bindung**

Das Prinzip der Bindung von biotinylierten Arzneistoffen über Avidin-modifizierte Nanopartikel wurde von Langer et al. (2000) beschrieben.

Das aus Hühnereiweiß gewonnene Avidin ist ein Glykoprotein mit einem Isoelektrischen Punkt von  $\approx 10$ . Avidin mit einem Molekulargewicht von  $\approx 67$  kDa ist ein Tetramer und besteht aus 4 identischen Untereinheiten. Charakteristisch ist seine extrem hohe Bindungsaffinität zu Biotin mit einer Bindungskonstante  $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ . Damit stellt die Biotin-Avidin-Bindung das stärkste nichtkovalente biologische Bindungssystem zwischen Protein und Ligand dar (Savage et al. 1994). Die Bindung erfolgt sehr rasch und ist nach der Ausbildung über einen pH-Bereich von 2-13, bei extremen Temperaturen (kurzfristig bis zu  $132^\circ\text{C}$ ), gegenüber organischen Lösungsmitteln und anderen Denaturierungsagentien relativ unempfindlich. Auch findet im Verdauungstrakt kein enzymatischer Abbau der Bindung statt. Gelöst werden kann diese Bindung durch den Zusatz von 8 M Guanidin x HCl-Lösung bei pH 1,5. Wichtig hinsichtlich der kovalenten Bindung an das Partikelsystem ist die Unempfindlichkeit der Aktivität bei der Modifikation funktioneller Gruppen des Avidins. Eingesetzt wird das Avidin-Biotin-Bindungssystem in weiten Bereichen der Affinitätschromatographie, der Detektion bei Immunoassays und der Immobilisierung von Enzymen (Savage et al. 1994).

Zur Gruppe der biotinbindenden Proteine zählt auch das Streptavidin, das sich aber maßgeblich in der Primärstruktur von Avidin unterscheidet. Streptavidin bindet 4 mol Biotin pro mol Streptavidin und weist ein Molekulargewicht von  $\approx 75$  kDa auf. Es besitzt keinerlei Kohlenhydratreste, ist weniger wasserlöslich und hat einen Isoelektrischen Punkt von 5-6. Hierauf beruht auch eine niedrigere, unspezifische Bindungsneigung des Streptavidins im Vergleich zum Avidin. Allerdings besitzt das Streptavidin eine sog. RYD-Domäne, eine Sequenz, die homolog einer allgemeinen Erkennungssequenz für eine Vielzahl von Zellrezeptoren ist. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche NeutrAvidin™ verwendet, ein partialsynthetisches Avidinderivat, dem diese RYD-Domäne fehlt. Ähnlich dem Streptavidin enthält es keine Kohlenhydratreste und weist einen Isoelektrischen Punkt von 6,3 auf. Durch diesen niedrigen Isoelektrischen Punkt in Verbindung mit dem Fehlen der RYD-Domäne wird das Risiko einer unspezifischen Zelladhäsion bei Verwendung des NeutrAvidins™ minimiert.

### 4.4.4.2 Bindung des Fluorescein-NeutrAvidinsä (FNA)

Das NeutrAvidin™ wurde mit dem bifunktionalen Crosslinker Sulfo-MBS an die Oberfläche thiolierter HSA- und Gelatine A-Nanopartikel konjugiert, wobei die Thiolgruppen mit Trauts Reagenz, wie in 4.2.5 beschrieben, eingeführt wurden. Zur Evaluierung der Bindung im Zellsystem mit Durchflußzytometrie wurde fluoreszenzmarkiertes NeutrAvidin™ verwendet. Die Bindung des Fluorescein-NeutrAvidins™ an das Partikelsystem und die Biotinylierung des zu konjugierenden Proteins in dieser Kombination und nicht umgekehrt erschien sinnvoll, da so eine Quervernetzung des Trägersystems bei Zugabe der biotinylierten Komponente ausgeschlossen wurde (Langer 2000).

Die Gelatine-Partikel ließen sich im Vergleich zu den HSA-Partikeln nur sehr schlecht mit Trauts Reagenz thiolieren (26,9  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  NP). Dies entspräche bei HSA-Nanopartikeln einer Thiolierung von 1,75 mol/mol HSA. Trotzdem wurden sehr hohe Bindungsraten bei der Avidinkopplung von  $0,019 \pm 0,001$  mg Fluorescein-NeutrAvidin™/mg Gelatine-Nanopartikel erzielt. Die Adsorptionsrate wurde allerdings nicht bestimmt, so daß ein Teil des Avidins sicher nicht kovalent, sondern adsorptiv an die Partikeloberfläche gebunden vorliegt. Die Thiolierung der HSA-Nanopartikel erfolgte ebenfalls mit Trauts Reagenz, wie in 3.2.5.4 beschrieben. Bei der FNA-Bindung ergaben sich Bindungsraten von 0,025 mg FNA/mg Nanopartikel ( $\approx 0,022$  mol FNA/mol HSA) für die HSA-Partikel. Auch hier wurde wie bei den Gelatine-Präparationen der Beitrag der adsorptiven Bindung zu der Gesamtbindungsrate nicht bestimmt.

### 4.4.4.3 Targeting primärer humaner Lymphozyten

Nach der Bindung des fluoreszenzmarkierten NeutrAvidins™ wurden dem Trägersystem die biotinylierten CD3-Antikörper zugesetzt und das komplette Drug-Delivery-System im Zellkulturexperiment auf Funktionalität bzw. hinsichtlich seiner Targeting-Eigenschaften untersucht. Die Bindungsraten der biotinylierten Antikörper an die FNA-modifizierten Nanopartikel wurden aus Kostengründen nicht bestimmt.



Da die Bindungsaffinität von Biotin zu Avidin aber sehr hoch ist, kann man unter den angegebenen Bedingungen von einer nahezu quantitativen Bindung ausgehen.

#### *4.4.4.3.1 Zellkulturexperimente*

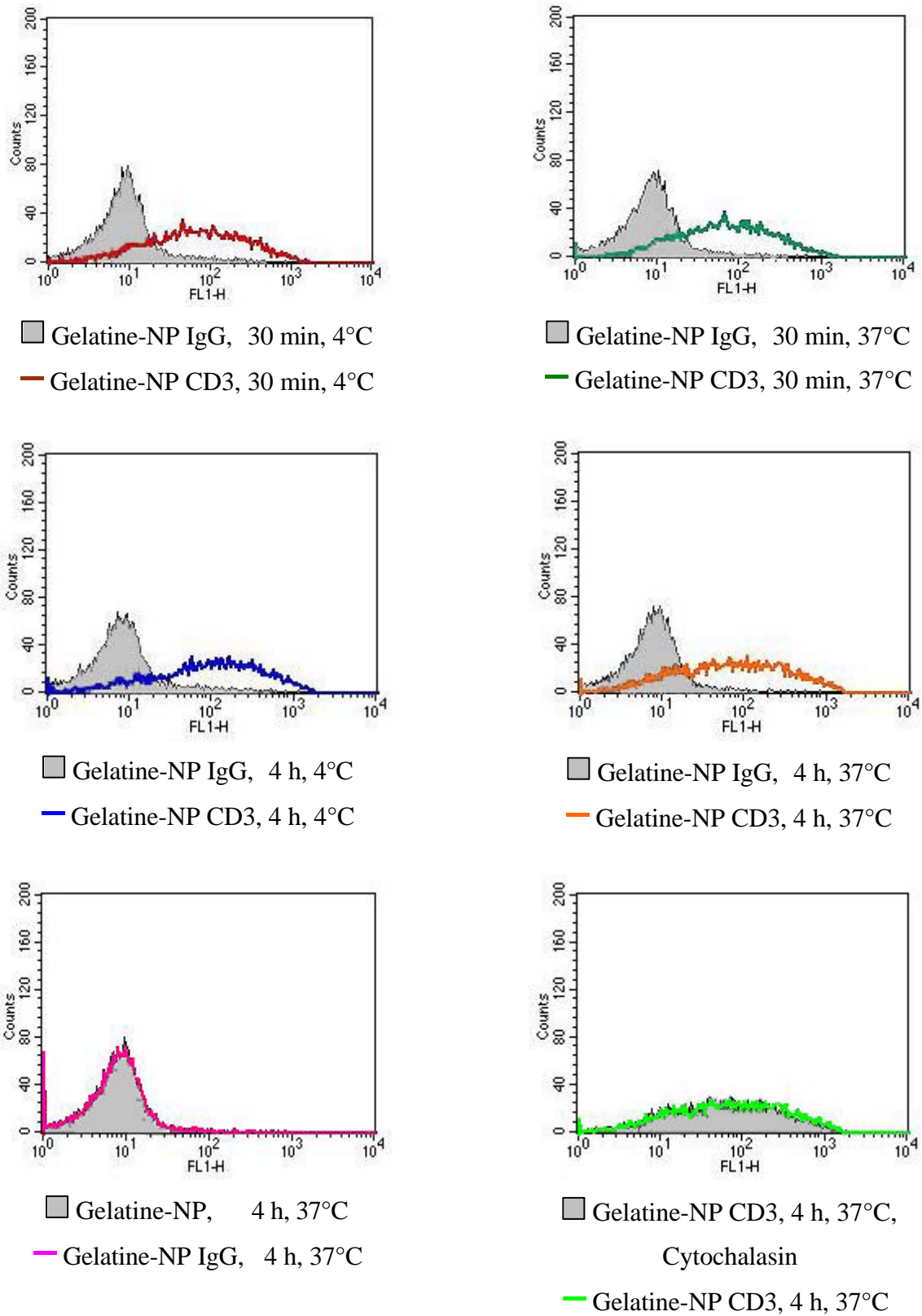
Die Zellkulturexperimente wurden mit FNA-konjugierten Gelatine A- und HSA-Nanopartikeln durchgeführt. Die eingesetzten Partikelmengen lagen bei 0,5 mg bzw. 0,05 mg pro  $2 \cdot 10^6$  Zellen. Einige Zellpräparationen wurden mit Cytochalasin für 1 h vorinkubiert, bevor die Partikelproben zugegeben wurden. Cytochalasin ist ein Pilzalkaloid und hemmt durch Eingreifen in die Assoziation von Aktinfilamenten viele Zellbewegungen. Seine Zugabe sollte die rezeptorvermittelte Aufnahme der Partikel nach Bindung des CD3-Antikörpers an die CD3-Ketten der Zellen hemmen und damit bestätigen, daß eine aktive, rezeptorvermittelte Aufnahme des Trägersystems in die Zellen stattfindet. Auch durch die Inkubation der Zellen bei 4°C sollte eine Aufnahme der Partikel in die Zellen unterbunden werden. Eine Anlagerung an die Zellmembran dagegen ist auch bei 4°C möglich.

Nach Inkubation der Zellen für 30 min bei 4°C bzw. 37°C und 4 h bei 4°C bzw. 37°C wurden die restlichen, nicht gebundenen oder aufgenommenen Partikel durch 5-faches Waschen mit PBS-Puffer entfernt und die Proben für die FACS-Analyse bzw. die CLSM-Untersuchungen vorbereitet. Neben den Anti-CD3-gekoppelten Partikeln wurden IgG-gekoppelte Partikel, reine Avidin-konjugierte Partikel und unmodifizierte Nanopartikel unter identischen Bedingungen wie die Anti-CD3-Proben als Vergleiche eingesetzt.

#### *4.4.4.3.2 Ergebnisse der FACS-Analyse*

Die Ergebnisse der FACS-Analyse der antikörperbeladenen Gelatine A-Nanopartikel zeigten einen vielversprechenden Ansatz zum Targeting primärer humaner Lymphozyten. Deutlich erkennbar war ein Shift der Fluoreszenzintensität der mit Anti-CD3-konjugierten Gelatine-Nanopartikel im Vergleich zu den IgG-konjugierten Proben und den reinen FNA-Gelatine-Partikeln (siehe Abbildung 70).

Abbildung 70: FACS-Analyse der nach der Inkubation humaner Lymphozyten mit Antikörpern beladenen Gelatine A-Nanopartikel unter verschiedenen Inkubationsbedingungen



Ein Vergleich der IgG-Proben mit den reinen FNA-Partikeln und den reinen Zellen zeigte, daß weder die IgG-beladenen Partikel noch die FNA-Präparationen mit den Zellen assoziiert waren. Um so höher ist die selektive Bindung der Anti-CD3-konjugierten Proben an die Lymphozyten zu bewerten. Erstaunlicherweise zeigte sich diese Zellbindung der Anti-CD3-konjugierten Proben bei allen Inkubationsbedingungen, auch bei 4°C. Diese Übereinstimmung aller Anti-CD3-Proben ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Proben bei dem sich der Inkubation anschließenden Waschprozeß bei Raumtemperatur noch etwa 1 h die Möglichkeit hatten, sich an die Zellen anzulagern bzw. nach der Bindung in die Zellen aufgenommen zu werden (siehe auch 4.4.4.3.1).

Um dies auszuschließen, müßten die Proben direkt nach der Inkubation eiskühlt werden. Dies wurde jedoch lediglich für die Proben des CLSMs, aber nicht für die Proben der FACS-Analytik durchgeführt. Die Vorinkubation der Zellen mit Cytochalasin führte zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität von 10-18 % im Vergleich zu der nicht behandelten Probe, was auf eine Aufnahme der Partikel in die Zellen hinweisen könnte. Genaueres ergab sich durch CLSM-Aufnahmen der Zellpräparationen.

Die Zellkulturexperimente mit Avidin-konjugierten HSA-Nanopartikeln waren nicht auswertbar, da die HSA-Partikel eine so starke Zelladhäsion zeigten, daß alle Partikelpräparationen unabhängig von der Antikörperkonjugation in gleichem Ausmaß an der Oberfläche der Lymphozyten zu finden waren. Ein Targeting des Trägersystems konnte deshalb hier nicht gezeigt werden. Vielversprechend wären in diesem Zusammenhang Experimente mit den in 4.3.3.2 beschriebenen, Jodessigsäure-modifizierten HSA-Präparationen, die in Zellkulturexperimenten mit Lymphozyten eine im Vergleich zu reinen HSA-Partikeln deutlich reduzierte Adhäsionsneigung zeigten. Diese Experimente konnten leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

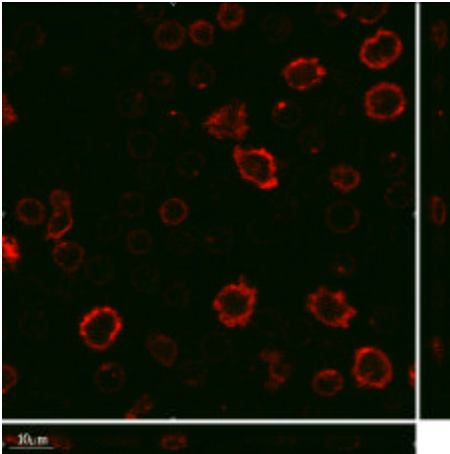
### *Ergebnisse der CLSM-Aufnahmen*

Die CLSM-Untersuchungen wurden lediglich mit Lymphozyten, die mit den Gelatine A-Präparationen inkubiert wurden, durchgeführt. Die Aufnahmen der Probenreihe, die per FACS-Analyse untersucht wurde (siehe 4.4.4.3.2), zeigten, daß in allen mit CD3-Antikörpern beladenen Partikelproben eine Aufnahme der Partikel in die Zellen stattgefunden hat, unabhängig von den Inkubationsbedingungen. Eine Aufnahme der Partikel in die Zellen kann bei 4°C aber nicht erfolgen, da der Zellstoffwechsel bei dieser Temperatur für eine aktive Aufnahme zu niedrig ist. Die Aufnahme der Partikel in die Zellen in den 4°C-Proben kann nur während des Waschprozesses stattgefunden haben, bei dem die Zellen bei RT wiederholt zentrifugiert und resuspendiert wurden. Um diese Effekte von vornherein auszuschließen, wurden die Zellproben bei den weiteren Experimenten nach der Partikelinkubation auf Eis gelagert bzw. mit eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen, so daß aktive Prozesse in der Zelle unterbunden wurden.

Die Bilder der CLSM-Aufnahmen sind in Abbildung 71 (A-F) dargestellt. Es zeigte sich bei der Inkubation der Lymphozyten mit den Anti-CD3-beladenen Nanopartikeln nach 4 h bei 37°C (Abbildung C) eine deutliche Aufnahme der Partikel in die Zellen. Nach der Inkubation bei 4°C (Abbildung E) dagegen ließen sich lediglich einige Partikel an der Zelloberfläche lokalisieren, was für eine rezeptorvermittelte Endozytose des Trägersystems spricht. Auch die unterbundene Partikel Aufnahme bei Zusatz von Cytochalasin (Abbildung D), bei der ebenfalls nur eine Anlagerung der Partikel an die Zelloberfläche erkennbar war, deutet darauf hin. Die Konjugation des unspezifischen Antikörpers IgG (Abbildung F) hatte keinerlei Effekt auf die Bindung des Trägersystems an die Zellen. Das gleiche galt für reine FNA-konjugierte Nanopartikel (Abbildung B). Die CLSM-Untersuchungen zusammen mit den Ergebnissen der FACS-Analyse zeigten, daß durch die Bindung von spezifischen Antikörpern, in diesem Fall CD3-Antikörpern, ein spezifisches Targeting primärer humaner Lymphozyten möglich war. Neben dem spezifischen Targeting der Zellen konnte außerdem eine rezeptorvermittelte Endozytose des Trägersystems in die nichtphagozytierenden Lymphozyten erreicht werden.

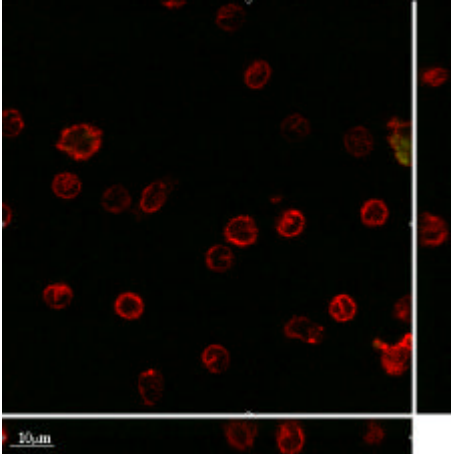
Abbildung 71: CLSM-Aufnahmen der mit Nanopartikeln inkubierten Lymphozyten

Abbildung A



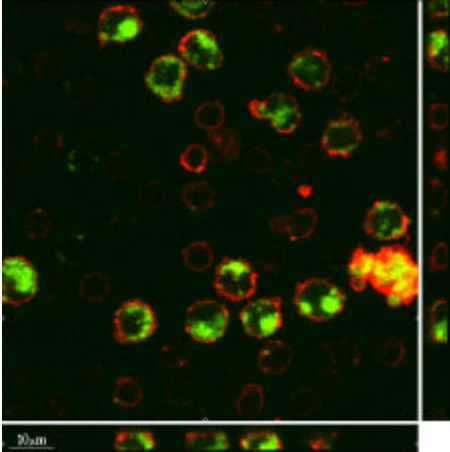
Lymphozytenleerkontrolle

Abbildung B



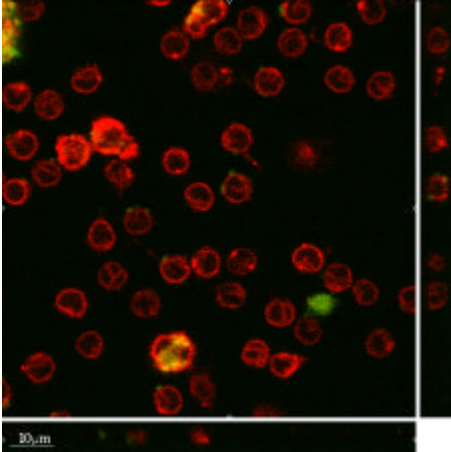
Gelatine-Avidin-NP  
4h, 37°C

Abbildung C



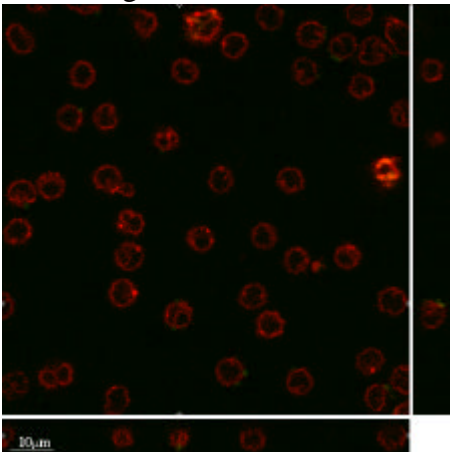
Gelatine-Avidin-Anti-CD3-NP  
4h, 37°C

Abbildung D



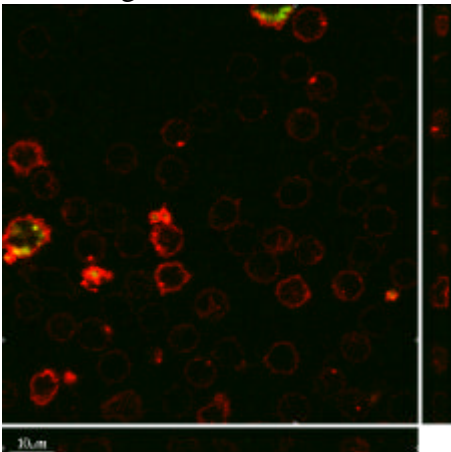
Gelatine-Avidin-Anti-CD3-NP  
4h, 37°C  
mit Cytochalasin vorinkubiert

Abbildung E



Gelatine-Avidin-Anti-CD3-NP  
4h, 4°C

Abbildung F



Gelatine-Avidin-IgG-NP  
4h, 37°C

#### 4.4.4.4 Antigenitäts- und Toxizitätsuntersuchungen

Eine wichtige Frage bei der Entwicklung eines Trägersystems ist die Antigenität und Toxizität bei mehrfacher Applikation. Stellvertretend für die zwei im Zellkulturexperiment untersuchten Partikelpräparationen wurden die NeutrAvidin™-konjugierten HSA-Nanopartikel und deren Vorstufen auf ihre Antigenität und Toxizität hin im Tiermodell untersucht. HSA ist ein körpereigenes Protein, das beim Menschen keine Immunreaktion hervorrufen sollte. Auch wurden in der Literatur HSA-Partikel als nichtantigen beschrieben (Lee et al. 1981, Morimoto and Fujimoto 1985, Arshady 1990, Rubino et al. 1993). Doch durch die Partikelherstellung, Quervernetzung und anschließende Oberflächenmodifikation durch Einführung von Thiolgruppen wird die native Struktur des HSAs erheblich verändert, so daß eine Immunreaktion des Körpers bei mehrfacher Gabe nicht auszuschließen ist. Auch die Bindung des NeutrAvidins™, eines nicht körpereigenen Proteins, könnte die Antigenität des Trägersystems steigern.

Die NeutrAvidin™-modifizierten HSA-Nanopartikel und deren Vorstufen (unmodifizierte HSA-Nanopartikel, mit Trauts Reagenz thiolierte HSA-Nanopartikel) wurden deshalb im Mäusemodell auf Antigenität nach 4-maliger subkutaner Applikation im Abstand von einer Woche untersucht.

Das Ergebnis dieser Untersuchung in Tabelle 21 zeigt, daß alle drei Präparationen keine bzw. nur sehr schwache antigene Eigenschaften besaßen. Die unmodifizierten HSA-Nanopartikel wiesen den höchsten Antikörpertiter auf, wobei ein Antikörpertiter von 210 sehr niedrig ist im Vergleich zu einer starken Immunantwort des Körpers, die mit Antikörpertitern bis über 16.000 nach 4 Wochen einhergeht (Matousek 1994). Die thiolierten und mit NeutrAvidin™-modifizierten Partikel zeigten dagegen praktisch keine Antikörperbildung. Dies Ergebnis ist um so positiver zu bewerten, da HSA für Mäuse kein körpereigenes Protein darstellt und deswegen die Wahrscheinlichkeit einer Immunantwort in der Maus wesentlich höher ist als im Mensch.

Tabelle 21: Antigenität und Toxizität der NeutrAvidin™-modifizierten HSA-Nanopartikel und deren Vorstufen im Tiermodell der Maus

	Antikörper- titer ± SEM	Gewicht der Testes ± SEM	Dicke der sperm. Schicht d. [µm] ± SEM	Durchmesser d. Testestubuli [µm] ± SEM	Gewichts- zunahme d. Mäuse [g]
unmodifizierte HSA-NP	210 ± 16	105 ± 14	67 ± 7	166 ± 8	10
thiolierte HSA-NP	11 ± 6	97 ± 9	63 ± 7	163 ± 6	25
NeutrAvidin™-HSA-NP	14 ± 5	103 ± 6	58 ± 7	162 ± 9	16
Kontrolle	0	97 ± 7	65 ± 5	163 ± 7	14

An diesem Tiermodell wurde gleichzeitig die Toxizität der Partikelpräparationen untersucht. Als Toxizitätskriterium galt der aspermatogene Effekt der Zubereitung bei subkutaner Applikation (Matousek 1994). Die Ergebnisse in Tabelle 21 zeigen keinerlei aspermatogene Effekte. Die Testes der mit Nanopartikeln behandelten Mäuse unterschieden sich weder hinsichtlich des Gewichtes, der Dicke noch des Durchmessers der Testestubuli von denen der Kontrolltiere. Außerdem zeigten die Versuchstiere eine den Kontrolltieren vergleichbare Gewichtszunahme, was für ihr Wohlergehen spricht.

## 4.5 Schlußfolgerung

Als das geeignetste proteinbasierte Trägersystem zur Erzielung einer selektiven Bindung an Zellsysteme und einer damit möglicherweise verbundenen rezeptorvermittelten Aufnahme in das Zellinnere erwies sich das aus Gelatine A hergestellte, thiolierte und mit NeutrAvidin™ konjugierte Nanopartikelsystem, welches mit biotinylierten Antikörpern umgesetzt wurde.

Die Bindung von Proteinstrukturen an die Oberfläche des Trägersystems über heterobifunktionale Crosslinker wurde durch die Einführung von Thiolgruppen ermöglicht. Eine effektive und einfache Methode hierzu bietet die Umsetzung der Aminogruppen an der Partikeloberfläche mit Trauts Reagenz. Das sich ergebende

Partikelsystem zeigte sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell nahezu keine toxischen Eigenschaften, auch Antigenitätstests verliefen negativ. Werden die Aminogruppen des Trägersystems für weitere Umsetzungen benötigt, stellt die Umsetzung der Carboxylgruppen mit EDC und Cystamin eine alternative Methode zur Einführung von SH-Gruppen dar. Allerdings ist diese Methode deutlich aufwendiger und die Präparationen zeigten in Zellkultur eine deutlich reduzierte Zellviabilität.

Durch die Bindung von NeutrAvidin™ mit dem heterobifunktionalen Crosslinker Sulfo-MBS wurde ein vielseitig einsetzbares und effizientes Trägersystem für biotinylierte Arzneistoffe bzw. Proteine geschaffen. Eine direkte Bindung der funktionellen Proteine mit Sulfo-MBS an das Trägersystem dagegen erscheint aufgrund der hohen Verluste des zu bindenden Proteins nicht sinnvoll.

Da HSA-Nanopartikel eine sehr starke Zelladhäsion aufweisen, sind sie als Trägersystem für Drug-Targeting in dieser Form ungeeignet. Gelatine A-Nanopartikel dagegen zeigen keine Zelladhäsion und ermöglichen durch Bindung von Antikörpern über das Biotin-Avidin-System ein selektives Targeting und eine rezeptorvermittelte Aufnahme des Trägersystems in die Zellen des Zielgewebes.



## 5 Zusammenfassung

Einen vielversprechenden Ansatz auf dem Gebiet der Entwicklung kolloidaler Arzneiträgersysteme stellen die proteinbasierten Nanopartikel dar, da sie biodegradierbar und nicht toxisch sind und eine Reihe möglicher Angriffspunkte zur kovalenten Bindung von Arzneistoffen und zur Oberflächenmodifikation aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Herstellungsprozeß von HSA-Nanopartikeln und sein Einfluß auf die physikochemischen Eigenschaften des resultierenden Partikelsystems evaluiert. Durch Oberflächenmodifikation wurde eine Kopplung von Proteinen mittels bifunktionaler Crosslinker ermöglicht und die zelladhäsiven Eigenschaften des Trägersystems vermindert. Durch Kopplung funktioneller Proteine wurden die ersten Schritte in Richtung eines ligandenvermittelten Drug-Targetings unternommen.

### 5.1 Evaluierung des Herstellungsprozesses und Charakterisierung des resultierenden partikulären Systems

Die Evaluierung des Desolvationsprozesses von HSA-Nanopartikeln ergab eine Abhängigkeit der Partikelgröße und der Partikelanzahl vom zugesetzten Desolvationsmittel Ethanol. Die Quervernetzung des resultierenden Systems beeinflusste die Anzahl der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche: Je mehr Glutaraldehyd zugesetzt wurde, desto weniger Aminogruppen waren nachweisbar. Die Härtung der Partikel durch Einwirkung hoher Temperaturen führte ebenfalls zu stabilen Partikeln. Die Anzahl der verfügbaren Aminogruppen lag im Vergleich zu den Glutaraldehyd-quervernetzten höher. Die Art und das Ausmaß der Quervernetzung hatten keinerlei Einfluß auf die mittlere Partikelgröße. Das Zetapotential dagegen zeigte eine Tendenz, mit steigender Quervernetzung negativer zu werden.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Aminogruppen an der Oberfläche von Gelatine-A- und B-Nanopartikeln verdeutlichte, daß HSA-Nanopartikel signifikant mehr freie Aminogruppen an der Partikeloberfläche, und damit mehr Angriffspunkte zur kovalenten Kopplung und Oberflächenmodifikation aufweisen, als Gelatine-

Nanopartikel, wobei Gelatine A-Nanopartikel mehr als doppelt so viele Aminogruppen an der Oberfläche besitzen als Gelatine B-Partikel. Die höchsten Aminogruppenzahlen zeigten die hitzedenaturierten HSA-Nanopartikel.

## **5.2 Einführung von Sulfhydrylgruppen an die Partikeloberfläche**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs Methoden zur Einführung von Thiolgruppen auf die Oberfläche von HSA-Nanopartikeln evaluiert. Die effektivste Methode ergab sich aus der Kopplung von Cystamin mit dem Kopplungsreagenz EDC, gefolgt von einer reduktiven Spaltung der Cystamindisulfidbindungen und der Disulfidbrücken der HSA-Partikelmatrix mit DTT. Bedauerlicherweise zeigte diese Partikelpräparation die höchste Toxizität der untersuchten Zubereitungen in der Zellkultur. Die Kopplung von L-Cystein mit EDC war aufgrund unerwünschter Nebenreaktionen wesentlich weniger effektiv. Die einfachste Art, Thiolgruppen einzuführen, war die reduktive Spaltung der Disulfidbrücken der HSA-Partikelmatrix mit DTT. Doch Bindungsexperimente zeigten, daß diese Thiolgruppen zwar mit Ellmans Reagenz nachweisbar waren, aber zu Bindungszwecken wahrscheinlich aus sterischen Gründen nur in untergeordnetem Maße zur Verfügung standen. Die Verwendung von 2-Iminothiolan (Trauts Reagenz) war eine im Vergleich zur Cystamin/EDC-Methode einfache und leicht zu handhabende Methode zur Einführung von SH-Gruppen, allerdings mit relativ geringer Effizienz. Das Quenchen freier Glutaraldehydreste an der Partikeloberfläche mit Cystamin führte zu einem sehr niedrigen SH-Gruppengehalt, mit L-Cystein waren so gut wie keine Thiolgruppen nach der Umsetzung nachweisbar. Die SH-Gruppen wurden bei einer Lagerung bei 4°C mit einer Halbwertszeit von 28,2 Tagen abgebaut, unabhängig von der Art der SH-Gruppeneinführung. Die Reaktivität der SH-Gruppen dagegen nahm wesentlich schneller ab als ihre Nachweisbarkeit: Bereits am dritten Tag nach der SH-Gruppeneinführung lag die Bindungsrate von mit SH-reaktiven Crosslinkern aktivierten Proteinen um 20-30 % niedriger, verglichen mit dem ersten Tag.

Durch Veränderung der Reaktionsparameter konnte bei allen Methoden die Anzahl der eingeführten Thiolgruppen kontrolliert werden. Durch die Einführung der SH-Gruppen zeigten die Nanopartikel eine deutlich höhere Mukoadhäsion.

### **5.3 Oberflächenmodifikationen**

Das Ziel der Oberflächenmodifikation der HSA-Nanopartikel war zum einen eine Positivierung des Zetapotentials, um die Bindung negativ geladener Arzneistoffe wie DNA über elektrostatische Wechselwirkungen zu ermöglichen. Die Umsetzung der Partikel mit EDC allein oder mit EDC und Cystamin bzw. Cholamin führte zu einer deutlichen Verschiebung des Zetapotentials in den positiven Bereich. Durch Veränderung der Cholamin- bzw. Cystaminkonzentration war die Verschiebung des Zetapotentials steuerbar. Gleiches galt für die Umsetzung der Gelatine A-Partikel, allerdings waren hier deutlich geringere Konzentrationen zur Erlangung der gleichen positiven Zetapotentiale notwendig.

Zum anderen sollte durch die Modifikation der Partikeloberfläche ein verändertes Verhalten hinsichtlich der Zelladhäsion der Partikel erzielt werden. Es zeigte sich eine verstärkte Zelladhäsion nach der Einführung weiterer Aminogruppen und nach der Einführung lipophiler Gruppen. Eine verminderte Zelladhäsion wurde durch eine Maskierung der Aminogruppen erreicht. Die besten Ergebnisse erbrachte hierbei die Umsetzung der HSA-Nanopartikel mit Jodessigsäure.

### **5.4 Bindung funktioneller Proteine**

Um zu überprüfen, ob funktionelle Proteine an das evaluierte Trägersystem unter Erhalt der Funktionalität gebunden werden können, wurden zunächst Enzyme über den bifunktionalen Crosslinker Sulfo-MBS kovalent gekoppelt. Analysen der Bindungsrate und der tatsächlichen enzymatischen Aktivität differierten zwar, doch ist dies wohl auf eine noch nicht hinreichend optimierte Analytik zurückzuführen. Eine enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase und der  $\beta$ -Galaktosidase war nach der Bindung an das Trägersystem eindeutig nachweisbar.

Als weiteres funktionelles Protein wurde das Avidinderivat NeutrAvidin™ gewählt und mit Sulfo-MBS an Gelatine A-Nanopartikel gekoppelt. Durch die Bindung biotinylierter Antikörper konnte der Erhalt der Funktionalität des gebundenen NeutrAvidins™ gezeigt werden. Die Konjugation eines biotinylierten, humanen CD3-Antikörpers an das NeutrAvidin™-konjugierte Partikelsystem führte zu einer selektiven Bindung des Trägersystems an primäre humane Lymphozyten. Auch eine Aufnahme des Trägersystems in die Zellen konnte gezeigt werden. Die Experimente zum Antikörper-vermittelten Targeting konnten mit HSA-Nanopartikeln nicht reproduziert werden, da HSA-Partikel eine so starke Zelladhäsion zeigten, daß ein Targeting aufgrund des Antikörpers nicht mehr ersichtlich war. Erste Versuche mit oberflächenmodifizierten HSA-Präparationen, wie beispielsweise einer Jodessigsäure-Umsetzung, führten zu einer deutlich verminderten Zelladhäsion. Weitergehende Experimente zur Evaluierung dieses Effektes sind für die Weiterentwicklung dieses Trägersystems entscheidend.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akasaka, Ueda, Takayama, Machida, and Nagai. 1988. Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies. *Drug Design & Delivery* 3: 85
- Allémann, Gurny, and Doelker. 1993. Drug-loaded nanoparticles- preparation methods and drug targeting issues. *European Journal of Biopharmaceutics* 39: 173
- Alyautdin, Gothier, Petrov, Kharkevich, and Kreuter. 1995. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 41: 325
- Alyautdin, Petrov, Langer, Berthold, Kharkevich, and Kreuter. 1997. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 14: 325
- Anderson, and Wetlaufer. 1975. A new method for disulfide analysis of peptides. *Analytical Biochemistry* 67: 493
- Andry, Edwards-Levy, and Levy. 1996. Free amino group content of serum albumin microcapsules. III. A study at low pH values. *International Journal of Pharmaceutics* 128: 197
- Antoni, Presentini, and Neri. 1983. A simple method for the estimation of amino groups on insoluble matrix beads. *Analytical Biochemistry* 129: 60
- Arakawa, and Kondo. 1980. Preparation and properties of poly(N- $\alpha$ -, N- $\epsilon$ -L-lysinediylterephthaloyl) microcapsules containing hemolysate in the nanometer range. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 58: 183
- Arshady. 1990. Albumin-microspheres and microcapsules: methodology of manufacturing techniques. *Journal of Controlled Release* 14: 111
- Aynie, Vauthier, Chacun, Fattal, and Couvreur. 1999. Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 9: 301

- Bauer, Frömming, and Führer. 1993. Kapitel 5. *Pharmazeutische Technologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Berg. 1979. Immunstimulation durch hochdisperse Polymersuspensionen. *Diss. ETH Zürich, Nr. 66481* 49
- Bernkop-Schnürch, Schwarz, and Steininger. 1999. Polymers with thiol groups: A new generation of mucoadhesive polymers? *Pharmaceutical Research* 16: 876
- Bernkop-Schnürch, and Steininger. 2000. Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 194: 239
- Bertling, Gareis, Paspaleeva, Zimmer, Kreuter, Nürnberg, and Harrer. 1991. Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers. *Biotechnology of Applied Biochemistry* 13: 390
- Birrenbach, and Speiser. 1976. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 65: 1763
- Blunk, Hochstrasser, Sanchez, Müller, and Müller. 1993. Colloidal carriers for intravenous drug targeting: Plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 14: 1382
- Bodansky, and Ondetti. 1966. Formation of the peptide bond/ coupling reagents. *In: Peptide Synthesis*. Interscience Publishers, New York:116
- Bodmeier, and Chen. 1990. Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization. *Journal of Controlled Release* 12: 223
- Bohidar. 1998. Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 23: 1
- Cappel, and Kreuter. 1991. Effect of nanoparticles on transdermal drug delivery. *Journal of Microencapsulation* 8 (3): 369

- Carlsson, Drevin, Axen. 1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochemical Journal* 173: 723
- Carraway, and Triplett. 1970. Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups. *Biochimica et Biophysica acta* 200: 564
- Carraway, and Koshland. 1972. Carbodiimide modification of proteins. *Methods in Enzymology* 25: 616
- Carter, and Ho. 1994. Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry* 45: 153.
- Chang, Richards, Rembaum. 1985. Polyacrolein microspheres: Preparation and characteristics. *Methods in Enzymology* 112: 150
- Chang, Gee, Smith, and Lake. 1992. Activating hydroxyl groups of polymeric carriers using 4-fluorobenzenesulfonyl chloride. *Bioconjugate Chemistry* 3 (2): 200
- Chapman-Smith, Forbes, Wallace, and Cronan Jr. 1997. Covalent modification of an exposed surface turn alters the global conformation of the biotin carrier domain of Escherichia coli acetyl- CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26017
- Chen, Lin, Coombes, Davis, and Illum. 1994. Preparation of human serum albumin microspheres by a novel acetone-heat denaturation method. *Journal of Microencapsulation* 11: 395
- Cleland. 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3: 480
- Coester, Langer, von Briesen, and Kreuter. 2000a. Gelatin nanoparticles by two step desolvation- a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation* 17: 187
- Coester, Kreuter, v. Briesen, and Langer. 2000b. Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA). *International Journal of Pharmaceutics* 196: 147

- Couvreur, Kante, Grislain, Roland, and Speiser. 1982. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71: 790
- Cummings, Willmott, Marley, and Smyth. 1991. Covalent coupling of doxorubicin in protein microspheres is a major determinant of tumour drug disposition. *Biochemical Pharmacology* 41: 1849
- Curry, Mandelkow, Brick, and Franks. 1998. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural Biology* 5(9): 827
- DeFeo-Jones, Garsky, Wong, Feng, Bolyar, Haskell, Kiefer, Leander, McAvoy, Lumma, Wai, Senderak, Motzel, Keenan, Zwieten, Lin, Freidinger, Huff, Oliff, and Jones. 2000. A peptide-doxorubicin "prodrug" activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo. *Nature Medicine* 6(11): 1248
- Delfino, Fernandez, and Santome. 1983. Specific modification of carboxyl-groups in bovine growth hormone by a soluble carbodiimide and glycinemethylester. *International Journal of Peptide and Protein Research* 21: 440
- DeKeyser, Poupaert, and Dumont. 1991. Poly(diethyl methylidenemaloneate) nanoparticles as a potential drug carrier: Preparation, distribution and elimination after intravenous and peroral administration to mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 80: 667
- Desai, Labhasetwar, Amidon, and Levy. 1996. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharmaceutical Research* 13: 1838
- Digenis, Gold, and Shah. 1994. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83: 915
- Douglas, Illum, and Davis. 1986. Poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles with differing surface charges. *Journal of Controlled Release* 3: 15
- Douglas, Davis, and Illum. 1987. Nanoparticles in drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 3: 233



- Edwards-Levy, Andry, and Levy. 1993. Determination of free amino group content of serum albumin microcapsules using trinitrobenzenesulfonic acid: Effect of variations in polycondensation pH. *International Journal of Pharmaceutics* 96: 85
- Edwards-Levy, Andry, and Levy. 1994. Determination of free amino group content of serum albumin microcapsules: II. Effect of variations in reaction time and terephthaloyl chloride concentration. *International Journal of Pharmaceutics* 103: 253
- Ellman. 1953. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70
- Ellman. 1959. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74: 443
- Esposito, Cortesi, and Nastruzzi. 1996. Gelatin microspheres: Influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials* 17: 2009
- Ezpeleta, Arangoa, Irache, Stainmesse, Chabenat, Popineau, and Orecchioni. 1999. Preparation of *ulex europaeus* lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus. *International Journal of Pharmaceutics* 191: 25
- Fields. 1972. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods in Enzymology* 25: 464
- Gallo, Hung, and Perrier. 1984. Analysis of albumin microsphere preparation. *International Journal of Pharmaceutics* 22: 63
- Gaur, and Gupta. 1989. A spectrophotometric method for the estimation of amino groups on polymer. *Analytical Biochemistry* 180: 253
- Golightly, Brown, Mitchell, and Brown. 1988. Trypanocidal activity of free and carrier bound daunorubicin. *Cell Biology International Reports* 12: 77
- Gregory. 1955. The stability of N-ethylmaleimide and its reaction with sulfhydryl groups. *Journal of the American Chemical Society* 77: 3922

- Gupta, and Hung. 1989. Albumin microspheres. I: physico-chemical characteristics. *Journal of Microencapsulation* 6: 427
- Gurd. 1967. Carboxymethylation. *Methods in Enzymology* 11: 532
- Gurny, Peppas, Harrington, and Banker. 1981. Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 7: 1
- Habeeb. 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry* 14: 328
- Habeeb. 1967. Preparation of enzymatically active, water-insoluble derivatives of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 119: 264
- Habeeb, and Hiramoto. 1968. Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126: 16
- Hassan, Parish, and Gallo. 1992. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole. *Pharmaceutical Research* 9: 390
- Hermanson. 1999. The chemistry of cross-linking and biotinylation. *Seminar Biotechnica*
- Hnatowich, and Schlegel. 1981. Albumin microspheres labeled with Ga-67 by chelation: concise communication. *Journal of Nuclear Medicine* 22: 623
- Hoare, and Koshland Jr. 1967. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 242: 2447
- Hoffmann, Cinatl, Kabicova, Cinatl, and Stienecker. 1997. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. *International Journal of Pharmaceutics* 157: 189
- Hussain, Jani, and Florence. 1997. Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat. *Pharmaceutical Research* 14: 613
- Illum, Jones, Kreuter, Baldwin, and Davis. 1983. Adsorption of monoclonal antibodies to polyhexylcyanoacrylate nanoparticles and subsequent immunospecific binding to tumor cells in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 17: 65

- Illum, and Davis. 1983. Effect of the nonionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 72: 1086
- Illum, and Davis. 1984. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (poloxamer 338). *FEBS Letters* 167 (1): 79
- Irache, Durrer, Duchene, and Ponchel. 1994. Preparation and characterization of lectin-latex conjugates for specific bioadhesion. *Biomaterials* 15: 899.
- Janeway, and Travers. 1997. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Jayakrishnan, Knepp, and Goldberg. 1994. Casein microspheres - preparation and evaluation as a carrier for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 106: 221.
- Jung, and Moroi. 1983. Crosslinking of platelet glycoprotein Ib by N-succinimidyl(4-azidophenylthio)propionate and 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate). *Biochimica et Biophysica Acta* 761: 152.
- Jung, Kamm, Breitenbach, Kaiserling, Xiao, and Kissel. 2000. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: Is there a role for polymers to affect mucosal uptake. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (1): 147.
- Kakabakos, Tyllianakis, Evangelatos, and Ithakissios. 1994. Colorimetric determination of reactive solid-supported primary and secondary amino groups. *Biomaterials* 15: 289.
- King, Li, and Kochoumian. 1978. Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation. *Biochemistry* 17: 1499.
- Klein. 1991. *Immunologie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Koosha, Müller, and Washington. 1987. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for drug targeting. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39: 136
- Kramer. 1974. Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63: 1646

- Kratz, Beyer, and Schütte. 1999. Drug-polymer conjugates containing acid-cleavable bonds. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 16: 245
- Kreuter, and Speiser. 1976. New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infection and Immunity* 13 (1): 204
- Kreuter. 1983a. Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems I: Preparation Methods. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 58: 196
- Kreuter. 1983b. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: Materials, stability, toxicity, possibilities of drug targeting, and use. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 58 (9-10): 242
- Kreuter. 1988. Possibilities of using nanoparticles as carriers for drugs and vaccines. *Journal of Microencapsulation* 5: 115
- Kreuter. 1991. Nanoparticle-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 16: 169
- Kreuter. 1992. Nanoparticles- preparation and applications. In: Donbrow. *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*. CRC Press, Boca Raton: 125
- Kreuter. 1994. Nanopartikel In: *Colloidal Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker Inc., New York: 219
- Kreuter, Alyautdin, Kharkevich, and Ivanov. 1995. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Research* 674: 171
- Labhasetwar, Song, Humphrey, Shebuski, and Levy. 1998. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87: 1229
- Lambert, Jue, and Traut. 1978. Disulfide cross-linking of Escherichia coli ribosomal proteins with 2-iminothiolane (methyl 4-mercaptobutyrimidate): Evidence that the cross-linked protein pairs are formed in the intact ribosomal subunit. *Biochemistry* 17: 5406

- Langer, Coester, Weber, von Briesen, and Kreuter. 2000. Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49: 303
- Langer, Marburger, Berthold, Kreuter, and Stienecker. 1996. Methylmethacrylate sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles for drug delivery. Part I: Preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 137: 67
- Langer, Stienecker, Lambrecht, Mutschler, and Kreuter. 1997. Methylmethacrylate sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles for drug delivery Part II: Arecaidine propargyl ester and pilocarpine loading and in vitro release. *International Journal of Pharmaceutics* 158: 211
- Latha, and Jayakrishnan. 1995. A new method for the synthesis of smooth, round, hydrophilic protein microspheres using low concentrations of polymeric dispersing agents. *Journal of Microencapsulation* 12: 7
- Ledbetter, June, Martin, Spooner, Hansen, and Meier. 1986. Valency of CD3 binding and internalization of the CD3 cell-surface complex control T cell responses to second signals: Distinction between effects on protein kinase C, cytoplasmic free calcium, and proliferation. *Journal of Immunology* 136: 3945
- Lee, Sokoloski, and Royer. 1981. Serum albumin beads: An injectable, biodegradable system for the sustained release of drugs. *Science* 213: 233
- Lehr. 1994. Bioadhesion technologies for the delivery of peptides and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 11: 119
- Lenaerts, Couvreur, Christiaens-Leyh, Joiris, Roland, Rollman, and Speiser. 1984. Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* 5: 65
- Leserman, Barbet, Kourilsky, and Weinstein. 1980. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* 288: 602
- Leu, Manthey, Kreuter, Speiser, and DeLuca. 1984. Distribution and elimination of coated polymethyl[2-14C]methylmethacrylate nanoparticles after intravenous injection in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73: 1433

- Levy, Lefebvre, Andry, Rahmouni, and Manfait. 1994. Fourier-transform infrared spectroscopic studies of cross-linked human serum albumin microcapsules. 2. Influence of reaction time on spectra and correlation with microcapsule morphology and size. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83: 419
- Levy, Lefebvre, Andry, and Manfait. 1995. Fourier transform infrared spectroscopic studies of cross-linked human serum albumin microcapsules. 3. Influence of terephthaloyl chloride concentration on spectra and correlation with microcapsule morphology and size. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84: 161
- Lewis, Roberts, Dennis, and Allison. 1977. Photoactivated heterobifunctional cross-linking reagents which demonstrate the aggregation state of phospholipase A2. *Biochemistry* 16: 5650
- Li, Wang, and Wu. 1997. A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86: 891
- Li, Wang, and Wu. 1998. Gelatin nanoencapsulation of protein/peptide drugs using an emulsifier-free emulsion method. *Journal of Microencapsulation* 15: 163
- Lin, Mihal, and Krueger. 1990. Introduction of sulfhydryl groups into proteins at carboxyl sites. *Biochimica et Biophysica Acta* 1038: 382
- Lin, Coombes, Davis, Davis, and Illum. 1993. Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method. *Journal of Drug Targeting* 1: 237
- Lin, Coombes, Garnett, Davies, Schacht, Davis, and Illum. 1994. Preparation of sterically stabilized human serum albumin nanospheres using a novel Dextranox-MPEG crosslinking agent. *Pharmaceutical Research* 11: 1588
- Lin, Garnett, Davies, Bignotti, Ferruti, Davis, and Illum. 1997. Preparation of surface-modified albumin nanospheres. *Biomaterials* 18: 559
- Lin, Garnett, Schacht, Davis, and Illum. 1999. Preparation and in vitro characterization of HSA-mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 189: 161

- Longo, and Goldberg. 1985. Hydrophilic albumin microspheres. *Methods in Enzymology* 112: 18
- Longo, Iwata, Lindheimer, and Goldberg. 1982. Preparation of hydrophilic albumin microspheres using polymeric dispersing agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71: 1323
- Lück, Paulke, Schröder, Blunk, and Müller. 1998. Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research* 39: 478
- Lukowski, Müller, Müller, and Dittgen. 1992. Acrylic acid copolymer nanoparticles for drug delivery: I. Characterization of the surface properties relevant for in-vivo organ distribution. *International Journal of Pharmaceutics* 84: 23
- MacAdam, Shafi, James, Marriott, and Martin. 1997. Preparation of hydrophobic and hydrophilic albumin microspheres and determination of surface carboxylic acid and amino residues. *International Journal of Pharmaceutics* 151: 47
- MacAdam, Shafi, Marriott, Martin, and James. 2000. Anti-mucus polyclonal antibody production, purification and linkage to the surface of albumin microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 15: 147
- Marchal-Heussler, Sirbat, Hoffman, and Maincent. 1993. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules in carteolol ophthalmic delivery. *Pharmaceutical Research* 10: 286
- Margel, Zisblatt, and Rembaum. 1979. Polyglutaraldehyde: A new reagent for coupling proteins to microspheres and for labeling cell-surface receptors. II. Simplified labeling method by means of non magnetic and magnetic polyglutaraldehyde microspheres. *Journal of Immunological Methods* 28: 341
- Martin, and Papahadjopoulos. 1982. Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *Journal of Biological Chemistry* 257: 286
- Marty, Oppenheimer, and Speiser. 1978. Nanoparticles-a new Colloidal Drug Delivery System. *Pharmaceutica Acta Helvetica* 53: 17

- Matousek. 1994. Aspermatogenic effect of the bull seminal ribonuclease (BS RNase) in the presence of anti-BS RNase antibodies in mice. *Animal Genetics* 25: 45
- Mattson, Conklin, Desai, Nielander, and Savage. 1993. A practical approach to cross-linking. *Molecular Biology Reports* 17: 167
- Means, Congdon, and Bender. 1972. Reactions of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate ion with amines and hydroxide ion. *Biochemistry* 11: 3564
- Meunier, Bourgerie, Mayer, Roche, and Monsigny. 1999. Optimized conditions to couple two water-soluble biomolecules through alkylamine thiolation and thioetherification. *Bioconjugate Chemistry* 10: 206
- Meyer, and Silberberg. 1978. Structure and function of mucus. *Ciba Found Symposium* 54: 203
- Molday, Dreyer, Rembaum, and Yen. 1975. New immunolatespheres: Visual markers of antigens on lymphocytes for scanning electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 64: 75
- Morimoto, and Fujimoto. 1985. Albumin microspheres as drug carriers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2: 19
- Müller, Leuenberger, and Kissel. 1996. Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting- an optimized manufacturing technique. *Pharmaceutical Research* 13: 32
- Myers, Uekun, Swaim, and Vallera. 1989. The effect of aromatic and aliphatic maleimide cross-linkers and anti-C5 ricin immunotoxins. *Journal of Immunologic Methods*. 121: 129
- Nakajima, and Ikada. 1995. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chemistry* 6: 123
- Nakamura, Yamashita, Tsume, Nadai, Sezaki, Kohno, Tabata, and Ikada. 1998. Potential efficacy of gelatin microspheres as a new adjuvant for oral vaccination. *S.T.P. Pharma Sciences* 8 (1): 67



- Narayani, and Rao. 1993. Preparation, characterisation and in-vitro stability of hydrophilic gelatin microspheres using a gelatin-methotrexate conjugate. *International Journal of Pharmaceutics* 95: 85
- Narayani, and Rao. 1996a. Biodegradable microspheres using two different gelatin drug conjugates for the controlled delivery of methotrexate. *International Journal of Pharmaceutics* 128: 261
- Narayani, and Rao. 1996b. Solid tumor chemotherapy using injectable gelatin microspheres containing free methotrexate and conjugated methotrexate. *International Journal of Pharmaceutics* 142: 25
- Neurath, and Strick. 1981. Enzyme-linked fluorescence immunoassays using beta-galactosidase and antibodies covalently bound to polystyrene plates. *Journal of Virological Methods* 3: 155
- Norde, Fraaye, and Lyklema. 1987. Protein adsorption at solid-liquid interfaces: a colloid chemical approach. in *Proteins at interfaces: Physicochemical and biochemical studies*. American Chemical Society, Washington DC.: 36
- Norman. 1995. Mechanisms of action and overview of OKT3. *Therapeutic Drug Monitoring* 17: 615
- Okuyama, and Satake. 1960. On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenylamino acids and -peptides. *The Journal of Biochemistry* 47: 454
- Orienti, Gianasi, Aiedeh, and Zecchi. 1996. Microparticles of BSA substituted with deoxycholic acid and triethylene glycol glutarate. Correlations between the physico-chemical properties of the matrix and the release kinetics. *Journal de Pharmacie de Belgique* 51: 125
- Paige, Whitcomb, Liu, and Kinstler. 1995. Prolonged circulation of recombinant human granulocyte-colony stimulation factor by covalent linkage to albumin through a heterobifunctional polyethylene glycol. *Pharmaceutical Research* 12: 1883
- Partis, Griffiths, Roberts, and Beechey. 1983. Cross-linking of protein by omega-maleido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. *Journal of Protein Chemistry* 2: 263

- Passirani, Ferrarini, Barratt, Devissaguet, and Labarre. 1999. Preparation and characterization of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently linked to poly(methylmethacrylate). *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 10 (1): 47
- Perez-Vilar, and Hill. 1999. The structure and assembly of secreted mucins. *Journal of Biological Chemistry* 274: 31751
- Perfetti, Anderson, and Hall. 1976. The chemical modification of papain with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Biochemistry* 15: 1735
- Peterman, Tarcha, Chu, and Butler. 1988. The immunochemistry of sandwich-ELISAs. IV. The antigen capture of antibody covalently attached to bromoacetyl surface-functionalized polystyrene. *Journal of Immunological Methods* 111: 271
- Rembaum, Yen, Cheong, Wallace, Molday, Gordon, and Dreyer. 1976. Functional polymeric microspheres based on 2-hydroxyethyl methacrylate for immunochemical studies. *Macromolecules* 9: 328
- Rembaum, and Yen. 1979. Synthesis and reactions of hydrophilic functional microspheres for immunological studies. *Journal of Macromolecular Science A pure and applied chemistry* 13 (5): 603
- Riddles, Blakeley, and Zerner. 1979. Ellman's reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-a reexamination. *Analytical Biochemistry* 94: 75
- Roser, and Kissel. 1993. Surface-modified biodegradable albumin nano-and microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 39: 8
- Rubino, Kowalsky, and Swarbrick. 1993. Albumin microspheres as a drug delivery system: Relation among turbidity ratio, degree of cross-linking, and drug release. *Pharmaceutical Research* 10: 1059
- Saddler, and Horsey. 1987. The new generation gelatins. A review of their history, manufacture and properties. *Anaesthesia* 42: 998
- Sashidhar, Capoor, and Ramana. 1994. Quantitation of epsilon-amino groups using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid. A simple

- spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *Journal of Immunological Methods* 167: 121
- Savage, Mattson, Desai, Nielander, Morgensen, Conklin. 1994. *Avidin-biotin chemistry: A handbook*. Pierce Chemical Company, Rockfort, Illinois, USA
- Schäfer, v. Briesen, Rübsamen-Waigmann, Steffen, Royer, and Kreuter. 1994. Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages. *Journal of Microencapsulation* 11: 261
- Scheffel, Rhodes, Natarajan, and Wagner. 1972. Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *Journal of Nuclear Medicine* 13: 498
- Sezaki, and Hashida. 1984. Macromolecular-drug conjugates in targeted cancer chemotherapy. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1: 1
- Shafi, Martin, Olliff, and James. 1995. Surface modification of albumin microspheres. *Journal of Drug Targeting* 3: 53
- Shahar, Meshulam, and Margel. 1986. Synthesis and characterization of microspheres of polystyrene derivation. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry Edition* 24: 203
- Sheu, Liu, and Sokoloski. 1991. Prolongation of drug release by covalent bonding of drugs to serum albumin microbeads. *Drug Design & Delivery* 7: 251
- Shivdasani, and Thomas. 1988. Molecular associations of IA antigens after T-B cell interactions. I. Identification of new molecular associations. *Journal of Immunology* 141: 1252
- Singh, Kats, Blattler, and Lambert. 1996. Formation of N-substituted 2-iminothiolanes when amino groups in proteins and peptides are modified by 2-iminothiolane. *Analytical Biochemistry* 236:114
- Smith, Krohn, Hermanson, Mallia, Gartner, Provenzano, Fujimoto, Goeke, Olson, and Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76

- Soderquist, and Walton. 1980. Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. *Journal of Colloid Interface Sciences* 75: 386
- Song, Labhasetwar, Cui, Underwood, and Levy. 1998. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: Results with an acute dog model. *Journal of Controlled Release* 54: 201
- Staros, Wright, and Swingle. 1986. Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical Biochemistry* 156: 220
- Steven, and Tristram. 1958. The reactivity of free amino groups in native and denatured ovalbumin towards flourodinitrobenzene. *Biochemical Journal* 70: 179
- Suzawa, Nagamura, Saito, Ohta, Hanai, and Yamasaki. 2000. Synthesis and HPLC analysis of enzymatically cleavable linker consisting of poly(ethylene glycol) and dipeptide for the development of immunoconjugate. *Journal of Controlled Release* 69: 27
- Tabata, and Ikada. 1989. Synthesis of gelatin microspheres containing interferon. *Pharmaceutical Research* 6: 422
- Tarentino, Phelan, and Plummer. 1993. 2-Iminothiolane: A reagent for the introduction of sulphhydryl groups into oligosaccharides derived from asparagine-linked glycans. *Glycobiology* 3: 279
- Terhorst, Vries, Georgopoulos, Gold, Oettgen, Pettey, Spits, Ucker, van den Elsen, and Wileman. 1986. The T cell receptor/T3 complex. *Year in Immunology* 2: 245
- Traut, Bollen, Sun, Hershey, Sundberg, and Pierce. 1973. Methyl 4-mercaptobutyrimidate as a cleavable cross-linking reagent and its application to the Escherichia coli 30S ribosome. *Biochemistry* 12: 3266
- Tröster, and Kreuter. 1988. Contact angles of surfactants with a potential to alter the body distribution of colloidal drug carriers on poly(methyl methacrylate) surfaces. *International Journal of Pharmaceutics* 45: 91
- Tsoukas, Landgraf, Bentin, Lamberti, Carson, and Vaughan. 1987. Structural and functional characteristics of the CD3 (T3) molecular complex on human thymocytes. *Journal of Immunology* 138: 3885

- Tyllianakis, Kakabakos, Evangelatos, and Ithakissios. 1994. Direct colorimetric determination of solid-supported functional groups and ligands using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 219: 335
- Uchida, Uyama, and Ikada. 1993. Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. *Langmuir* 9: 1121
- Velge-Roussel, Breton, Guillon, Lescure, Bru, Bout, and Hoebeke. 1996. Immunochemical characterization of antibody-coated nanoparticles. *Experientia* 52: 803
- Vezin, and Florence. 1980. In vitro heterogeneous degradation of poly(n-alkyl  $\alpha$ -cyanoacrylates). *Journal of Biomedical Materials Research* 14: 93
- Weltman, Johnson, Langevin, and Riester. 1983. N-succinimidyl(4-iodoacetyl)amino-benzoate: A new heterobifunctional crosslinker. *BioTechniques* : 148
- Widder, Flouret, and Senyei. 1979. Magnetic microspheres: Synthesis of a novel parenteral drug carrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 68: 79
- Widder, Marino, Morris, Howard, Poore, and Senyei. 1983a. Selective targeting of magnetic albumin microspheres to the Yoshida sarcoma: Ultrastructural evaluation of microsphere disposition. *European Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 19: 141
- Widder, Morris, Poore, Howard, and Senyei. 1983b. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: Total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. *European Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 19: 135
- Widder, Senyei, and Scarpelli. 1978. Magnetic microspheres: A model system of site specific drug delivery in vivo. *Proceedings- Society for Experimental biology and Medicine* 158: 141
- Wiechelman, Braun, and Fitzpatrick. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 175: 231

- Wilkins, and Myers. 1966. Studies on the relationship between the electrophoretic properties of colloids and their blood clearance and organ distribution in the rat. *British Journal of Experimental Pathology* 47: 568
- Wu, and Lee. 1993. Preparation and characterization of thermal- and pH-sensitive nanospheres. *Pharmaceutical Research* 10: 1544
- Yoshioka, Hashida, Muranishi, and Sezaki. 1981. Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung: Nano- and microspherical carriers of gelatin. *International Journal of Pharmaceutics* 8: 131
- Zahler, and Cleland. 1968. A specific and sensitive assay for disulfides. *Journal of Biological Chemistry* 243: 716
- Zobel, Kreuter, Werner, Noe, Kümel, and Zimmer. 1997. Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Development* 7: 483

## 7 Lebenslauf

Name Carolin Helene Sigrid Weber  
Adresse Im Reichen Winkel 34b 93057 Regensburg  
Geburtsdatum 20.05.1972  
Geburtsort Langenhagen / Hannover  
Familienstand ledig

### *Schulbildung:*

1978-1980 Grundschule Keilberg / Regensburg  
1980-1982 Grundschule Sallerner Berg / Regensburg  
1982-1991 Werner-von-Siemens-Gymnasium / Regensburg  
Juli 1991 Abitur in den Fächern Mathematik, Englisch, Erdkunde und Physik

### *Studium und Qualifikationen:*

1991-1996 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg  
Famulatur Aesculap-Apotheke, Regensburg  
Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg  
1. Staatsexamen September 1993  
2. Staatsexamen April 1996  
Förderpreis 1996 des Vereins ehemaliger Studierender der  
Universität Regensburg  
1996-1997 Praktisches Jahr  
1. Halbjahr Haupt-Pharma, Wolfratshausen  
2. Halbjahr Aesculap-Apotheke, Regensburg  
Juni 1997 3. Staatsexamen  
Juli 1997 Approbation als Apothekerin  
Seit 1997 Promotion am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

*Wissenschaftliche Veröffentlichungen:*

- Weber, Michaelis, Vogel, Kreuter, Cinatl, and Langer. 1999. Simple and efficient method for the detection of diethylenetriaminepentaacetic acid. *Journal of Chromatography B* 736: 299
- Weber, Coester, Kreuter, and Langer. 2000. Desolvation Process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 194: 91
- Langer, Coester, Weber, von Briesen, and Kreuter. 2000. Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 49: 303
- Weber, Kreuter, and Langer. 2000. Desolvation Process and surface characteristics of HSA-Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 196: 197
- Weber, Reiss, Langer. 2000. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. *International Journal of Pharmaceutics*. 211: 67
- Michaelis, Langer, Weber, Vogel, Dörr, Kreuter, and Cinatl. Biological action of DTPA covalently linked to peptidic drug carrier systems in vitro. *submitted*