

Self Assembly von protaminbasierten Oligonukleotid-Nanopartikeln

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Dirk Lochmann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2004
(DF1)

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

Dekan:	Prof. Dr. Harald Schwalbe
1. Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Zimmer
2. Gutachter:	Prof. Dr. Theodor Dingermann
3. Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Bernkop-Schnürch
Datum der Disputatio:	14.12.2004

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der Karl-Franzens-Universität in Graz angefertigt.

Mein Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Andreas Zimmer für die Überlassung des Themas sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit. Trotz der großen Entfernung zwischen den Instituten war er immer mit Rat und Tat bereit, uns zu unterstützen, und hat mich oftmals an seinem Grazer Institut herzlich empfangen und in seinem Haus beherbergt. Ohne diese außergewöhnliche Einsatzbereitschaft wäre es sicher nicht möglich gewesen, diese Arbeit so positiv zu beenden.

Frau Prof. Jennifer B. Dressman und Herrn Prof. Jörg Kreuter gilt mein Dank für die Bereitstellung der instrumentellen Möglichkeiten und Räumlichkeiten am Institut für pharmazeutische Technologie.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe: Christiane Georgens, Ingo Jennes, Anke Rohmann, Tanja Paukert und Jörg Weyermann für ihre Unterstützung, das gute "Laborklima" und die schönen Jahre.

Mein Dank gilt auch ganz besonders Herrn Manfred Ruppel, der mir die Welt der Elektronenmikroskopie näher gebracht hat. Er hat mit seinem hervorragenden Fachwissen, aber auch darüber hinaus mit seiner Menschlichkeit viel für mich getan.

Frau Dr. Ruth Prassl sein herzlichst gedankt, welche mir an der Österreichischen Akademie der Wissenschaften mit viel Geduld die Methode der SAXS gezeigt hat und durch Ihre Messungen grundlegende Erkenntnisse zu dieser Arbeit geliefert hat.

Mein herzlichen Dank gilt Norbert Dinauer, der diese Arbeit durch Zellversuche unterstützt hat und durch seine rege Diskussionsbereitschaft sehr zum Gelingen beigetragen hat. Mit Norbert zu arbeiten war darüber hinaus ein immer großer Spaß.

Bei "unsern" Biophysikern Prof. Dieter Schubert und Dr. Vitali Vogel bedanke ich mich, dass sie mir das Denken und Arbeiten in der Physik vortrefflich vermittelt und immer durch Diskussion und Meßtechnik meine Arbeit unterstützt haben. Auch sein an dieser Stelle Prof. Ulrich Schubert und Daan Wouters von der TU Eindhoven gedankt, die mich so herzlich als Gast in ihr Institut aufgenommen haben und mir ermöglicht haben AFM Messungen durchzuführen.

Meine Anerkennung verdient Herr Heinz Schewe für seine Hilfestellung am konfokalen Laserscanmikroskop und Transmissions Elektronen Mikroskop.

Allen Mitarbeitern des Institutes für pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt, insbesondere Elisabeth („Sissy“) Herbert, Dr. Claus-Dieter Herzfeldt, Birgit Johann, Dr. Klaus Langer, Christine Maurer, Sylvia Niederdorf, Gisela Stöckel, Norman Storm und Marion Weiser danke ich für die praktische Unterstützung.

Meinen herzlichsten Dank gilt Markus Wolkenhauer, der meine Arbeit durch AFM, SAXS, Spaß, Geist und Freundschaft sehr bereichert hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Kollegen Jörg Weyermann, der durch seine exzellente wissenschaftliche Arbeit diese Arbeit in dieser Form erst ermöglicht hat, durch den Spaß im Labor meine Promotionszeit bereichert hat und auf den ich mich in schwierigen Situationen immer verlassen konnte. Danke Jörg, Du warst mir mehr als ein Kollege, Du warst ein echter Freund!

Ich danke Holger, Rainer, Ingrid und Harald für die Korrekturen in den Manuskripten, für ihre stete Diskussionsbereitschaft und für ihre jahrelangen Unterstützung. Ihr wart immer für mich da - Vielen Dank!

Ganz zum Schluss möchte ich mich bei "meiner" Anke bedanken, die mich die ganze Zeit ermutigt, verstanden, ertragen und liebevoll unterstützt hat. Ohne Sie hätte ich nicht die Kraft, den Mut und die Ausdauer gehabt diese Arbeit zu beenden - Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Nukleinsäuren	3
2.1.1	Historie	3
2.1.2	DNA	3
2.1.3	RNA	6
2.2	Protamin	6
2.2.1	Biochemie des Protamins	7
2.2.2	Physikochemische Eigenschaften	7
2.2.3	Interaktion mit chromosomaler DNA	9
2.3	Oligonukleotide	13
2.3.1	Wirkungsmechanismen der Oligonukleotide	14
2.3.1.1	Antisense-Oligonukleotide (mRNA Translationsarrest)	14
2.3.1.2	RNase H Aktivität	14
2.3.1.3	Ribozyme	15
2.3.1.4	RNA interference	15
2.3.1.5	Tripelhelix-Bildung	15
2.3.1.6	Aptamere	16
2.3.1.7	CpG Motive	16
2.3.2	Probleme mit Oligonukleotiden als Arzneistoff	17
2.3.3	Chemische Modifikationen der Oligonukleotide	18
2.3.3.1	Phosphorothioate	19
2.3.3.2	2'-O-Methoxyethyl-Ester	20
2.3.3.3	Morpholino-Oligonukleotide	20
2.3.4	Therapeutischer Einsatz von Oligonukleotiden	21
2.4	Drug Delivery Systeme für Oligonukleotide	22
2.4.1	Liposomen	23
2.4.2	Virale Hüllkapside (virus like particles / viral capsoids)	26
2.4.3	Nanopartikel	27
2.4.3.1	Nanopartikel aus synthetischen Makromolekülen	27
2.4.3.1.1	Polyalkylcyanoacrylate	27
2.4.3.1.2	Polyalkylmethacrylate	29
2.4.3.1.3	Polystyrol	29
2.4.3.1.4	Polyvinylpyrolidon, Polyvinylalkohol	30
2.4.3.1.5	Poly(laktit-co-glycolid)	30

2.4.3.1.6 Polyethylenimin	30
2.4.3.2 Nanopartikel aus natürlichen / semi-synthetischen Makromolekülen	31
2.4.3.2.1 Poly-L-Lysin	32
2.4.3.2.2 Protamin	33
2.4.3.2.3 Polyarginin	35
2.4.3.2.4 Albumine	35
2.4.3.2.5 Gelatine	36
2.4.3.2.6 Polymilchsäure	36
2.4.3.2.7 Weitere Peptide	36
3 ZIEL DER ARBEIT	37
4 VERÖFFENTLICHTE ORIGINALARBEITEN	39
4.1 Dirk Lochmann*, Edith Jauk*, Andreas Zimmer; Drug Delivery of Oligonucleotides by Peptides; <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> , 58 (2), (2004) page 237-251	39
4.2 Dirk Lochmann, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Norbert Dinauer, Hagen von Briesen, Jörg Kreuter, Dieter Schubert, Andreas Zimmer; Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles; <i>Journal of Microencapsulation</i> , in press (2004)	39
4.3 Anke Rohmann, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Wolf M. Bertling, Theodor Dingermann, Andreas Zimmer; Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185 ^{erbB-2} ; <i>Oligonucleotides</i> , 1 (2004) page 1-9	40
4.4 Dirk Lochmann, Sylvia Stadlhofer, Jörg Weyermann, Andreas Zimmer; <i>New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent</i> ; <i>International Journal of Pharmaceutics</i> , 283 (1-2), (2004) page 11-17	40
4.5 Norbert Dinauer, Dirk Lochmann, Ilhan Demirhan, Andreas Zimmer, Angelika Chandra, Jörg Kreuter, Hagen von Briesen; Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation; <i>Journal of Controlled Release</i> 96 (2004) 497-507	41
4.6 Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Christiane Georgens, Ruth Prassl, Andreas Zimmer; Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation; <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> , in press (2004)	41
4.7 Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer; Comparison of <i>in vitro</i> cytotoxicity assays; <i>International Journal of Pharmaceutics</i> ; in press (2004)	42

4.8	Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Christiane Georgens, Andreas Zimmer; Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect; <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> , in press (2004)	42
4.9	Jörg Weyermann*, Dirk Lochmann*, Christiane Georgens, Isam Rais, Jörg Kreuter, Michael Karas, Markus Wolkenhauer, Andreas Zimmer; Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy; <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> , 58 (1), (2004) 25-35	43
4.10	Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer; Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems, <i>Journal of Controlled Release</i> ; 100 (3), (2004) page 411-423	43
5	ZUSAMMENFASSENDER DARSTELLUNG	44
6	ADDENDUM	65
7	PRÄSENTATIONEN	67
7.1	Poster	67
7.2	Vorträge	69
8	LEBENS LAUF	71
9	LITERATURVERZEICHNIS	73
10	ANHANG (I-XI)	83

Abkürzungsverzeichnis

2'-MOE	2'-O-Methoxyethylester modifiziertes Oligonukleotid
A	Adenin
A'	Alanin
AFM	atomic force microscopy
AlPrO	Albumin Protamin Oligonukleotid Nanopartikel
BCA	bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cHSA	kationisiertes Humanes Serum Albumin
CLSM	confocal scanning microscopy
CMV	Cytomegalie Virus
DC-Chol	3 β -(N-(N',N'-dimethylaminoethan)carbamoyl)cholesterol
DDS	Drug Delivery System
DEAE	Diethylaminoethyl
DLS	dynamic light scattering
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOGS	Diocetylamidoglycylspermin
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat
DOTMA	N-[1-(2,3 dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
ds	doppelsträngig
DTAF	5-([4,6-Dichlorotriazin-2-yl]amino)fluorescein
EGF	epidermal growth factor
F	Phenylalanin
FCS	fluorescence correlation spectroscopy
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
G'	Glycin
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	human immunodeficiency virus
HSA	Humanes Serum Albumin
HSV	Herpes Simplex Virus

Abkürzungsverzeichnis

I	Isoleucin
K	Lysin
LDH	Laktatdehydrogenase
LMLV	large multilamellar vesicle
LUV	large unilamellar vesicle
M	Methionin
MALDI TOF	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
MLV	multilamellar vesicle
MO	Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligonukleotid
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mRNA	messenger-RNA
NAC	N-Acetylcystein
NLS	nuclear localisation sequence
NMR	nuclear magnetic resonance
NP	Nanopartikel
NPH	Neutrales Protamin Hagedorn
ON	Oligonukleotide
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
P	Prolin
PAEMC	Polyaminoethylmethacrylate
PAHMAC	Polyaminoethylmethacrylamide
PAHMC	Polyaminohexylmethacrylate
PBCA	Polybutylcyanoacrylate
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDMAEMA	Poly (2-dimethylamino) ethylmethacrylate
PEI	Polyethylenimin
PIBCA	Polyisobutylcyanoacrylate
PIHCA	Polyisohexylcyanoacrylate
PHCA	Polyhexylcyanoacrylate
PFB	Protamin freie Base
PLA	Polymilchsäure
PLGA	Poly (lactic-co-glycolidsäure)
PLL	Poly-L-Lysin

Abkürzungsverzeichnis

PMMAEMA	Polymonomethylaminoethylmethacrylate
PNA	peptide nucleic acid
PS	Polystyrol
PTMAEMC	Poly-N-trimethylaminoethylmethacrylate
PTO	Phosphorothioate
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Arginin
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rRNA	ribosomale RNA
S	Serin
SAX-HPLC	strong anion exchange high performance liquid chromatography
SAXS	small angle x-ray scattering
SEM	scanning electron microscopy
siRNA	small interfering RNA
SUV	small unilamellar vesicles
T	Thymin
T'	Threonin
TRITC	Trimethylrhodaminisothiocyanat
siRNA	small interfering RNA
tRNA	transfer RNA
U	Uracil
V	Valin
VLP	Virus like particle
Y	Tyrosin

1 Einleitung

"Das Nuclein ist nun aber im Samen nicht frei enthalten, sondern in einer unlöslichen, salzartigen Verbindung mit einer organischen Base, dem Protamin."

Johann Friedrich Miescher (1874)

Johann Friedrich Miescher (1844-1895) isolierte im Jahre 1869 in der Küche von Schloss-Hohentübingen, in dem in diesen Jahren das Institut für Physiologie untergebracht war, einen Stoff aus menschlichen Eiterzellen, welchen er "Nuclein" nannte (Miescher, 1871a, b). Zu dieser Zeit war noch nicht klar, welche Funktion diese Stoffgruppe in den Zellen hat. Erst im Jahre 1944 konnte einwandfrei bewiesen werden, dass die Nukleinsäuren und nicht die Proteine Träger der Erbinformation sind (Avery et al., 1944).

Miescher untersuchte in den folgenden Jahren Samenfäden des Rhein-Lachses und fand neben den Nukleinsäuren eine neue organische Base, das "Protamin". Dieses liegt in Spermien in einem dichten Komplex mit den Nukleinsäuren vor (Miescher, 1874a, b).

Das Prinzip der Komplexbildung zwischen Protamin und DNA, welche hier zum ersten Mal beschrieben wurde, ist in diese Arbeit aufgenommen worden, um ein Self-Assembling-Nanopartikel-System aus Protamin und Oligonukleotiden zu entwickeln. Oligonukleotide sind potentielle Arzneistoffe zur Behandlung von viralen Infektionen, Krebserkrankungen oder genetischbedingter krankhafter Defekte und können als hochpotente Immunstimulantien eingesetzt werden (CpG-Motive). Diese synthetischen Nukleotidsequenzen bestehen aus mindestens 15 Ribo- bzw. Desoxyribonukleotiden, einzelsträngig oder doppelsträngig (siRNA), die sequenzspezifische Inhibitoren der Genexpression darstellen. Ausnahme hierbei sind die Aptamere, welche an Proteinstrukturen binden, und die zuvor erwähnten CpG-Oligonukleotide.

Zur Zeit sind 24 Substanzen dieser Arzneistoffklasse in der klinischen Prüfung und werden teilweise in den nächsten Jahren für den Arzneimittelmarkt zugelassen. Aufgrund der Instabilität gegenüber Exo- und Endonukleasen sind diese Oligonukleotide chemisch modifiziert worden, was jedoch zur Abnahme der sequenzspezifischen Wirkung führen kann (Stein, 1996). Daneben sind sie schlecht membrangängig und gelangen nur zu einem geringen Maße an ihren Wirkort im Inneren der Zelle (Kabanov et al., 1995).

Oligonukleotide als hochgeladene, instabile Makromoleküle mit ihren intrazellulären Target-Strukturen stellen somit eine große Herausforderung für die Pharmazeutische Technologie dar.

Lösungen hierfür könnten unmodifizierte Oligonukleotide bieten, die in Zellen verbracht mittels eines Drug Delivery Systems (DDS) wie zum Beispiel Nanopartikel transportiert werden. Nanopartikel formulierungen können Oligonukleotide effektiv gegenüber einer nukleären Degradierung schützen und zusätzlich die intrazelluläre Bioverfügbarkeit erhöhen (Couvreur et al., 2000; Fattal et al., 1998).

Viele etablierte DDS z.B. auf Basis von kationischen Liposomen zeigen eine deutliche Zytotoxizität. Daher richtet sich der Focus dieser Arbeit auf die Formulierung von Oligonukleotid-Nanopartikeln basierend auf Peptiden und Proteinen in der Hoffnung, dass diese durch Proteasen intrazellulär in untoxische Aminosäuren und/oder Peptidfragmente abgebaut werden und von der Zelle nachfolgend verstoffwechselt werden können.

Protaminbasierte Oligonukleotid-Nanopartikel wurden hergestellt, physikochemisch charakterisiert und auf ihre Zytotoxizität, Zellaufnahme und *in vitro*-Wirksamkeit in verschiedenen zellulären Modellen untersucht.

135 Jahre nach den beiden beachtlichen Entdeckungen Mieschers wurden beide Substanzklassen zu einer Nanopartikel-Formulierung zusammengeführt, um ein nicht toxisches Drug Delivery System zum effektiven Transport von Oligonukleotiden in eukaryotische Zellen zu entwickeln.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Nukleinsäuren

2.1.1 Historie

Die Nukleinsäure-Forschung begann im Jahre 1869 mit dem Baseler Pathologen Johann Friedrich Miescher (1811-1887), welcher die Nukleinsäuren als eine Substanzklasse entdeckte und isolierte.

Erst 1944 konnte Avery und seine Gruppe einwandfrei zeigen, dass die DNA und nicht das Protein der Träger der genetischen Information ist (Avery et al., 1944).

Um zu einem geeigneten Modell für die Funktionalität der DNA zu gelangen, musste ein räumliches Modell der DNA gefunden werden.

Die Publikation vom 25. April 1953 der Biochemiker Watson und Crick beschreibt zum ersten Mal die Struktur der DNA als hochmolekulare Polynukleinsäure angeordnet als Doppelhelix (Watson et al., 1953b). In der gleichen Ausgabe des Fachmagazins „nature“ konnten der Biophysiker Wilkins und seine Kollegen evidente Daten vorlegen, welche die Existenz dieser doppelhelikalen DNA *in vivo* beschrieben (Wilkins et al., 1953). Weiterhin publizierten Franklin und Gosling in dieser Ausgabe von „nature“ weitere Belege durch Röntgenstrukturanalysen für die helikale Struktur der DNA, welche den eigentlichen Beleg für Watson und Cricks These lieferten (Franklin et al., 1953b). Eine weitere Arbeit vom 30. Mai 1953 von Watson und Crick enthält Spekulationen über die Replikation der DNA (Watson et al., 1953a). Am 25. Juli 1953 publizierten Franklin und Gosling detaillierte Modelle für die A- und B-Form der DNA (Franklin et al., 1953a).

Watson, Crick und Wilkins erhielten im Jahre 1962 für ihre "Entdeckung über die Molekularstruktur der Nukleinsäuren und ihre Bedeutung für die Informationsübertragung in lebender Substanz" den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

2.1.2 DNA

Die Desoxyribonukleinsäure oder auch desoxy ribonucleic acid (DNA) ist, wie zuvor beschrieben, der molekulare Träger der Erbinformation. Dieser Begriff beschreibt kein bestimmtes Molekül, sondern vielmehr eine Molekülklasse, die in den

unterschiedlichsten Varianten im Kern und in den Organellen der einzelnen Zellen vorkommt.

Die monomeren Bausteine der DNA werden Desoxynukleotide genannt. Jeder dieser Bausteine besteht aus drei Komponenten, einer Purin- (Adenin oder Guanin) oder Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin), einer Desoxyribose und einem Phosphatrest.

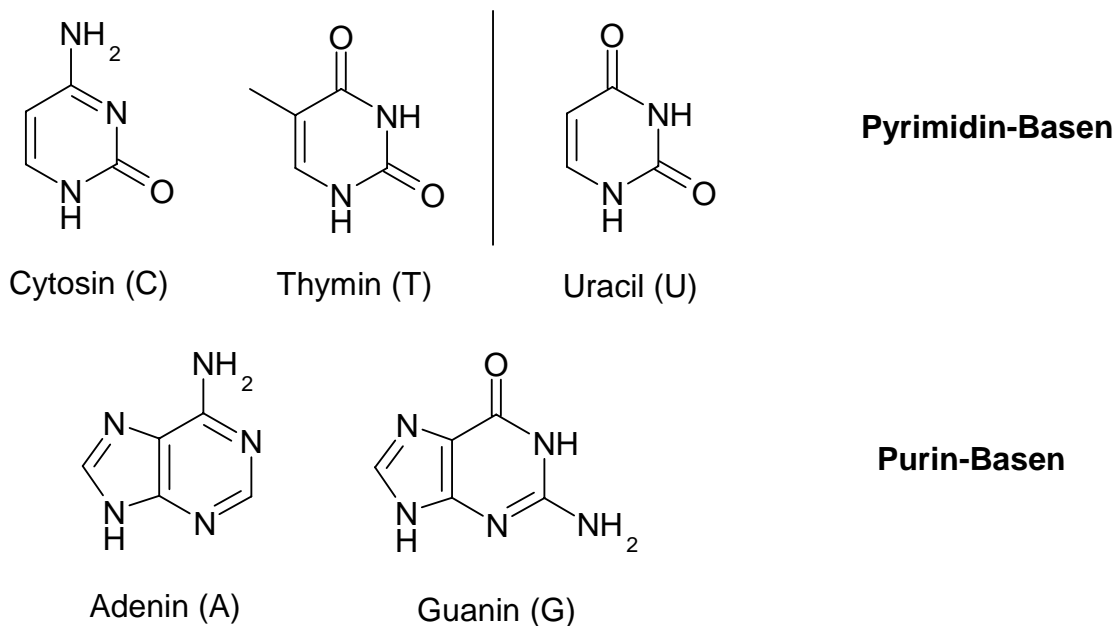


Abbildung 1: Basenbausteine der DNA und RNA

Die Verknüpfung der Nukleotidbausteine erfolgt als Phosphodiesterbrücke über die 5'- und über die 3'-OH-Gruppen der Desoxyribose. Demzufolge hat jede Kette ein 5'- und ein 3'-Ende, wobei das 5'-Ende als Anfang und das 3'-Ende als das DNA-Ende bezeichnet werden.

Nukleotide sind paarweise zueinander komplementär. Die komplementären Nukleotidpaare Adenosin (A) und Thyrosin (T) werden durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen den Basen stabilisiert. Dagegen bildet das komplementäre Nukleotidpaar Guanin (G) und Cytosin (C) drei Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aus, sodass diese Paarung stabiler ist als die zwischen A und T, was z.B. sich in der erhöhten Schmelztemperatur von G/C-reichen DNA-Doppelhelices ausdrückt.

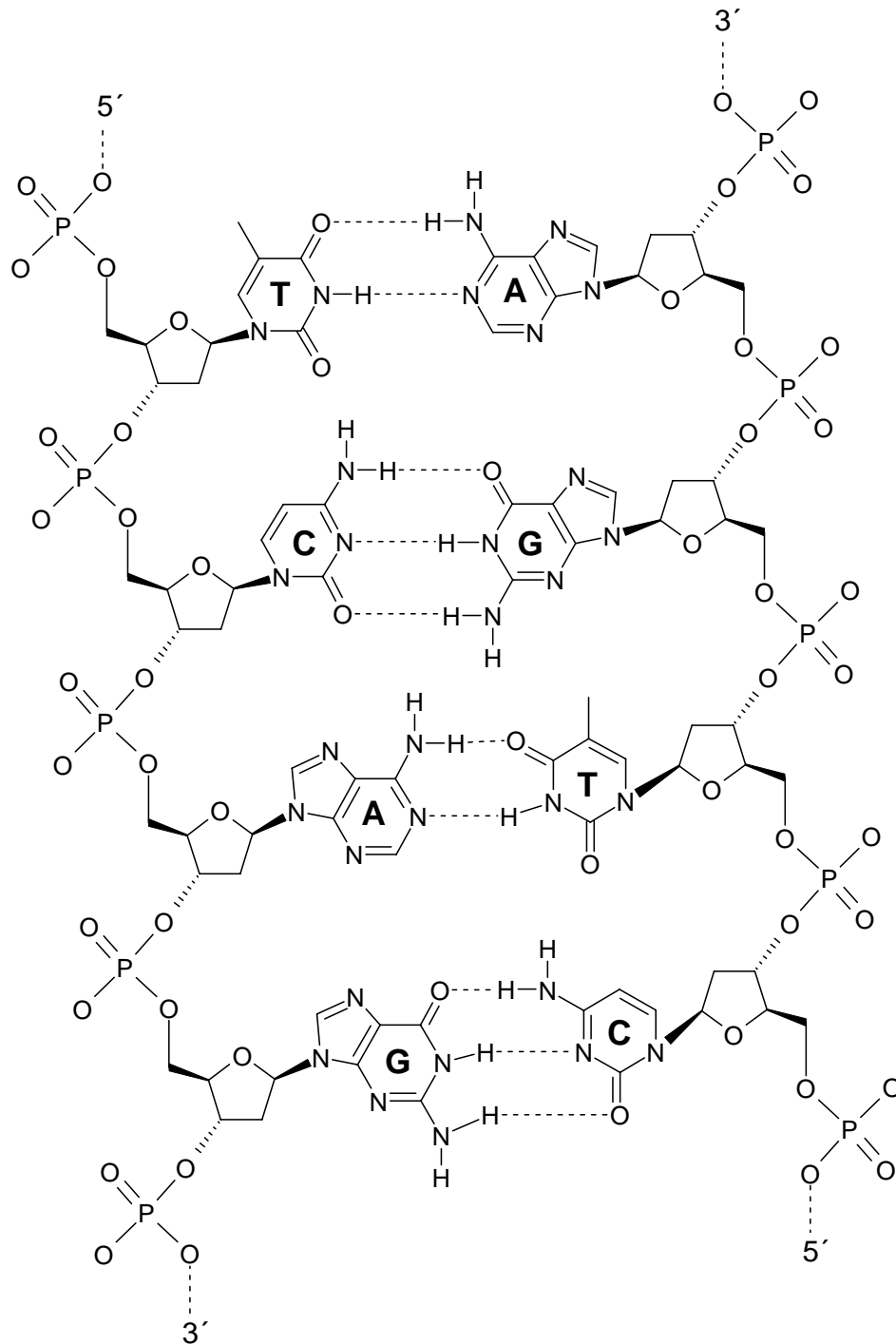


Abbildung 2: DNA-Doppelstrang modifiziert nach Watson und Crick

Komplementäre Nukleinsäurestränge sind immer antiparallel zueinander angeordnet, d.h. am Ende eines Nukleinsäure-Doppelstranges befindet sich das 5'-Ende des einen und das 3'-Ende des komplementären anderen Nukleinsäurestranges (Dingermann, 1999; Stryer, 1996).

2.1.3 RNA

Neben der DNA gibt es noch weitere Nukleinsäuren. Die Ribonukleinsäuren (RNA) tragen eine weitere Hydroxid-Gruppe an den Zuckerkomponenten des Moleküls (Ribose). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass RNA kein Thymin, sondern Uracil, eine weitere Pyrimidinbase, enthält, welche komplementär zu Adenin ist.

Grundlegend kann man RNA in drei funktionelle Gruppen unterteilen, (I) die ribosomale-RNA (rRNA), welche Basis für die Ribosomen ist, (II) die transfer-RNA (tRNA), welche die Triplet-Information in Verbindung mit einer spezifischen Aminosäure trägt, und (III) die messenger-RNA (mRNA), welche oftmals nach Prozessierung die Information eines Gens für ein bestimmtes Protein codiert in Basen-Tripplets enthält.

Die mRNA stellt, wie später noch näher beschrieben, eines der wichtigsten Targets für Antisense-Oligonukleotide dar (Dingermann, 1999; Stryer, 1996).

2.2 Protamin

Ende des 19. Jahrhunderts wurden erste Protamin-Studien vom Biochemiker Johann Friedrich Miescher an Spermien des Rhein-Lachses durchgeführt (Miescher, 1874a). Er fällte eine stickstoffhaltige Base als Doppelsalz mit Platinchlorid und nannte diese Verbindung „Protamin“. Die Gruppe um den deutschen Forscher Kossel erkannte im Jahr 1884 die Proteinstruktur und isolierte die Aminosäuren Arginin und Histidin aus dem stark basischen Molekül. Anhand von Protamin wurden viele grundlegende Techniken wie z.B. Picrat-Fällungen für die Proteinchemie entwickelt (Ando et al., 1973).

1936 veröffentlichte H.C. Hagedorn ein neues Konzept zur Retardierung von Insulin-Zubereitungen. Hierbei wurde Insulin mit NPH (Neutrales Protamin Hagedorn) versetzt. Die meisten heute gebräuchlichen Verzögerungsinsuline beinhalten Protaminsulfat in Verbindung mit Zinkionen als Formulierung (Ammon et al., 2000).

Eine zweite etablierte Anwendung für Protamin ist der Einsatz bei einer Heparin-Überdosierung als Antidot. Hierbei wird das Protaminhydrochlorid verwendet (Protamin „Roche“[®]-Amp.). Heparin, ein polyanionisches Mucopolysaccharid, wird als Antikoagulant eingesetzt. Bei Intoxikation mit Heparin kann das polykationische Protamin das Polyanion Heparin komplexieren (Harrow, 1984).

2.2.1 Biochemie des Protamins

Protamine sind basische Peptide (Isoelektrischer Punkt $pH \sim 12$) mit einem Molekulargewicht von 4000–10000 Dalton und einer durchschnittlichen Länge von etwa 30-35 Aminosäuren pro Molekül. Größere Moleküle sind möglich, die vor allem in Protaminen von Säugetieren zu finden sind. Protamine haben globuläre Gestalt (Arellano et al., 1988). Während der Spermiogenese werden nukleäre Histone allmählich durch neusynthetisiertes spermienpezifisches Protamin ersetzt (Rodman et al., 1984). Histone sind in somatischen Zellen lokalisiert (Knippers et al., 1978), hingegen sind Protamine ausschließlich in Spermazellen aufzufinden. Protamine wurden in Sperma von Geflügel, Säugetieren und vor allem in Fischen gefunden und charakterisiert. Es bindet an DNA-Stränge und bewirkt dadurch eine dichte Packung des Erbguts in die Sperminen, einen Schutz vor Degradation der chromosomalen DNA und zusätzlich eine Inhibition der Genexpression.

Protamin weist ein geringes allergisierendes Potential auf (Horrow, 1984). Ein Grund hierfür könnte das gänzliche Fehlen von aromatischen Aminosäuren sein. Auch kommt es bei Protamin selbst bei drastischer Veränderung der Temperatur zu keiner Denaturierung der Peptide (Ando et al., 1973). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch eine Expression von IgG und IgE bei einer einmaligen intravenösen Gabe von Protamin (Nyhan et al., 1996). Inwieweit dieser Befund eine Bedeutung für eine Therapie mit Protamin trägt, ist noch zu diskutieren, da es jahrzehntelange Erfahrungen mit Protamin-Insulin-Formulierung gibt, bei denen die Immunisierung der Patienten nicht von Relevanz ist (Ammon et al., 2000).

Die Wirkung von Protamin als Inhibitor der Angiogenese wurde zusätzlich beschrieben (Taylor et al., 1982).

Hervorzuheben ist, dass Protamin eine nukleäre Lokalisationssequenz beinhaltet (NLS), welches intrazellulär die Peptide in den Nukleus transportieren lässt. Dies ist ein wichtiger Fakt für spätere Entwicklungen von Drug Delivery Systemen von Oligonukleotiden (Noguchi et al., 2002).

2.2.2 Physikochemische Eigenschaften

Protamine werden nach der Tierspezies, aus deren Sperma es extrahiert wurde, benannt zum Beispiel „Salmin“ aus dem Lachsfisch. Protamin ist kein klar definiertes Peptid pro Spezies sondern ein Peptid-Gemisch, welches durch chromatographische

Verfahren in verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden kann. Wobei gezeigt wurde, dass die einzelnen Fraktionen die gleiche Bindungsfähigkeit zu DNA aufweisen (D'Auria et al., 1993). Allen Protaminen, ob enthalten in Säugetiersperma (Bianchi et al., 1994; Bianchi et al., 1992) oder Fischsperma, ist gemein, dass sie Regionen mit zusammenhängenden Argininsequenzen beinhalten (Hud et al., 1994). Im Weiteren werden nur Protamine aus Fischsperma, vor allem aus Lachs beschrieben, da diese in unseren eigenen Studien verwendet wurden.

Protamin und DNA liegen im Massenverhältnis von 40:60 in den Spermien vor. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um den Frankfurter Wissenschaftler Felix aus dem Jahre 1951 an Fisch-Protaminen ergaben, dass das molare Verhältnis Arginin (aus dem Protamin) zu Phosphat (aus dem DNA-backbone) 1:1 beträgt, was zu der Annahme führte, dass es elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphaten und den positiv geladenen Argininresten des Protamins gibt (Ando et al., 1973).

Protamine unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung zwischen den verschiedenen Fischarten nur in einer geringen Variationsbreite. Grundlegend haben Protamine aus Fischen gemein:

- Es sind nur wenige verschiedene Aminosäurebausteine enthalten.
- Arginin (R) und Serin (S) sind in allen bis jetzt untersuchten Protaminen enthalten.
- Prolin (P) und Valin (V) sind in den meisten Protaminen enthalten.
- Glycin (G) und Isoleucin (I) sind in vielen Protaminen enthalten.
- Threonin (T) kommt in manchen Protaminen vor.
- Nur sehr wenige Protamine enthalten saure Aminosäuren oder das basische Lysin (K).
- Als einzigstes weist das Thunfisch-Protamin die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) auf.

Exemplarisch hierfür sind die Aminosäuresequenzen und die Aminosäure-Anzahl der Fraktionen des von uns verwendeten Protamins (Salmin, aus Lachs) in Tabelle I dargestellt. Die unterschiedlichen Fraktionen des Protamins eines Fisches, sowie die Protaminegemische der einzelnen Fische weisen untereinander große Homologien

auf. Auch ist die Verteilung des Arginins in der Aminosäuresequenz in den verschiedenen Protaminen annähernd deckungsgleich.

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen und Aminosäureverteilung in den drei Fraktionen (A I, A II, C II) des Protamins gewonnen aus Lachs-Spermien, [National Center for Biotechnology Information (NCBI) Datenbank in Bethesda, USA]

Aminosäuresequenz		Aminosäurenanzahl							
		R	S	P	V	G´	I	A´	M
A I	¹ PRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR ³²	21	4	3	2	2	-	-	-
A II	¹ PRRRRSSSRPIRRRRPRRASRRRRRGGRRRR ³²	21	4	3	-	2	1	1	-
C II	¹ MPRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR ³³	21	4	3	2	2	-	-	1

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass durch das Fehlen von aromatischen Aminosäuren diese Peptid-Gruppe nicht mittels UV-Spektroskopie um 280 nm quantifiziert oder detektiert werden kann (Ando et al., 1973). Als Standard wird die *SAKAGUCHI*-Farbreaktion für die Quantifizierung von Protamin verwendet (Weber, 1929). Eine neue Fluoreszenzquantifizierung in 96-well Mikrotiter-Platten wurde in der vorliegenden Arbeit entwickelt, um die Nachweisgrenze zu senken und schnelle Nachweise ohne Trennung zu ermöglichen (Lochmann et al., 2004a).

Generell bildet Protamin mit Nukleinsäuren, Polysacchariden, Fettsäuren und Proteinen schwerlösliche Komplexe, welche durch erhöhte Salzkonzentrationen (4N NaCl-Lösung) voneinander dissoziiert werden können (Ando et al., 1973).

2.2.3 Interaktion mit chromosomaler DNA

Das Wissen über die Interaktion des Protamins mit chromosomaler DNA ist von elementarer Wichtigkeit für das weitere Verständnis der Interaktion zwischen Oligonukleotiden und Protamin in einem Drug Delivery System.

Untersuchungen von Bradbury et al. aus dem Jahre 1967 zeigten, dass Protamin an chromosomale DNA stärker bindet als vergleichsweise Poly-Arginin oder Poly-Lysin. Dies führte zu dem Schluss, dass die neutralen Aminosäuren einen Einfluss auf die sterische Anordnung des DNA/Protamin-Komplexes haben müssen. Dieser Effekt

war jedoch nur in isotonischer wässriger Lösung zu beobachten. Bei der Verwendung von denaturierter DNA oder anderen Ionenstärken nivellierte sich dieser Effekt, was zusätzlich auf eine sterische Begünstigung der DNA/Protamin-Komplexes gegenüber Peptiden aus rein basischen Aminosäuren spricht (Ando et al., 1973). Auch spielt der Phosphorylisierungsgrad des Protamin eine evidente Rolle in der Bindungsstärke an die DNA (Willmitzer et al., 1980).

Es gibt vier Modelle zur Zusammensetzung und räumlichen Ausrichtung des Protamin-DNA-Komplexes aus den Jahren 1955 bis 1970. Diese Modelle wurden anhand von Fischprotaminen erarbeitet (Ando et al., 1973).

Modell 1, basierend auf Röntgenstrukturanalysen von Feughelman, Wilkins und Zubay (1955 bis 1962):

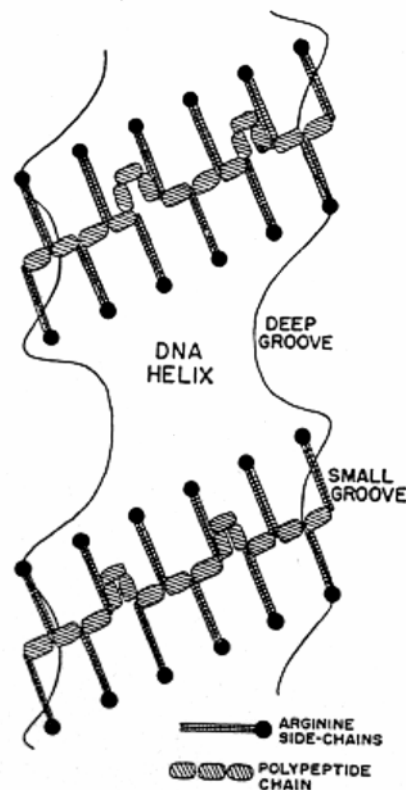


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Protamin-DNA-Bindung nach Modell 1. Die Polypeptidkette windet sich um die schmale Furche der DNA-Helix. Hierbei weisen die Phosphatreste der DNA nach außen und interagieren über ionische Wechselwirkungen mit den basischen Enden (schwarze Punkte) der Argininreste. Neutrale Bereiche des Protamins sind als Faltung in der Polypeptidkette dargestellt.

Protamin windet sich um die kleine Furche der DNA, dabei interagieren die Guanidinreste des Arginins wechselseitig mit den Phosphaten zweier DNA-Stränge in einer ionischen Wechselwirkung (Abbildung 3).

Modell 2, von Luzzati und Nicolaieff (1963):

Hier liegt die Vorstellung zu Grunde, dass die DNA als hexagonale Stäbe vorliegt und die Zwischenräume mit Protamin und Wasser aufgefüllt sind, so dass dies ein unbegrenztes Netzwerk ergibt. Hierbei bindet Protamin über die große Furche an die DNA (Abbildung 4).

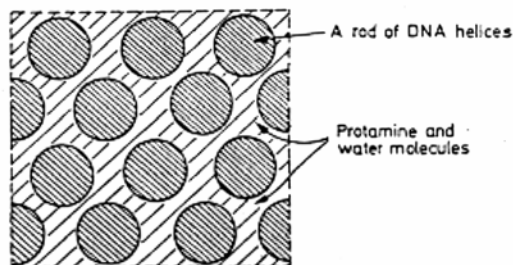


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Protamin-DNA-Komplexes nach Modell 2. DNA-Helices lagern sich zu zweidimensionalen hexagonalen Strukturen (Stäbe) zusammen; hier in einer zu den DNA-Stäben senkrechte Aufsicht dargestellt. Protamin und Wasser füllen die Zwischenräume auf.

Modell 3, basierend auf Untersuchungen mit Röntgenstrukturanalyse und Elektronenmikroskopie von Raukas (1966):

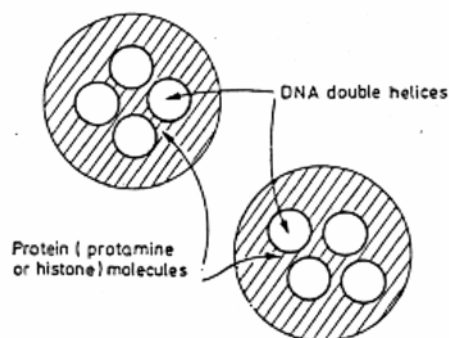


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Protamin-DNA Bindung nach Modell 3. Vier DNA Doppelhelices binden durch Protamine oder zweiwertige Metallionen aneinander.

In diesem Modell wird vermutet, dass vier DNA-Protamin-Komplexe, welche, ähnlich dem Modell 1, an Protamin und oder Metallionen wie z.B. Magnesiumionen oder Calciumionen binden (Abbildung 5).

Modell 4, von der japanischen Gruppe um Ando (1966 – 1970):

Das vierte Modell führt die verschiedenen Ansätze zusammen und präzisiert die Vorstellung des DNA-Protamin-Komplexes noch. Im ersten Schritt der Komplexbildung bindet Protamin in der kleinen Furche der DNA. Dieser Primärkomplex bildet Brücken zu anderen Primärkomplexen durch Protamin-Moleküle. Daraus entsteht ein Netzwerk aus Protamin- und DNA-Molekülen, welche auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut darstellbar sind (superkolloidale Konformation) (Abbildung 6 und 7). Die Bildung dieses Netzwerkes wurde auch durch die Untersuchungen von Wehling an Protaminen des Herings bestätigt (Wehling et al., 1976).

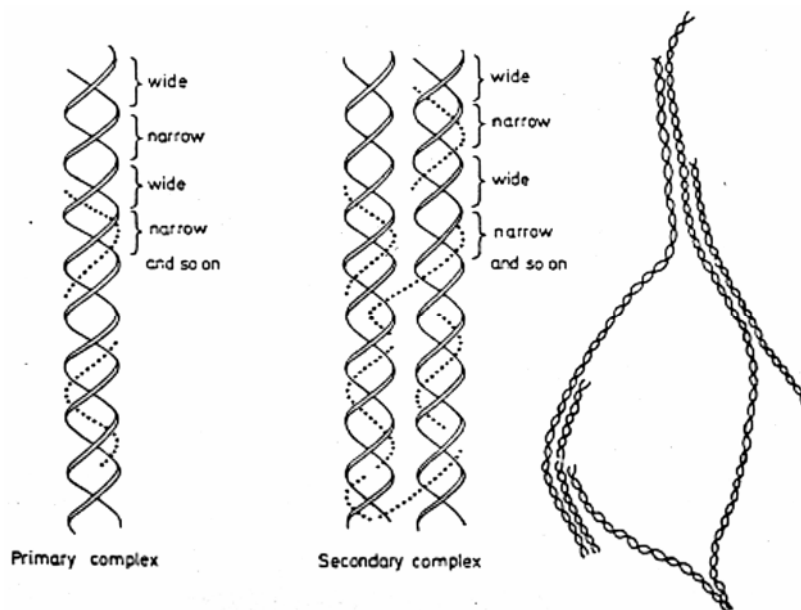


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Protamine-DNA-Komplexes nach Modell 4. Der Primärkomplex besteht aus der Doppelhelix, um die sich Protaminmoleküle in der kleinen Furche der DNA anlagern. Der Sekundärkomplex besteht aus mehreren Primärkomplexen, die durch Protaminmoleküle verbunden sind. Dies zusammen bildet ein Netzwerk.

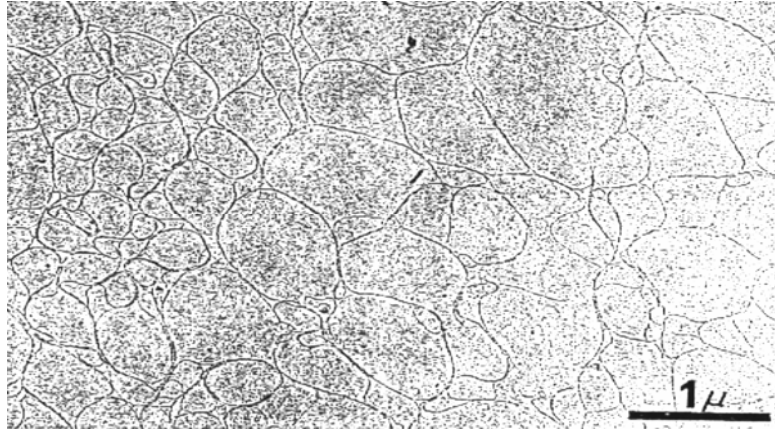


Abbildung 7: Eine Elektronenmikroskop-Aufnahme eines Protamin-DNA-Komplexes.

Über diese Modelle hinaus ergaben atomic force microscopy (AFM) Untersuchungen, dass Protamine und chromosomale DNA *in vitro* zu eng gepackten Strukturen kondensieren (Hud et al., 1993). Hierbei lagert sich DNA und Protamin zu toroidalen Strukturen zusammen, welche einen durchschnittlichen Durchmesser von 40 nm aufweisen (Allen et al., 1997).

NMR-Messungen an DNA/Protamin-Komplexen wiesen auf die Lokalisation des Protamins in der großen Furche (major groove) der DNA hin, was im Widerspruch zu Modell 1 steht (Prieto et al., 1997).

2.3 Oligonukleotide

Im Jahre 1978 veröffentlichten M. L. Stephenson und C. P. Zamecnik die spezifische Hemmung viraler Proteine eines Rous-Sarkoma-Virus mittels eines 13mer Oligonukleotides (Stephenson et al., 1978; Zamecnik et al., 1978). Dies war der Start einer Vielzahl an Forschungsarbeiten im Bereich der Oligonukleotide, um diese für eine Pharmakotherapie zugänglich zu machen.

Oligonukleotide als potentielle Arzneistoffe sind zumeist kurze, einzelsträngige DNA, können aber auch im speziellen Fall einzelsträngige oder doppelsträngige RNA sein. Diese kodierenden Nukleinsäuren werden meist durch Festphasensynthesen erhalten, können jedoch auch in Zellen exprimiert werden (Couvreux et al., 2000).

Die Entwicklung von Therapien mittels Oligonukleotiden setzt ein detailliertes Wissen über die Target-Moleküle zumeist Nukleinsäuren voraus.

2.3.1 Wirkungsmechanismen der Oligonukleotide

Oligonukleotide können über verschiedene Mechanismen in den Stoffwechsel von Zellen eingreifen. Hierbei binden ON an die mRNA, die chromosomale DNA oder an Proteine. Darüber hinaus können bei immunkompetenten Zellen durch spezielle Basensequenzen spezifische Immunantworten hervorgerufen werden. Die einzelnen Wirkmechanismen werden nachfolgend beschrieben.

2.3.1.1 Antisense-Oligonukleotide (mRNA Translationsarrest)

Als Antisense-Oligonukleotid bezeichnet man einen Nukleinsäurestrang, dessen Sequenz komplementär zu einer RNA (Sense-Sequenz) ist. Die mRNA ist wiederum komplementär zum codogenen Strang der DNA.

In einem Säugetiergenom kommen $\sim 3 \times 10^9$ Basenpaare mit vier unterschiedlichen Basen vor. Dies ergibt rechnerisch, dass eine Basensequenz von 16 oder mehr Basen rein statistisch nur einmal in diesem Genom vorkommen kann.

Ist nun die genaue Basensequenz eines Gens bekannt, so ist es möglich, spezifisch die Bioproteinsynthese des dafür kodierten Proteins zu hemmen, indem das Antisense-Oligonukleotid mit der Sense-mRNA hybridisiert. Dieser mRNA/ON-Doppelstrang kann nicht mehr am Ribosom translatiert werden (Translationsarrest). Hierdurch kann die Bioproteinsynthese einzelner Proteine verringert oder gar gehemmt werden.

Es zeigte sich, dass Oligonukleotide mit einer Länge von 16-20 Nukleinsäuren eine genügende Spezifität aufweisen. Eine Verringerung der Spezifität kann durch falsche Basen in der Antisense-Sequenz bedingt werden. Der Austausch von nur einer Base gegen eine nicht-komplementäre Base führt zu einer Verringerung in der Bindungsstärke an die Sense-Sequenz um den Faktor 500 (Crooke, 1999a; Dingermann, 1999).

2.3.1.2 RNase H Aktivität

Ein zusätzlicher Effekt von Antisense-DNA-Oligonukleotiden ist die Aktivierung einer spezifischen RNase: RNase H. Dieses Enzym kommt in allen Zellen vor. Es erkennt in einem RNA/DNA-Hybrid ihr Substrat und baut katalytisch den RNA-Strang in diesem Heterodublex ab. Dies führt zur Freisetzung des Antisense-Oligonukleotides, welches erneut mit einer mRNA spezifisch hybridisieren kann. Dies dürfte zu einem

großen Teil an der Antisense-Wirkung von Oligonukleotiden beitragen. Es ist daher strittig ob chemisch modifizierte Oligonukleotide diesen Effekt ausnutzen können (Crooke, 1999a, b).

2.3.1.3 Ribozyme

Ribozyme oder auch katalytische RNAs stellen eine weitere Möglichkeit dar, mittels Oligonukleotiden die Bioproteinsynthese eines spezifischen Proteins zu hemmen. Ähnlich wie bei den Proteinen wird durch Sequenzelemente eine Struktur stabilisiert, welche ein aktives katalytisches Zentrum schafft, in der Phosphatesterhydrolyse begünstigt abläuft. Als katalytisches Zentrum fungieren etwa 40 Nukleotide, welche konstant sein müssen. Durch die Wahl der flankierenden Sequenzen, welche auch aus DNA bestehen können, kann das Ribozym an jede beliebige RNA um ein 5'-GUC-3'-Trinukleotid dirigiert werden (Cech, 2002; Kruger et al., 1982). Für die Entdeckung der katalytischen Eigenschaften von Ribonukleinsäuren erhielten S. Altman und T. R. Cech 1989 den Nobelpreis für Chemie.

2.3.1.4 RNA interference

RNA interference (RNAi) ist ein neue und viel versprechende therapeutische Strategie. Hierbei werden doppelsträngige RNA mit einer Länge von jeweils 19-21mer eingesetzt, welche einen 2mer Überhang am 3'-Ende aufweisen müssen. Dieser Überhang kann aus einem Tymidin-Dimer bestehen, welches die dsRNA vor Nuklease-Abbau schützt (small interfering RNA; siRNA). Diese siRNA kann hoch spezifisch mRNA-Abbau fördern, welche komplementär zu einem der beiden RNA-Stränge ist (Elbashir et al., 2001). Der genaue Mechanismus dieser mRNA-Degradation ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass die siRNA mit einigen Proteinen einen Komplex bildet (RNA-induced silencing complex; RISC), welcher den mRNA-Abbau katalysiert (Schiffelers et al., 2004).

2.3.1.5 Tripelhelix-Bildung

Bei den drei zuvor beschriebenen Wirkungsmechanismen wurde die mRNA gehemmt und/oder degradiert. Bei der Tripelhelix-Bildung ist die doppelsträngige DNA die Zielstruktur für einzelsträngige Oligonukleotide. Weist die DNA-Doppelhelix Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen auf

(Watson/Crick-Basenpaarung, siehe auch 2.1.2), so kann noch eine dritte Qualität der Wechselwirkung beschrieben werden. Die Oligonukleotide lagern sich in der großen Furche der dsDNA an und interagieren ihrerseits über Wasserstoffbrückenbindungen (Hoogsteen-Basenpaarung, retrograde Basenpaarung) unter Ausbildung einer Tripelhelix. Dies ist nur zwischen Purin-Basen in der dsDNA und Pyrimidin-Basen in den Oligonukleotiden möglich. Ein Vorteil dieser Methode könnte sein, dass die Transkription der DNA in RNA gehemmt wird und somit nicht sämtliche mRNA Transkripte durch Oligonukleotide abgefangen werden müssen. Leider muss davon ausgegangen werden, dass Tripelhelices ein mutagenes und kanzerogenes Potential besitzen (Dingermann, 1999; Guntaka et al., 2003).

2.3.1.6 Aptamere

Aptamere stellen eine weitere Klasse von Oligonukleotiden dar. Sie entfalten ihre Wirkung nicht direkt aufgrund ihrer Nukleinsäuresequenz, sondern in erster Linie durch ihre Sekundärstruktur. Sie bilden Bindungstaschen aus und können in diesen sehr selektiv niedermolekulare Moleküle, wie z.B. Theopyllin (Hermann et al., 2000) oder aber auch komplexe Biomoleküle binden (Vuyisich et al., 2002).

Leider ist es heute noch nicht möglich, verlässlich die dreidimensionale Struktur eines Aptamer-Oligonukleotides zu berechnen. Daher werden ganze Sequenz-Bibliotheken an DNA- oder RNA-Oligonukleotiden synthetisiert und als Gemisch auf die Zielstruktur gegeben. Die nicht-bindenden Oligonukleotide werden aus dem Gemisch entfernt und die bindenden Aptamere mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dieses Verfahren der Sequenzfindung wird als SELEX-Verfahren (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) bezeichnet (Ellington et al., 1990; Osborne et al., 1997; Tuerk et al., 1990).

2.3.1.7 CpG Motive

Schon vor über 100 Jahren erkannte der Chirurg William Coley, dass Tumoren nach einer bakteriellen Infektion sich zeitweise zurückbilden konnten. Dies führte zur Entwicklung standardisierter Bakterienextrakte, die heute bei der Therapie von z.B. rezidivierenden Infektionen der Atemwege eingesetzt werden (Broncho-Vaxom).

1984 erkannte man bei der Untersuchung von Bakterien-Lysat, dass die DNA in zwei Tumormodellen eine therapeutische Wirkung aufwies. Weitere Untersuchungen in den folgenden 10 Jahren zeigten, dass bestimmte DNA-Sequenzen einen immunstimulatorischen Effekt auf das Immunsystem von Säugerzellen haben (Rothenfusser et al., 2001).

Das Dinukleotid CG ist in Säugerzellen statistisch unterrepräsentiert (1 von 60 Dinukleotiden). Bei Bakterien und Viren ist das nicht der Fall (1 von 16 Dinukleotiden). Zusätzlich weisen bis zu 80% des Cytosin in somatischen Zellen eine 5'-Methylierung auf. Zellen des Immunsystems (B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Dendritische-Zellen) erkennen diese CG-reichen, nicht-methylierten DNA-Stränge und lösen eine Immunstimulation aus (Hartmann et al., 2000; Jahrsdorfer et al., 2001; Krieg et al., 1999; Krieg et al., 1995). Dies ist auch mit Oligonukleotiden, welche CpG-Motive tragen (p steht für das Phosphat im Dinukleotid), möglich (Kerkmann et al., 2003). CpG-Oligonukleotide werden zur Zeit als Vakzine-Adjuvans und bei der Therapie von Tumorerkrankungen (Brunner et al., 2000), Allergien und Asthma bronchiale erforscht. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass einige Antisense-Oligonukleotide CpG-Motive tragen und damit auch potentiell immunstimulierend sein könnten (Krug et al., 2001).

2.3.2 Probleme mit Oligonukleotiden als Arzneistoff

Die Bioverfügbarkeit der Oligonukleotide ist stark reduziert. Oligonukleotide haben ihren Wirkort in den Zellen (Zytosol, Nukleus), jedoch ist es den polyanionischen Makromolekülen nur in einem sehr geringen Maße möglich, durch die Zellmembran zu penetrieren. Der Aufnahmeweg von freien, unmodifizierten Oligonukleotiden ist nicht völlig aufgeklärt; es werden Endozytose/Pinozytose diskutiert. Die dadurch aufgenommenen ON sollen dann durch Rupturen in das Zytosol gelangen (Lebedeva et al., 2000).

Zusätzlich werden unmodifizierte ON durch verschiedene Endo- und Exonukleasen extrazellulär, wie auch intrazellulär schnell abgebaut. ON stellen Phosphorsäureester dar, welche durch starke Säuren in Phosphorsäure umgesetzt werden können. Ein zu langes Verbleiben der ON im Lysosom der Zellen degradiert daher die ON völlig (Crooke, 1999a).

Um die Bioverfügbarkeit der ON und die Stabilität gegenüber Nukleasen zu erhöhen, wurden die verschiedensten chemischen Modifikationen an Oligonukleotiden

vorgenommen. Auch wurden unterschiedlichste spezifische Liganden kovalent gebunden, welche zu einer gezielten, rezeptorvermittelten Aufnahme der ON führten. Ebenfalls wurden ON mit Molekülen, die den endosomal escape begünstigen, konjugiert (siehe auch 2.3.3) (Couvreur et al., 2000). Leider zeigten Studien, dass durch chemische Modifikation oftmals die Spezifität der Bindung an das Zielmolekül leidet und es zusätzlich zu weiteren unerwünschten Effekten durch Bindung an z.B. Proteine kommen kann (Stein, 1996).

Eine weitere Strategie ist die Entwicklung von geeigneten Drug Delivery Systemen. Diese können die gleichen Vorteile wie modifizierte ON bieten. Darüber hinaus ist es aber möglich, auch unmodifizierte Oligonukleotide in Zellen einzubringen (Weyermann et al., 2003). Der Nachteil vieler DDS ist jedoch die aufwendige und teure Charakterisierung und Herstellung (Bauer et al., 2002).

2.3.3 Chemische Modifikationen der Oligonukleotide

Eine Vielzahl von chemischen Modifikationen wurden an Oligonukleotiden vorgenommen. Veränderungen am Phosphordiester führen vor allem zu einer enzymatischen Stabilität (Phosphotriester, Phosphorothioate) und können die Oligonukleotide lipophilisieren (z.B. Methylphosphonate). Diese lipophileren Strukturen können besser die Zellmembran überwinden. Zusätzlich wurde das gesamte Phosphordiester-Rückgrat der DNA durch ganz neue Strukturen substituiert mit ähnlichem Basen-Abstand. Beispiele hierfür sind die peptide nucleic acids (PNA) und Morpholino-Oligonukleotide (siehe auch Abbildung 9).

Weitere Ansätze der chemischen Modifikation wurden an den Basen und Zuckern umgesetzt. Auch wurden eine große Anzahl an Konjugaten durch kovalente Bindung verschiedenster funktioneller Moleküle an die Enden der Oligonukleotide hergestellt (siehe Abbildung 8) (Couvreur et al., 2000; Schlingensiepen et al., 1997).

Die drei wichtigsten Modifikationen, welche sich zurzeit in der klinischen Testung befinden, werden folgend beschrieben.

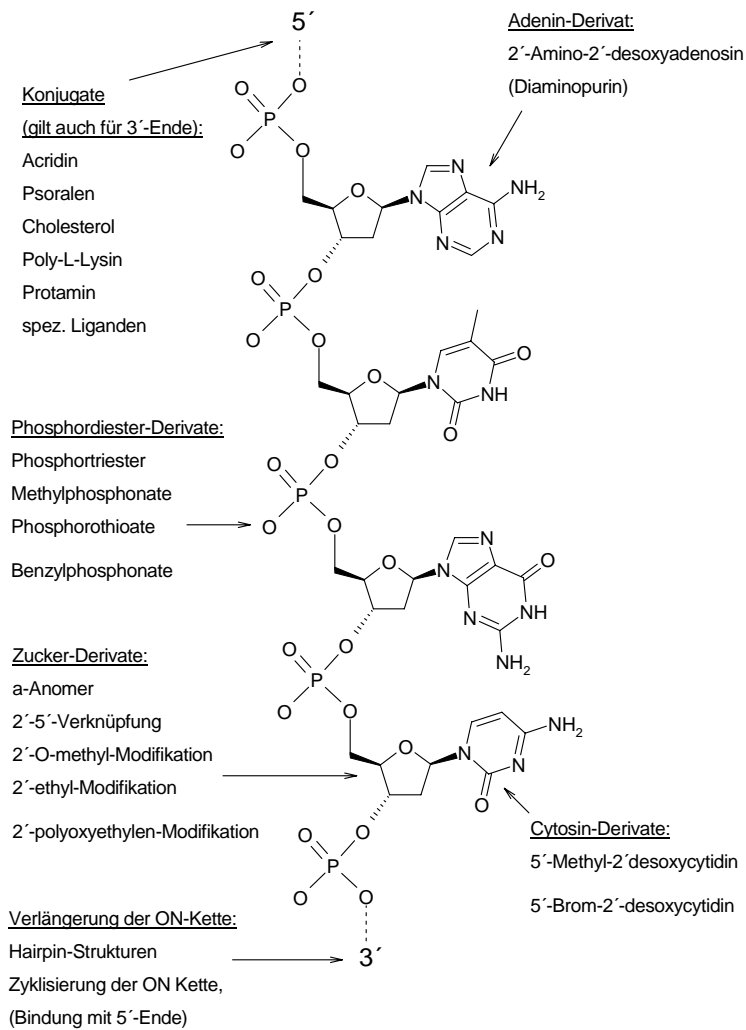


Abbildung 8: Chemische Modifikationen der Oligonucleotide.

2.3.3.1 Phosphorothioate

Phosphorothioate (PTO) stellen die wohl am meisten untersuchten Oligonucleotid-Modifikation dar und werden heute schon in klinischen Studien getestet. Sie werden durch die Substitution eines nicht-bindenden Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom der Phosphatgruppe erhalten (siehe auch Abbildung 8) (Temsamani et al., 1994), wodurch chirale Zentren entstehen. Bei n Nucleotiden in einem Molekül ergibt dies etwa 2^n Diastereomere. Nur einige dieser Stereoisomere begünstigen sterisch die Hybridisierung mit z.B. mRNA (Stein et al., 1997). PTO weisen eine *in vivo*-Halbwertszeit von 24-48 Stunden auf (Temsamani et al., 1997), wobei bei der Metabolisierung der PTO die 3'-Exonuklease eine entscheidende Rolle spielt (Gilar et al., 1998). PTO binden unspezifisch an verschiedene Proteine und können dadurch zytotoxische Effekte aufweisen (Eckstein, 2000; Stein, 1996). Um solche

2.3.4 Therapeutischer Einsatz von Oligonukleotiden

Eine therapeutische Anwendung für Oligonukleotide (ON) setzt ein dezidiertes Wissen über die Fehlregulierung in den Zellen voraus. Der genetische Code für das Target-Protein muss bekannt sein. Auch ist es von Vorteil das Genom der gesamten Zelle zu kennen, um sicher abklären zu können, ob eine Oligonukleotidsequenz auch wirklich nur das spezifische Protein regulieren wird. Dieser Initiale Prozess der Strukturfindung eines Arzneistoffs ohne empirische Daten wird auch als "Rational Drug Design" bezeichnet (dies gilt nicht für Aptamere und CpG-Motive). Der Vorteil der Antisense Strategien (Translationsarrest, Ribozyme, siRNA, Tripelhelices) ist, dass Krankheiten auf der Stufe ihrer genetischen Entstehung therapierbar sind. Im Gegensatz zu einer Therapie mittels Plasmiden und viralen Vektoren, bei denen ganze Gene in Zellen langfristig eingebracht werden, kann man die Antisense-Therapie gleich den klassischen Therapien absetzen, um eine Wirkminderung zu erhalten. Bei in Zellen eingebrachten Genen durch zum Beispiel retroviralen Vektoren ist dies wenn überhaupt nur über lange Zeiträume möglich.

Pharmakotherapie mittels Oligonukleotiden erscheint bei der Behandlung von viralen Infektionen (HIV, HBV, HCV, HSV, Influenza, CMV), parasitärer Infektionen (Malaria), bestimmter Krebsarten (Leukämie, Lymphomen, Melanomen, Glioblastomen) für sinnvoll. Auch Erbkrankheiten wie z.B. Hämophilie, Sichelzellanämie, Muskeldystrophie und Diabetes mellitus könnten mit einer Antisense-Strategie behandelt werden (Crooke, 1999a; Schlingensiepen et al., 1997). Auch im Bereich der Autoimmunkrankheiten (Multiple Sklerose, Psoriasis) und der entzündlichen Erkrankungen (Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis, Ulcerative Colitis) wird intensiv geforscht.

Der Wirkstoff Fomivirsen (Vitravene™) wurde im Jahre 2000 zu Behandlung der Retinitis verursacht durch eine Cytomgalie-Virus-Infektion bei HIV-positiven Patienten durch die Food and Drug Administration (FDA) der USA zugelassen.

In Tabelle 2 ist eine Übersicht über den aktuellen Stand der klinischen Forschung im Bereich der Oligonukleotide gegeben.

Tabelle 2: Übersicht über Stand der klinischen Forschung (Stand 20.02.2004)

Wirkstoff	Target	Indikation	Chem.-Modifikation	Präklinik	Industriepartner
ISIS 107248 (ATL 1102)	VLA-4	Multiple Sklerose	2'MOE	Präklinik	ISIS/ALT
ISIS 23722	Survivin	Krebs	2'MOE	Präklinik	ISIS/Lilly
GEM 92	GAG	HIV	2'MOE	Phase I	Hybridon
ISIS 301012	ApoB-100	Cardiovascular	2'MOE	Phase I	ISIS
OGX-011	Clusterin	Prostata-CA	2'MOE	Phase I	ISIS/Oncogenix
Alicaforsen	ICAM-1	Psoriasis	PTO	Phase II	ISIS
Angiozyme	VEGF	Krebs	Ribozyme	Phase II	Sirna
AP-12009	TGF-b	Glioblastome	PTO	Phase II	Antisense Pharma
GEM 231	PKA 1	Krebs	2'MOE	Phase II	Hybridon
GTI 2040	RNR	Nieren-CA	PTO	Phase II	Lorus
GTI 2501	RNR	Krebs	PTO	Phase II	Lorus
ISIS 104838	TNF-a	Rheumatoide Arthritis	2'MOE	Phase II	ISIS
ISIS 104838	TNF-a	Psoriasis	2'MOE	Phase II	ISIS
ISIS 113715	PTP-1B	Diabetes	2'MOE	Phase II	ISIS
ISIS 14803	antiviral	Hepatitis C	PTO	Phase II	ISIS
ISIS 2503	H-RAS	Pankreas-CA	PTO	Phase II	ISIS
LErafAON	C-RAF	Krebs Radiosensitizer	PTO	Phase II	NeoPharm
MG-98	DNA-MTF	Krebs	2'MOE	Phase II	MethyGene
Oncomyc-NG	c-myc	Krebs	Morpholino	Phase II	AVI BioPharma
Affinitac	PKC-a	Lungen-CA (NSCLC)	PTO	Phase III	ISIS/Lilly
Alicaforsen	ICAM-1	Morbus Crohn	PTO	Phase III	ISIS
Alicaforsen	ICAM-1	Ulcerative Colitis	PTO	Phase III	ISIS
Oblimersen	BCL-2	Malignes Melanom	PTO	Phase III	Genta/Aventis
Vitravene	antiviral	CMV Retinitis	PTO	Phase IV*	ISIS/Novartis

* seit 2001 von FDA zugelassen

2.4 Drug Delivery Systeme für Oligonukleotide

Eine große Herausforderung stellt die Aufnahme von Oligonukleotiden in Zellen dar. Die hochgeladenen Makromoleküle penetrieren nicht oder nur zu einem sehr geringen Maße durch die Zellmembran und können extra-, wie auch intrazellulär durch Nukleasen abgebaut werden (siehe auch Abschnitt 2.3.2). Daher existiert eine große Notwendigkeit Drug Delivery Systeme (DDS) zu entwickeln, welche zu einer verstärkten Zellaufnahme und einem Nuklease-Schutz führen. Zusätzlich sollte durch die Modifizierung des DDS eine veränderte Wirkstoff-Freigabe (Kinetik) und/oder ein primäres Targeting durch spezifische Liganden möglich sein. Dies hat den Vorteil, dass das Oligonukleotid nicht chemisch modifiziert werden muss und somit die Gefahren einer Abnahme der Spezifität und einer Zunahme der unspezifischen Seitenreaktionen vermieden werden.

In den letzten 20 Jahren wurden verschiedenste Ansätze für das Drug Delivery von Oligonukleotiden entwickelt. Man kann die meisten Entwicklungen unter den Begriffen Liposom, virus like particle (VLP) und Nanopartikel subsumieren. Diese werden folgend beschrieben.

2.4.1 Liposomen

Liposomen sind Assoziate aus amphiphilen Lipiden in einer wässrigen Phase. Die amphiphilen Lipide ordnen sich konzentrisch in Doppelschichten an (Bilayer), die sich mit wässrigen Zwischenschichten abwechseln. Dies unterscheidet sie von mizellaren Strukturen (Monolayer). Je nach Anzahl der Bilayer teilt man Liposomen in "small unilamellar vesicles" (SUV, Durchmesser 20 bis 50 nm), "large unilamellar vesicles" (LUV, Durchmesser >50 nm), "multilamellar vesicles" (MLV, Durchmesser über 400 nm) und "large multilamellar vesicles" (LMLV, Durchmesser 0,1 bis 10 µm) ein (Bauer et al., 2002). Unterschieden wird zwischen positiv-geladenen, kationischen- und negativ-geladene, anionische-Liposomen. Im Falle der kationischen Liposomen werden die negativ-geladenen Oligonukleotide mit den Liposomen gemischt. Dies führt zu Komplexen, stabilisiert durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den anionischen Oligonukleotiden und der kationischen Nettoladung der Liposomen. Es ist hervorzuheben, dass die Oligonukleotide auf der Oberfläche der Bilayer adsorbiert sind, wobei hingegen bei anionischen liposomalen Präparationen die Oligonukleotide im Inneren, im wässrigen Lumen der Liposomen lokalisiert sind. Beide liposomalen Prinzipien schützen die DNA/RNA vor Nuklease-Abbau (Dingermann, 1999).

Für Oligonukleotid-Delivery spielen die anionischen Liposomen eine stark untergeordnete Rolle, da die Beladungseffizienz und Zellaufnahme im Vergleich zu kationischen Liposomen gering ist (Zelphati et al., 1996a, b).

Kationische Liposomen, beladen mit Oligonukleotiden, werden über den unspezifischen endocytotischen-lysosomalen Weg in die Zellen aufgenommen und nicht, wie es scheinen könnte, durch die Verschmelzung der Lipiddoppelschichten der Liposomen und der Zellmembranen (Zabner et al., 1995; Zhou et al., 1994).

Drei Substanzgruppen kationischer Lipide sind gebräuchlich für Oligonukleotid-Delivery (Hope et al., 1998). Die erste Gruppe beinhaltet amphiphile Moleküle mit quaternären Ammonium-Gruppen und langen, mono-ungesättigten aliphatischen Ketten, die sich von Phospholipiden ableiten. Beispiel hierfür ist DOTMA, der kationische Anteil des Transfektionsreagens Lipofectin[®] (Abbildung 11). Zusätzlich beinhaltet Lipofectin[®] ein ungeladenes Molekül (DOPE), welches zusätzlich die endosomale Zellmembran destabilisiert und dadurch die Freigabe der Oligonukleotide an den Wirkort Zytosol unterstützt.

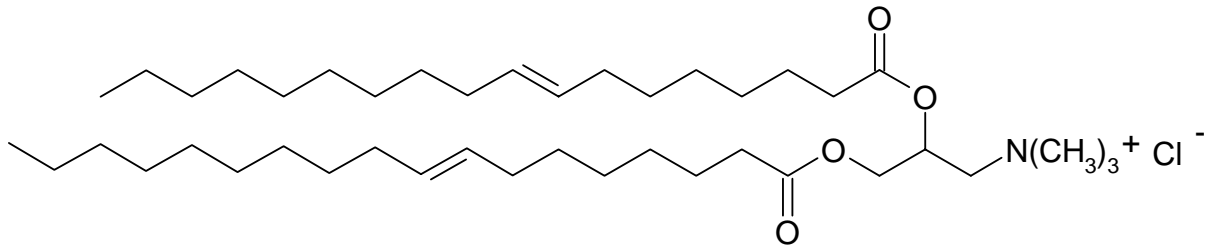


Abbildung 10: DOTMA = N-[1-(2,3 dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid

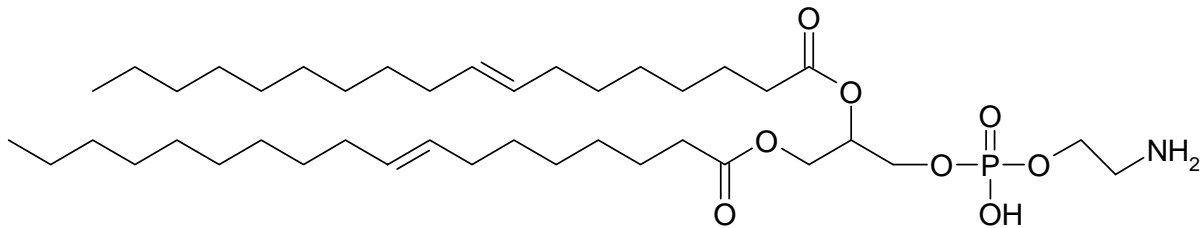


Abbildung 11: DOPE = Dioleoylphosphatidyl ethanolamin

Die zweite Klasse der Makromoleküle zur Liposomenpräparation sind kationisierte Cholesterol-Derivate, wie z.B. DC-Chol (Abbildung 12).

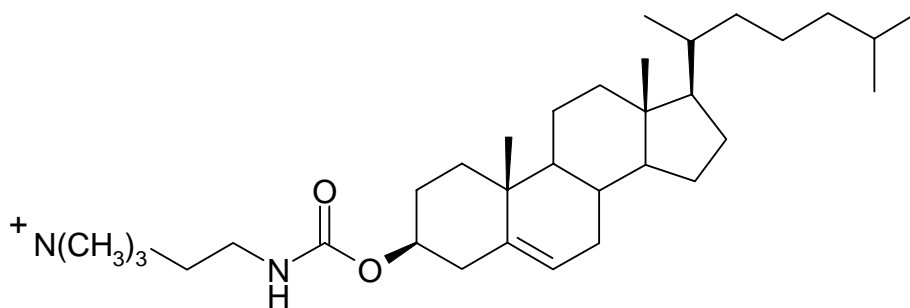


Abbildung 12: DC-Chol = 3β-(N-(N',N'-dimethylaminoethan)carbamoyl)cholesterol

Die dritte Klasse enthält multivalente Kopfgruppen in der amphiphilen Molekularstruktur (Lipopolyamine). Ein Beispiel hierfür ist DOGS, welches auch kommerziell als Transfectam[®] erhältlich ist (Abbildung 13).

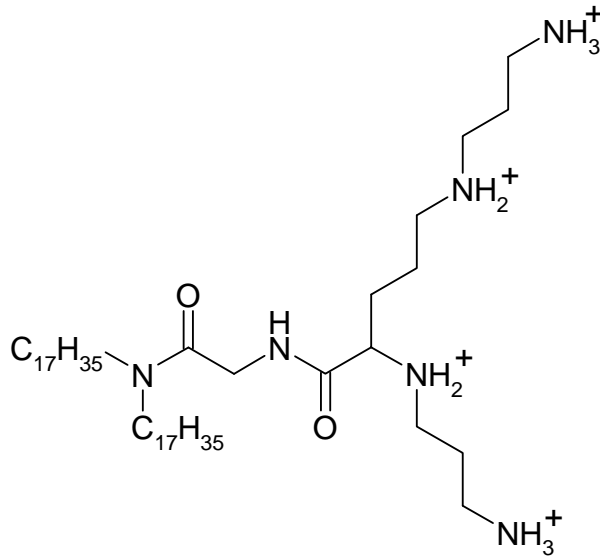


Abbildung 13: DOGS = Dioctadecylamidoglycylspermin

Eine Vielzahl an chemischen Modifikationen an diesen Molekülen wurde vorgenommen, um eine pH-abhängige Oligonukleotid-Freigabe zu erhalten oder ein spezifisches Zelltargeting zu begünstigen, indem spezifische Liganden zur spezifischen, rezeptorvermittelten Zellaufnahme an die Liposomen gebunden wurden (Lebedeva et al., 2000; Zelphati et al., 1993; Zhou et al., 1994).

Neben der hohen Effektivität der kationischen liposomalen Oligonukleotid-Präparationen muss auch auf zwei große Nachteile dieser Technik hingewiesen werden. Kationische Liposomen besitzen ein hohes Maß an Zytotoxizität und verlieren ihre Transfektionseffizienz in Anwesenheit von Serum-Proteinen (Zelphati et al., 1998). Resultierend daraus sind kationische Liposomen in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug für *in vitro*-Versuche geworden, konnten aber bis jetzt nicht als unkritisches DDS für eine klinische Anwendung etabliert werden (Zhang et al., 1994).

2.4.2 Virale Hüllkapside (virus like particles / viral capsoids)

Eine weitere Möglichkeit die Aufnahme von Oligonukleotiden in Zellen zu erhöhen, ist die Verwendung von Virus-ähnlichen Partikeln (virus like particles, VLP's) als DDS. Dies sind artifizielle Viruskapside aus rekombinant hergestellten Virusstrukturproteinen, welche aus Bakterien (Leavitt et al., 1985), Hefen (Palkova et al., 2000; Sasnauskas et al., 1999) oder Insektenzellen (An et al., 1999; Goldmann et al., 1999) isoliert werden und nachfolgend unter definierten pH- und pI-Werten assembliert werden können (Ou et al., 1999; Salunke et al., 1989; Touze et al., 2001). Beispielhaft ist der Aufbau eines VLP aus dem Polyoma-Strukturprotein VP1 in Abbildung 14 dargestellt. Die Verwendung von VLP's als Drug Delivery Systeme soll eine spezifische Aufnahme von Nukleinsäuren und deren Analoga in eukaryotische Zellen ermöglichen und dabei die Gefahr einer Kontamination durch virale DNA ausschließen (Bertling et al., 1991).

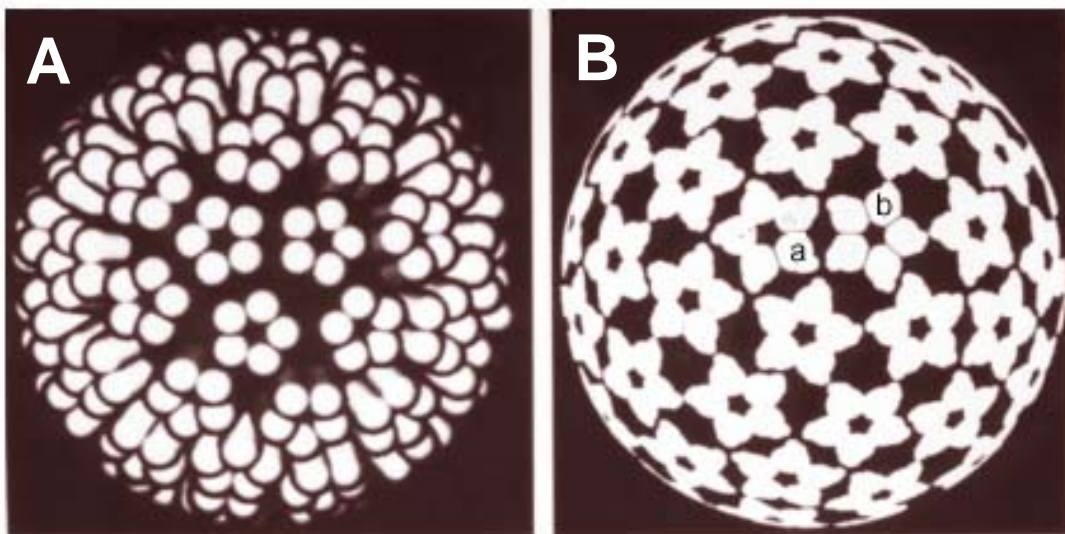


Abbildung 14 : Computergraphische Darstellung der VP1-Pentamere im Polyomavirus-Kapsid. In Abbildung A ist die Oberflächenmorphologie des Kapsids mit einem Gesamtdurchmesser von 50 nm und die der Pentamere mit einem Durchmesser von 8,5 nm dargestellt. Abbildung B zeigt die Pentamere in ihrer pentavalenten (a) und hexavalenten (b) Umgebung. Die Abbildung wurde verändert von Salunke et al. 1986 übernommen.

Virale Strukturproteine aus dem murinen Polyomavirus (*Papoviridae*) (Braun et al., 1999; Henke et al., 2000) und des humanen genital Papillomavirus

(*Papillomaviridae*) (Stanley, 2001), wurden zu VLP's assembliert und für Oligonukleotide und plasmidischer DNA-Delivery verwendet. Die murinen Polyomavirus-VLP zeigten eine große Immunogenität (Storni et al., 2002), wobei hingegen die humanen genital Papilloma-VLP für eine DNA-Vakzinierung in einer klinischen Studie Phase III erforscht werden (Stanley, 2002, 2003).

2.4.3 Nanopartikel

Jörg Kreuter definierte 1983 Nanopartikel als kolloidale feste Partikel mit einem Durchmesser von 10-1000 nm. Sie bestehen aus Makromolekülen, natürlichen oder synthetischen Polymeren (Kreuter, 1983, 1992). Oligonukleotide können auf der Oberfläche kovalent gebunden, via elektrostatischer Wechselwirkungen adsorbiert oder in die Partikelmatrix eingebunden sein.

Neben den schon beschriebenen Liposomen und Viralen-Kapsiden stellen Nanopartikel eine weitere Möglichkeit dar, Oligonukleotide an ihren Wirkort in der Zelle zu transportieren. Die Aufnahme der Nanopartikel erfolgt über Endozytose (Budker et al., 1992). Durch Adsorption der Oligonukleotide bzw. Einbettung in die Partikelmatrix wurde für die meisten Nanopartikelspezies ein Schutz vor Nukleaseabbau gefunden (Lambert et al., 2001).

2.4.3.1 Nanopartikel aus synthetischen Makromolekülen

Nanopartikel aus synthetischen Polymeren als Drug Delivery System für Oligonukleotide wurden in den letzten 20 Jahren intensiv untersucht. Ein Überblick gibt Tabelle 3.

2.4.3.1.1 Polyalkylcyanoacrylate

Nanopartikel mit lipophiler Polyalkylcyanoacrylat-Matrix binden *per se* nur sehr geringe Mengen an polaren Oligonukleotiden über van der Waals-Kräfte. Zum Beispiel konnten nur 1-2 % des eingesetzten Oligonukleotides an PIHCA-Partikel gebunden werden (Chavany et al., 1992).

Erhöht man die Lipophilie der Oligonukleotide z.B. durch Konjugation mit Cholesterol, können bis zu 60% der eingesetzten Oligonukleotide in die Partikelmatrix integriert werden (Godard et al., 1995).

Theoretische Grundlagen

Tabelle 3: Aufstellung synthetischer Polymere zur Nanopartikel-Präparation als Drug Delivery System für Nukleinsäuren und deren Analoga

<i>Polyalkylcyanoacrylate</i>		
Polyisohexylcyanoacrylate	PIHCA	(Chavany et al., 1994; Godard et al., 1995)
Polyisobutylcyanoacrylate	PIBCA	(Chavany et al., 1992)
Polyhexylcyanoacrylate	PHCA	(Zobel et al., 1997)
Polybutylcyanoacrylate	PBCA	(Bertling et al., 1991; Weyermann and Lochmann et al., 2004)
<i>Polyalkylmethacrylate</i>		
Poly(2-dimethylamino)ethyl-methacrylate	PDMAEMA	(Cherng et al., 1996)
Polymono-methylamino-ethyl-methacrylate	PMMAEMA	(Zobel et al., 1999a; Zobel et al., 1999b)
Poly-N-trimethyl-aminoethyl-methacrylate	PTMAEMC	(Zobel et al., 1999a; Zobel et al., 1999b)
Polyaminoethyl-methacrylate	PAEMC	(Zobel et al., 1999a; Zobel et al., 1999b)
Polyaminoethyl-methacrylamide	PAHMAC	(Zobel et al., 1999a; Zobel et al., 1999b)
Polyaminohexyl-methacrylate	PAHMC	(Zobel et al., 1999a; Zobel et al., 1999b)
<i>weitere synthetische Polymere</i>		
Polystyrol	PS	(Fritz et al., 1997)
Polyvinylpyrrolidon	PVP	(Mumper et al., 1996)
Polyvinylalkohol	PVA	(Mumper et al., 1996)
Poly(lactic-co-glycolic acid)	PLGA	(Yamakawa et al., 1997)
Polyethylenimin	PEI	(Brus et al., 2002)

Die Adsorption der Oligonukleotide an die Partikeloberfläche kann durch Zugabe von hydrophoben Kationen z.B. Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) gesteigert werden (Chavany et al., 1994). Eine weitere Möglichkeit der Kationisierung der Nanopartikeloberfläche und der damit verbundenen verstärkten Beladungsrate dieser Präparationen mit Oligonukleotiden ist das Einbinden von DEAE-Dextran (Bertling et al., 1991; Zobel et al., 1997). Dieses kationische Zuckerderivat wird in die Partikelmatrix integriert und stabilisiert den Nanopartikel. Tertiäre und quartäre Aminogruppen werden an der Partikeloberfläche präsentiert und können via

Ionenpaar-Bindung Oligonukleotide adsorbieren (Weyermann and Lochmann et al., 2004).

2.4.3.1.2 Polyalkylmethacrylate

Bei Polyalkylmethacrylaten handelt es sich im Gegensatz zu Polyalkylcyanoacrylaten um kationische Polymere. Cherng et al. konnte 1996 mit Nanopartikeln aus Poly(2-dimethylamino)ethyl-methacrylat (PDMAEMA) zeigen, dass die Zellaufnahme plasmidischer DNA erhöht werden konnte (Cherng et al., 1996). Nanopartikel aus verschiedenen Polyalkylmethacrylaten wurden daraufhin entwickelt (Zobel et al., 2000; Zobel et al., 1999a; Zobel et al., 1999b), um diesen Weg des Drug Delivery für Oligonukleotide zu optimieren (Delie et al., 2001b). Beispiel hierfür ist PMMAEMA, welches durch sekundäre Aminogruppen protonierbar ist und in wässrigem neutralem Medium kationisch vorliegt (Strukturformel siehe Abbildung 14). Eine Aufstellung der verwendeten Polymere ist in Tabelle 3 zu finden.

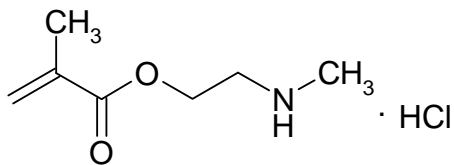


Abbildung 14: MMEAMA = Mono-methylamino-ethyl-methacrylat (Monomer)

2.4.3.1.3 Polystyrol

Kationische Polystyrol-Nanopartikel wurden hergestellt in einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation mit einem wasserstabilen kationischen Polymerisationsstarter. Dies führte zu positiv geladenen Gruppen am Ende der Polymerketten, welche an der Oberfläche der Partikel präsentiert werden. Die Partikel wiesen einen Durchmesser von 150-200 nm auf und konnten die adsorbierten Oligonukleotide vor enzymatischer Degradation schützen. Diese Partikel können von Zellen oder Geweben nur sehr schwer oder gar nicht abgebaut werden (Fritz et al., 1997).

2.4.3.1.4 Polyvinylpyrolidon, Polyvinylalkohol

Polyvinylpyrolidon (PVP) und Polyvinylalkohol (PVA) wurden zu Nanopartikeln verarbeitet, welche DNA über Wasserstoff-Brücken-Bindungen komplexieren können und diese in die Partikelmatrix einbauen. Dieses hydrophobe Coating führt zu einer gesteigerten Wechselwirkung mit der hydrophoben Zellmembran, woraus eine verstärkte Zellaufnahme resultiert. Die DNA war bei PVP- wie auch bei PVA-Nanopartikeln gegenüber nukleärer Degradation geschützt (Mumper et al., 1996).

2.4.3.1.5 Poly(laktit-co-glycolid)

Poly(laktit-co-glycolid)-Nanopartikel können Oligonukleotide und deren Phosphorothioat-Analoga binden (Yamakawa et al., 1997). Auch diese Formulierung schützt den Wirkstoff vor enzymatischem Abbau. *In vitro* Versuche mit Makrophagen zeigten eine Zellaufnahme (Akhtar et al., 1997).

2.4.3.1.6 Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI) ist ein hochkationisches synthetisches Polymer (Struktur siehe Abbildung 15), welche die Zellaufnahme in eukaryotischen Zellen erhöhen kann und dabei wie auch die zuvor beschriebenen Polymere die Oligonukleotide vor dem nukleären Abbau schützt. Eine verstärkte Aufnahme dieser Nanopartikel vermittelt durch Iontophorese in tiefe Hautkompartimente konnte gezeigt werden (Brus et al., 2002).

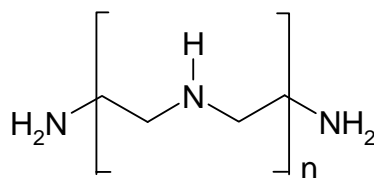


Abbildung 15: PEI = Polyethylenimin (lineare Form)

2.4.3.2 Nanopartikel aus natürlichen / semi-synthetischen Makromolekülen

Verschiedenste Moleküle, gewonnen aus tierischem oder pflanzlichem Material, werden direkt nach der Aufreinigung (Protamin, HSA, BSA, Chitosan), nach chemischer Modifikation (cHSA, Gelatine) oder Polymerisation (PLA, PLL, Poly-Arg, Poly-His) für die Präparation von DDS verwendet.

Diese Makromoleküle weisen den Vorteil auf, dass sie mehr oder weniger schnell bioerodierbar oder biodegradierbar sind. Die meisten dieser Stoffe basieren auf Aminosäuren, können aber auch aus kationischen Zuckern (Chitosan) oder polymerisierter Milchsäure bestehen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Aufstellung natürlicher und semi-synthetischer Polymere / Makromoleküle zur Nanopartikel-Präparation als Drug Delivery System für Nukleinsäuren und deren Analoga.

<i>kationische Peptide</i>		
Poly-L-Lysin	PLL	(Gonzalez Ferreiro et al., 2003)
Protamin	-	(Lochmann et al., 2004b)
Polyarginin	Poly-Arg	(Moulton et al., 2003)
Polyhistidin	Poly-His	(Pichon et al., 2001)
<i>Proteine / modifizierte Proteine</i>		
Humanes Serum Albumin	HSA	(Langer et al., 2003)
Kationisiertes HSA	cHSA	(Fischer et al., 2001)
Bovines Serum Albumin	BSA	(Arnedo et al., 2002)
Gelatine	-	(Coester et al., 2000a)
<i>weitere Polymere</i>		
Polymilchsäure	PLA	(Berton et al., 2001; Delie et al., 2001a)

2.4.3.2.1 Poly-L-Lysin

Die Entwicklung einer Reihe von DDS basierend auf Poly-L-Lysin (PLL) für genomische DNA, wie auch für Oligonukleotide wurde von verschiedenen Gruppen durchgeführt. PLL kann über verschiedene Synthesewege erhalten werden (Inaki et al., 1980; Rodriguez-Hernandez et al., 2003). Hierbei ist das Molekulargewicht (1 bis 300 kDa) und der Aufbau (linear, dendritisch) variabel (siehe auch Abbildung 15). Ein Nachteil des PLL ist die signifikante Zytotoxizität, wobei zu bemerken ist, dass mit kleinem Molekulargewicht das PLL weniger toxisch erscheint (Choksakulnimitr et al., 1995).

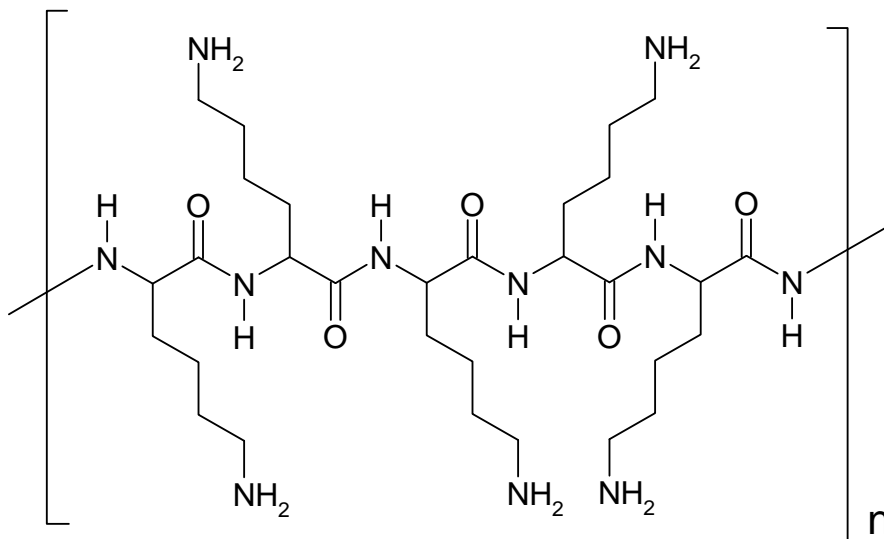


Abbildung 15: Molekularer Aufbau von Poly-L-Lysin (linear)

Negativ geladene Oligonukleotide können mit dem kationischen PLL in wässrigem Medium via Ionenpaar-Bindung spontan zu Nano- oder Mikropartikel assemblieren. Auch wurden von verschiedenen Gruppen kovalente Assoziate zwischen ON und PLL hergestellt, zu Nanopartikeln assembliert und *in vitro* getestet. Diese Versuche erfolgten hauptsächlich zur Hemmung von Viren und von proliferativen Effekten bei Krebszellen (Degols et al., 1992; Degols et al., 1991; Lemaitre et al., 1987; Stephenson et al., 1978).

Verschiedene Liganden wurden kovalent an PLL gebunden, um eine rezeptorvermittelte Endozytose der ON-PLL-Nanopartikel in spezifische Zellen zu erhalten. Beispiele hierfür sind das Asialoglykoprotein (Bunnell et al., 1992; Wu et al., 1992), Zucker (Fucose, Manose, Galaktose) (Liang et al., 1996; Mahato et al., 1997; Stewart et al., 1996), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) (Deshpande et al., 1996),

Folsäure (Citro et al., 1994b), Transferrin (Citro et al., 1992) und Steroide (Citro et al., 1993). Zusätzlich wurden spezifische Peptide an PLL gebunden, welche eine intrazelluläre Funktionalität aufweisen. Diese fusogenen Peptide sowie Peptide mit einer meist von viralen Peptidsequenzen abgeleiteten Kernlokalisationssequenz (NLS-peptides), destabilisieren die endosomale Membran, erhöhen die Freigabe der Oligonukleotide ins Zytosol oder im Falle der NLS-peptides transportieren vermehrt die Oligonukleotide in den Zellkern (Lochmann and Jauk et al., 2004).

2.4.3.2.2 Protamin

Wie schon unter 2.2.3 beschrieben kann Protamin an doppelsträngige DNA via elektrostatischer Wechselwirkungen binden (Abbildung 16). Darüber hinaus ist es aber auch möglich, artifizielle DNA oder RNA, wie z.B. einzelsträngige Antisense Oligonukleotide oder doppelsträngige RNA (siRNA) mit Protamin zu komplexieren (siehe Abbildung 16), um diese makromolekularen Wirkstoffe an ihren Wirkort in den Zellen zu befördern (Boulikas et al., 1997; Sabelnikov et al., 1973). Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch Plasmide mittels protaminbasierten DDS in Zellen vermehrt eingebracht werden können (Cotten et al., 1990; Li et al., 1997; Li et al., 1998; Sorgi et al., 1997).

Je drei Moleküle Protamin wurden an ein Transferrin-Molekül kovalent gebunden und es wurde gezeigt, dass diese Konjugate Oligonukleotide komplexieren können. Diese Arbeit erscheint sehr viel versprechend, ist aber leider nur ein "proof of principle", da weitere physikochemischen Charakterisierungen und *in vitro* Daten fehlen (Wagner et al., 1990).

Gibt man eine wässrige Oligonukleotid-Lösung in eine wässrige, salzfreie Protaminlösung, so bilden sich spontan Nanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 100-200 nm. In diesen kann unter geeigneten Bedingungen fast die gesamte Oligonukleotid-Menge eingebunden werden (Delie et al., 2001b), was zu einem Schutz gegenüber Oligonukleotid-Degradation durch Endonukleasen führt (Junghans et al., 2001). Diese Partikel (von den Autoren "Proticles" genannt) beladen mit einem ON gerichtet gegen das Proto-Oncogen *c-myc* wurden in einer humanen Leukämie-Zelllinie (U 937) aufgenommen. Es wurde eine signifikante Abnahme des Zellwachstums in einem zellulären Proliferationsassay gemessen (Junghans et al., 2000). Auch konnte die Aufnahme von Proticles in african green monkey kidney cells

(Vero-Zellen) gezeigt werden. Fluoreszenz-Markierte ON wurden im Zytosol und Nukleus detektiert (Junghans et al., 2001).

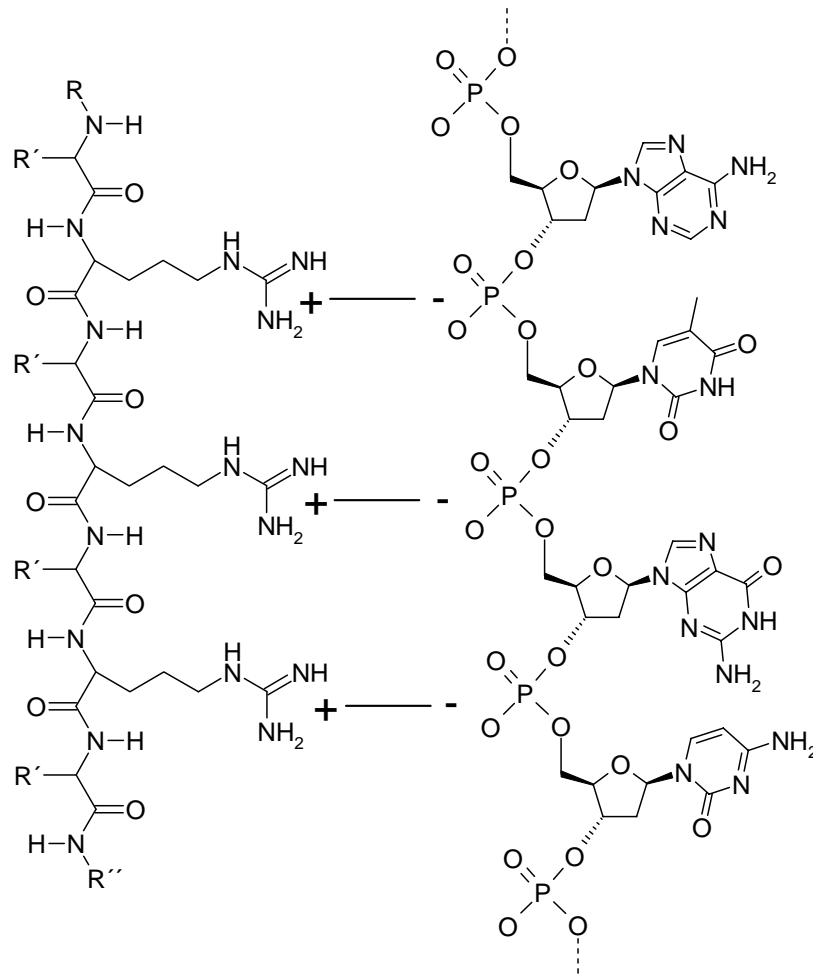


Abbildung 16: Interaktion der positiv geladenen Biguanidin-Gruppen des Protamins (links) und der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA (rechts).

Um die Stabilität dieser Partikel bei einer oralen Administration zu prüfen, wurden diese mit einem intestinalen Homogenisat, welches reich an verschiedene Nukleasen ist, inkubiert. Auch in diesen Versuchen waren die ON effektiv gegenüber dem enzymatischen Abbau geschützt (Gonzalez Ferreiro et al., 2003). Zusätzlich wurden Makromoleküle in die Komplexe eingebracht (Natriumcaprat und Natriumchenodeoxycholat), um die Dissoziation der ON aus den Nanopartikeln zu beschleunigen (Gonzalez Ferreiro et al., 2001).

Diese Partikel weisen zwei große Nachteile auf: (I) Sie besitzen eine starke Aggregationsneigung in wässrigen isotonischen Salzlösungen und (II) dissoziieren die Partikel nur schlecht in ihre Bestandteile, wenn sie intrazellulär in den

Endosomen lokalisiert sind. Dies führt zu einer starken Wirkungsverminderung des DDS. Diese beiden Befunden wurden von der Arbeitsgruppe Herrn Prof. R. Bodmeier (FU Berlin) wie auch von unserer Arbeitsgruppe gemacht und stellen den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit dar (siehe auch 3. Ziel der Arbeit).

2.4.3.2.3 Polyarginin

Abgeleitet von der Struktur des Protamins wurden verschiedene Polyarginine synthetisiert, um ihr Potential als DDS für Oligonukleotide zu prüfen (Moulton et al., 2003).

3mer, 5mer und 7mer Arginin wurde kovalent an ON gebunden, um diese zu Nanopartikeln zu assemblieren (Wei et al., 1994). Basierend auf dieser Chemie wurden 9mer *D*-Arginin, 9mer *L*-Arginin und 6mer *L*-Arginin kovalent an ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid gebunden. Leider liegen nur wenige Daten für *in vitro* Versuche publiziert vor. Die ON-Konjugate wurden in Hepatozyten (HepG-2 Zellen) aufgenommen; die Fluoreszenz akkumulierte in den Endosomen der Zellen (Chen et al., 2003).

2.4.3.2.4 Albumine

Zur Herstellung von Nanopartikeln wurde humanes Serum Albumin (HSA) in Wasser gelöst mit einem organischen Lösungsmittel (Methanol, Aceton) desolvatisiert und mittels Glutaraldehyd stabilisiert (Langer et al., 2003). Durch mehrstufige chemische Modifikation der Partikeloberfläche wurden Oligonukleotide gebunden. Diese wurden von verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien aufgenommen (Wartlick et al., 2004).

Da HSA die negativ-geladenen ON nur in einem geringen Maß binden kann, wurde es kationisiert (cHSA). Dieses cHSA kann mit DNA zu Nanopartikeln assembliert werden und wird von Zellen aufgenommen (Fischer et al., 2001).

Bovines Serum Albumin, welches physikochemisch dem HSA sehr ähnelt (Steinhardt et al., 1971), wird über einen Koazervationsprozess hergestellt. Sehr geringe Mengen an ON konnte in die Partikel eingebunden werden (< 3 µg pro mg BSA). Adsorbierte ON auf der Partikeloberfläche konnten durch Nukleasen abgebaut werden (Arnedo et al., 2002). Trotzdem konnte die Aufnahme der Partikel in Fibroblasten (MRC-5 Zellen) gezeigt werden. Ein Virusassay (Cytomegalovirus) ergab eine signifikante Reduktion der Virusaktivität bei der Gabe von Antisense-

Oligonukleotid beladenen Nanopartikeln. Ob dieser Effekt rein auf das Antisense-Konstrukt zurückzuführen ist, wäre zu diskutieren (Arnedo et al., 2004).

2.4.3.2.5 Gelatine

Gelatine wird über sauren oder alkalischen Aufschluss aus Kollagen gewonnen. Durch Desolvatation einer wässrigen Gelatine-Lösung durch organische Lösungsmittel ähnlich der Herstellung der HSA Partikel lassen sich Nanopartikel erhalten, welche durch mehrstufige chemische Oberflächenmodifikationen Antisense-Oligonukleotide binden können (Coester et al., 2000a; Langer et al., 2000). Diese Nanopartikel wurden von Monozyten/Makrophagen aufgenommen (Coester et al., 2000b).

2.4.3.2.6 Polymilchsäure

Oligonukleotide konnten nicht ohne Hilfsstoffe in einer Polymilchsäure (PLA) Matrix eines Nanopartikels eingebettet werden. Daher wurden die ON mit Cethyltrimethylammoniumbromid (CTAB) komplexiert und in die NP eingebunden. Auch eine Doppelemulsionspräparationstechnik führte zu einer erhöhten Einbindung (27%) der ON in die Partikel (Delie et al., 2001a). Eine erhöhte Zellaufnahme in DU145 Zellen konnte beobachtet werden (Berton et al., 1999). Diese Präparation beladen mit Antisense-Oligonukleotiden (gerichtet gegen *gag*-Protein) führte in einem artifiziellen HIV-Assay zu einer Virusinhibition (Berton et al., 2001).

2.4.3.2.7 Weitere Peptide

Eine Vielzahl von Peptiden für das Drug Delivery von Oligonukleotiden wurden in den letzten Jahren untersucht. Diese Peptide wiesen sowohl lytische, membrandestabilisierende Eigenschaften (fusogene Peptide) als auch teilweise ein Kernlokalisierungssignal (NLS peptide) auf. Da die Beschreibung aller Peptide den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, seien sie an dieser Stelle nur erwähnt. Mehr Informationen über dieses Thema sind in einer Übersichtsarbeit zu finden (Lochmann and Jauk et al., 2004).

3 Ziel der Arbeit

Antisense Oligonukleotide werden nur in einem geringen Maße in Zellen aufgenommen und darüber hinaus schnell von Nukleasen abgebaut. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten Drug Delivery Systems, welches die Oligonukleotide vor den enzymatischen Abbau schützt und die Bioverfügbarkeit dieser Makromoleküle verbessert.

Vorhergehende Arbeiten zeigten, dass durch Nanopartikel in denen Oligonukleotide fixiert oder auf denen Oligonukleotide aufgebracht wurden als Drug Delivery System fungieren können. Weitere Strategien waren das Oligonukleotid Delivery mittels Liposomen oder viralen Hüllproteinen.

Diese Arbeit sah vor, dass protaminbasierte Oligonukleotid-Nanopartikel entwickelt werden, welche einen neuen Ansatz für das Drug Delivery von Oligonukleotiden darstellten.

Im Rahmen des Forschungsschwerpunkts des Bundesministeriums für Bildung und Forschung der Bundesrepublik Deutschland (BMBF) "Funktionale supramolekulare Systeme" wurde das Verbundprojekt "Supramolekulare Drug Delivery Systeme zum gezielten Transport von Nukleinsäuren über biologische Barrieren" (03C0308A-C) initiiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Self Assembly Systeme auf DNA- und Protein/Peptid-Basis zu entwickeln, welche Oligonukleotide in verschiedene Zielzellen einbringen und dort zur spezifischen Antisense-Wirkung bringen können.

Basierend auf den Vorarbeiten von Frau Monika Junghans aus unserem Arbeitskreis war bekannt, dass Protamin in wässriger Lösung mit Oligonukleotiden zu Nanopartikeln spontan assembliert (siehe auch 2.4.3.2.2).

Zu Anfang sollten die Präparation dieser Partikel sollten physikochemisch charakterisiert und bezüglich der Reproduzierbarkeit des Produkts evaluiert werden. Die Größe und Oberflächenladungen waren zu messen, welche wichtige Parameter für eine solche galenische Entwicklung darstellen.

Die chemische Zusammensetzung der verschiedenen Präparationen musste ermittelt werden. Hierzu sollten geeignete analytische Verfahren für die Quantifizierung der Oligonukleotide und der Peptide- sowie Proteinkomponenten entwickelt und validiert werden.

Nachfolgend sollten die Nanopartikel in Bezug auf ihre Beschaffenheit und Lagerungsstabilität charakterisiert und optimiert werden.

Versuche zur Zellaufnahme, Zytotoxizität und Antisense-Wirkung in verschiedenen Zellmodellen sollte Informationen liefern, die zu einer Weiterentwicklung und Optimierung der Präparationen hinsichtlich von *in vitro* Versuchen führt.

Interdisziplinär sollten diese Arbeiten ausgeführt werden.

Die biophysikalischen Untersuchungen sollten im Verbund mit dem Arbeitskreis Prof. Dr. D. Schubert (Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt werden. Ein Fokus wurde auf die Nanopartikel-Charakterisierung mittels Analytischer Ultrazentrifugation gelegt.

In Kooperation mit dem Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main (Arbeitskreis PD Dr. Hagen von Briesen) sollten die Nanopartikel auf ihre antivirale Wirksamkeit gegen das HI-Virus getestet werden.

Als Industriebeteiligung sah das Projekt eine immunologische Untersuchung der Nanopartikel durch die "november AG" in Erlangen vor.

Eingebettet in das interdisziplinäre Graduiertenkolleg "Arzneimittel- Entwicklung und Analytik" (DFG, GK 137/3) sollten Nanopartikel für die Entwicklung eines zellulären Testsystems für Antisense-Oligonukleotid-DDS, das durch Jörg Weyermann, Institut für Pharmazeutische Technologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main erforscht wurde, bereitgestellt und auf Basis der daraus gewonnen Erfahrungen optimiert werden.

4 Veröffentliche Originalarbeiten

- 4.1 Dirk Lochmann*, Edith Jauk*, Andreas Zimmer; **Drug Delivery of Oligonucleotides by Peptides**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (2), (2004) page 237-251

* Beide Autoren haben gleichgroßen Anteil an dieser Arbeit

Eigenanteil:

Vollständige Übersicht über den Stand der Forschung und Technik im Bereich der Drug Delivery Systeme für Oligonukleotide basierend auf Peptiden an Hand wissenschaftlicher Publikationen erarbeitet und verständlich in diesem Review dargestellt.

- 4.2 Dirk Lochmann, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Norbert Dinauer, Hagen von Briesen, Jörg Kreuter, Dieter Schubert, Andreas Zimmer; **Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles**; *Journal of Microencapsulation*, in press (2004)

Eigenanteil:

Partikelpräparationen mit verschiedenen Oligonukleotid/Protamin-Verhältnissen hergestellt und in ihrer Zusammensetzung mittels SAX-HPLC (ON-Quantifizierung) und Fluoreszenzmakierung des Protamins mit TRITS fluorimetrisch bestimmt. Der Einfluss von ON/Protamin-Verhältnis, Oligonukleotid-Größe und -Konzentration auf den hydrodynamischen Durchmesser mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt. Bestätigung dieser Messungen durch Rasterelektronenmikroskopie. Der Einfluss der Protaminmenge in den Partikeln auf die Oberflächenladung mittels Zetapotentialbestimmungen ermittelt. Für das Aufklären des Assemblierungsprozesses der Nanopartikel Herstellung von frühen Stadien der Partikel, Fixierung auf Glimmer (mica) und Darstellung durch Atomic force microscopy (AFM). Für die Untersuchungen der Partikelstabilität in Zellmedium Partikel für die Analytische Ultrazentrifugation präpariert.

- 4.3 Anke Rohmann, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Wolf M. Bertling, Theodor Dingermann, Andreas Zimmer; **Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2}**; *Oligonucleotides*, 1 (2004) page 1-9

Eigenanteil:

Identität und Reinheit der Oligonukleotide mittels UV-Spektroskopie und RP-HPLC bestimmt. Beladungsrate der kationischen Liposomen mit Oligonukleotiden mittels SAX-HPLC gemessen. Stabilität von unmodifizierten Oligonukleotiden, teil- und vollthiolierten Oligonukleotiden gegenüber enzymatischem Abbau (DNase I, Endonuklease) mittels SAX-HPLC bestimmt.

- 4.4 Dirk Lochmann, Sylvia Stadlhofer, Jörg Weyermann, Andreas Zimmer; **New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent**; *International Journal of Pharmaceutics*, 283 (1-2), (2004) page 11-17

Eigenanteil:

Neue Methode zur Bestimmung von Protamin und Protaminsalzen in Mikrotiterplatten in wässrigen Medien mittels einer Fluoreszenzderivatisierung entwickelt. Durch Fluoreszenzspektroskopie die Extinktions- und Emissionspektren bestimmt. Aufgrund der Reaktionskinetik und Stabilität verschiedener Derivate ein Messregime entwickelt. Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen, Vertrauensintervall, Linearität der Signale für die drei Analyten statistisch ausgewertet.

- 4.5 Norbert Dinauer, Dirk Lochmann, Ilhan Demirhan, Andreas Zimmer, Angelika Chandra, Jörg Kreuter, Hagen von Briesen; **Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation**; *Journal of Controlled Release* 96 (2004) 497-507

Eigenanteil:

Verschiedene Nanopartikel-Präparationen mit unmodifizierten und Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden für Zellversuche hergestellt. Diese wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential-Bestimmungen im Durchmesser und Oberflächenladung charakterisiert. Fluoreszenzmarkierung und Aufreinigung von Protamin mit FITC für Confocales Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) erarbeitet um, intrazelluläre Verteilung zu beobachten.

- 4.6 Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Christiane Georgens, Ruth Prassl, Andreas Zimmer; **Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, in press (2004)

Eigenanteil:

Neues Drug Delivery System für Oligonukleotide erarbeitet und beschrieben (Albumin-Protamin-Oligonukleotid Nanopartikel, AIPrO-NP). Dieses Partikelsystem in MQ-Wasser und unter isotonischen Bedingungen in Kochsalzlösung, Phosphatpuffer-Puffer und Zellmedium hergestellt und mittels dynamischer Lichtstreuung die hydrodynamischen Durchmesser und Größenverteilung bestimmt. Hierbei wurde der Einfluss verschiedener humaner Serum Albumin (HSA) Konzentrationen als Schutzkolloid gemessen. Zwei Präparationsverfahren für AIPrO-NP im salzfreien Medium und in Zellmedium wurden abgeleitet. Diese weiterhin auf ihre Zusammensetzung durch Fluorimetrie (Protamin und HSA) und SAX-HPLC (ON) erforscht. Die Oberflächenladung (Zetapotential) der zwei AIPrO-NP Standardpräparationen mit den „bisherigen“ Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikeln verglichen. Den Einfluss von verschiedenen Anteilen an Phosphorothiat-

Modifikationen in den Oligonukleotiden auf den hydrodynamischen Durchmesser und Größenverteilung der Partikel mittels DLS bestimmt. Partikel mit siRNA hergestellt und ebenso charakterisiert.

Entdeckung eines „Initialen Komplex“ aus HSA und Protamin. Zur Bestätigung dieser Hypothese Röntgenstreuungs-Messungen (SAXS) vorgenommen und diese durch FCS-Messungen verifizieren lassen. Die Nanopartikel in ihrer Form und Größe mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt. Die durchschnittliche Molmasse der Nanopartikel anhand von FCS-Daten errechnet.

4.7 Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer; **Comparision of *in vitro* cytotoxicity assays**; *International Journal of Pharmaceutics*; in press (2004)

Eigenanteil:

Die Interaktion verschiedener Modellsubstanzen mit dem LDH- und MTT-Zytotoxizitätsassay *in vitro* in Zellkulturmedium zeitaufgelöst vermessen (Photometrie). Diesen Befund mit den zellulären Daten korreliert.

4.8 Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Christiane Georgens, Andreas Zimmer; **Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, in press (2004)

Eigenanteil:

Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel mit verschiedenen Verhältnissen an Protamin zu Oligonukleotid und fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden hergestellt und für die einzelnen zellulären Assays zur Verfügung gestellt. Zellen im Konfokalen-Laser-Scan-Mikroskop aufgenommen und ausgewertet.

- 4.9 Jörg Weyermann*, Dirk Lochmann*, Christiane Georgens, Isam Rais, Jörg Kreuter, Michael Karas, Markus Wolkenhauer, Andreas Zimmer; **Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (1), (2004) 25-35

* Beide Autoren haben gleichgroßen Anteil an dieser Arbeit

Eigenanteil:

Entwicklung zweier neuer Fluoreszenzmarkierungen der PBCA-NP mittels (I) Rhodamin B- oder FITC-gekoppeltem Dextran und (II) kovalenter Bindung von 6-(4,6-Dichlorotriazinyl)aminofluorescein (DTAF) an die NP. Aufreinigung dieser Präparationen durch Dialyse. Kryopräparation der Nanopartikel für Mikroskopie erarbeitet. Atomic force microscopy (AFM) und scanning electron microscopy (SEM) Bilder aufgenommen. Teilchengrößenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Oberflächenladung (Zetapotential) der verschiedenen Präparationen bestimmt. Partikelpräparationen für MALDI-TOF-MS und FCS-Messungen vorbereitet. Beladungsrate der Partikel mit Oligonukleotiden durch SAX-HPLC Messungen quantifiziert.

- 4.10 Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer; **Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems**, *Journal of Controlled Release*; 100 (3), (2004) page 411-423

Eigenanteil:

Protamin-Oligonukleotid Nanopartikel, Albumin-Protamin-Oligonukleotid Nanopartikel und DEAE-PBCA-Nanopartikel für die Zellversuche hergestellt. Partikel in Zellmedium mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) im Durchmesser bestimmt und die Oberflächenladung (Zetapotential) in Zellmedium vermessen. Für Konfokale-Laser-Scan-Mikroskopie fluoreszenzmarkierte Partikel zur Verfügung gestellt. Konfokale-Laser-Scan Mikroskopie Aufnahmen ausgewertet.

5 Zusammenfassende Darstellung

Oligonukleotide (ON) stellen eine neuartige Wirkstoffklasse in der Therapie von genetischen Defekten, viralen Infektionen, Autoimmunkrankheiten, Entzündungsgeschehen und Krebserkrankungen dar (siehe auch 2.3.4). Sie werden in vielen klinischen Studien untersucht und sind für die Pharmazeutische Technologie ein neues und herausforderndes Betätigungsfeld.

Diese Wirkstoffklasse besitzt allerdings zwei große galenische Probleme: (I.) Sie werden sehr schnell durch Nukleasen zur Wirkungslosigkeit degradiert und (II.) sind nur im geringen Maße bioverfügbar. Lösungen für diese Probleme bieten Drug Delivery Systeme (DDS) wie zum Beispiel Liposomen, virale Hüllkapsoide und Nanopartikel.

Im Bereich der nanopartikulären DDS werden neben unterschiedlichen synthetischen Polymeren wie zum Beispiel Polyethylenimin (PEI) in den letzten Jahren auch verschiedene Peptide als Grundlage für kolloidale Oligonukleotid-Formulierungen untersucht (siehe auch 2.4). Viele der in den letzten zwei Jahrzehnten entwickelten DDS wiesen beträchtliche zytotoxische Nebeneffekte auf. Vor allem die kationischen Liposomen, aber auch einige synthetische Polymere waren zwar effektiv im Schutz der Oligonukleotide vor enzymatischem Abbau und erhöhten die Zellaufnahme um ein Vielfaches im Vergleich zu freien ON, erschienen aber durch ihre Toxizität für eine spätere Applikation am Menschen als ungeeignet. Entwicklungen im Bereich der viralen Hüllproteine zeigten immer wieder ein beträchtliches immunogenes Risiko für die Patienten.

Damit rückte die Suche nach nicht nur effizienten, sondern auch gut verträglichen DDS in den Vordergrund. Primär kationische Peptide, gewonnen aus verschiedenen Pflanzen, Tieren oder chemischen Synthesestrategien, wurden verwendet um zum Beispiel die Zellaufnahme von Oligonukleotiden in Zellen zu erhöhen und/oder eine Zellkernlokalisation in den Zellen zu erreichen.

Das wohl am genauesten untersuchte Peptid hierbei ist Poly-L-Lysin (PLL), welches auch mit verschiedensten Liganden wie Asialoglykoprotein, Galaktose, Mannose, Fucose, Folsäure, Wachstumsfaktoren, Steroide oder Transferrin konjugiert wurde, um durch eine rezeptorvermittelte Endozytose eine vermehrte spezifische Aufnahme

von Oligonukleotiden in Zellen zu erreichen. Trotz des GRAS-Status (general recognized as safe) der amerikanischen "food and drug administration" (FDA) für PLL, zeigt gerade hochmolekulares PLL eine signifikante Zytotoxizität in Zellkulturen.

Die Verwendung von Protamin stellt eine weitere Möglichkeit der Formulierung von Oligonukleotiden in kolloidaler Form dar. Protamin wird seit Jahrzehnten in der pharmazeutischen Technologie als Hilfsstoff verwendet und besitzt ebenfalls den GRAS-Status. Mit Hilfe dieses kationischen, argininreichen Peptids (siehe auch 2.2) konnten in vorhergehenden Arbeiten Nanopartikel in einer Größe von 100 bis 200 nm hergestellt werden. Diese Partikel beinhalteten Oligonukleotide komplementär zu der mRNA Sequenz des Protoonkogens *c-myc*. Sie wurden von humanen promonozytischen Leukämiezellen (U937) aufgenommen und reduzierten signifikant das Zellwachstum um 40 % in einem Zellkultur-Proliferationsassay. Aber auch die nicht-kodierenden Kontrollsequenzen zeigten signifikante Wachstumsreduktionen von etwa 20 %. Eine spezifische Reduktion des Zielproteins *c-myc* durch einen mRNA Translationsarrest wurde nicht nachgewiesen. In Vero-Zellen konnten diese Nanopartikel, von den Autoren "Proticles" (protamine oligonucleotide nanoparticles) genannt, ebenfalls Oligonukleotide vermehrt einbringen. Diese Vorarbeiten von Frau Dr. Monika Junghans und weitere Publikationen stellten den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit dar.

(siehe Review: **4.1 Lochmann and Jauk et al. Drug Delivery of Oligonucleotides by Peptides**)

Die nähere physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel war nötig, da zu wenige Daten über die genaue chemische Zusammensetzung, die Oberflächenladung, das Self Assembly, den Einfluss verschiedener Parameter auf den Durchmesser und die Stabilität des kolloidalen Systems in isotonen Lösungen vorlagen.

Nanopartikel wurden durch Mischen von wässrigen Protamin-Lösungen und wässrigen Oligonukleotid-Lösungen hergestellt. Die Partikelbildung setzt spontan bei Raumtemperatur ein (Self Assembly) und die Partikelgröße stabilisierte sich nach 30 bis 40 Minuten.

Informationen über die chemische Zusammensetzung der Partikel sind von größter Wichtigkeit, weil nur eingebundene Oligonukleotide vor dem enzymatischen Abbau geschützt werden können. Zusätzlich musste auch der Protamingehalt der Partikel berücksichtigt werden, da freies Protamin nach dem Partikel Assembly mögliche unerwünschte Folgestrukturen ergeben könnte.

Die Partikel wurden nach der Herstellung abzentrifugiert, der Überstand von dem Pellet getrennt und nachfolgend in einer SAX-HPLC Anlage auf ihren Oligonukleotidgehalt vermessen. Die Pellet-Fraktion wurde mittels starker Anionenkonzentrationen wieder in Lösung gebracht und mit der gleichen Methode bestimmt. Es zeigte sich, dass ab einem Komplexierungsverhältnis von größer/gleich 1 : 1,5 (Oligonukleotid : Protamin) weniger als 1 % des eingesetzten Oligonukleotides im Überstand und etwa 90 % in der Pellet-Fraktion detektierbar war. Dieses Ergebnis verdeutlicht die hohe Oligonukleotidbeladung, die mit diesem Nanopartikelsystem ermöglicht werden.

Die Quantifizierung des Protamins mittels eines Fluoreszenzmarkers (Trimethylrhodamin), welcher kovalent an Protamin gebunden wurde, ergab eine Einbindung von 53 bis 68 % des eingesetzten Protamins in die Partikel. Das freie Protamin in der wässrigen Phase war nun von größtem Interesse, da dies in einem nächsten langsamen Reaktionsschritt zu einer Sekundäraggregation des kolloidalen Systems führen könnte und/oder in den Zellkulturversuchen unerwünschte, unspezifische Effekte zeigen könnte.

Die relative Oberflächenladung an der Grenzfläche eines Nanopartikels zu der ihn umgebenden wässrigen Lösung lässt sich in Form des Zetapotentials messen. Dieser Parameter kann Aufschluss darüber liefern, welche chemischen Gruppen (anionische, kationische) an der Grenzfläche präsentiert werden, wodurch qualitative Rückschlüsse auf den Partikelbau möglich sind. Zusätzlich ist das Zetapotential relevant für die Stabilität eines Kolloids. Wenn das Zetapotential annähernd null mV entspricht, stoßen sich die Nanopartikel nicht mehr elektrostatisch von einander ab und es kann zur Aggregationen und nachfolgend zur Präzipitation der Nanopartikel kommen. Auch zeigte sich in vielen, in der Fachliteratur publizierten Daten, dass kationische Nanopartikel mit der negativ-geladenen Zellmembran via elektrostatischer Wechselwirkungen interagieren und dies zu einer erhöhten

Zellaufnahme der Kolloide / Nanopartikel führt. Oligonukleotid-Protamin-Nanopartikel, hergestellt mit einem Massenverhältnis von 1 : 0,5 und 1 : 1 (Oligonukleotid : Protamin) wiesen ein negatives Zetapotential auf. Bei der Nanopartikel-Herstellung mit einem Massenverhältnis von 1 : 1,5 (Oligonukleotid : Protamin) wird die relative Nettoladung in der wässrigen Lösung nahezu kompensiert, wobei hingegen ab einem doppelten Überschuss von Protamin die Nanopartikel ein positives Zetapotential von etwa 15 bis 35 mV aufwiesen. In den weiteren Untersuchungen wurde daher das Verhältnis von 1 : 2 (Oligonukleotid : Protamin) favorisiert, da es die vorher formulierten Ansprüche an ein stabiles Nanopartikelsystem erfüllt und ein Minimum an freiem Protamin in der äußeren Phase enthielt.

Mischt man wässrige Oligonukleotid- und Protamin-Lösungen in demineralisiertem Wasser, so assemblieren die beiden Komponenten spontan via elektrostatischer Wechselwirkungen zu Nanopartikeln, welche die resultierende Mischung nach wenigen Minuten opaque erscheinen lässt.

Um nähere Informationen über diesen spontanen Self Assembly Prozess zu erhalten, wurden die positiv geladenen Nanopartikel kurz nach der Präparation auf einer negativ geladenen Glimmroberfläche (englisch: mica) fixiert und getrocknet. Mittels AFM (atomic force microscopy) wurden die Oberflächen vermessen, sodass auch kleinste Strukturen analysiert werden konnten. Der Vorteil von AFM gegenüber der Elektronenmikroskopie liegt in der Tatsache, dass die Proben nicht einem Hochvakuum ausgesetzt werden, was zu einer Verminderung der Durchmesser ganz besonders bei stark hydratisierten Biomolekülen führen kann. Die AFM-Aufnahmen zeigten kleine sphärische Strukturen mit einem Durchmesser von 30 bis 80 nm. Diese Komplexe wachsen und erreichen nach etwa 30 Minuten einen konstanten Durchmesser von 150 bis 170 nm. In dem von uns entwickelten Modell repräsentieren diese kleinen Komplexe etwas Ähnliches wie Kristallkeime, die in einem schnellen ersten Komplexierungs-Schritt Makromoleküle (Oligonukleotide und Protamin) auflagern und dabei an Größe gewinnen. Die so entstandenen Partikel etablieren sehr schnell eine elektrostatische Balance und stabilisieren sich. In einem zweiten, bedeutend langsameren Schritt kommt es dann zwischen den Partikeln zu einer Sekundäraggregation, die am Ende des Prozesses zu einer Präzipitation führen kann. Es ist daher ungemein wichtig für eine gewünschte Partikelqualität, die

Parameter des ersten Schritts zu beherrschen und den zweiten, langsamen Aggregations-Schritt so weit wie nur möglich zu unterdrücken. Um mehr Daten über den Prozess zu erhalten, wurden daher weitere Untersuchungen bezüglich der Partikelgröße durchgeführt.

Der Einfluss der Konzentration der Komponenten auf den Partikeldurchmesser wurde mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Hierzu wurden Partikel mit einem Massenverhältnis von 1 : 2 (Oligonukleotid : Protamin) und den Oligonukleotid-konzentrationen von 10, 30, 50, 400 µg/ml präpariert und mittels DLS nach einer und 24 Stunden vermessen. Es zeigte sich, dass die Durchmesser kaum von der Konzentration der Oligonukleotide abhängig sind (120 bis 150 nm). Die Proben, die mit 10 µg/ml Oligonukleotid präpariert wurden, wiesen etwas geringere Durchmesser nach einer Stunde auf (85 nm), wobei sich dieser Effekt aber nach 24 Stunden nivellierte. Die hochkonzentrierten Proben mit 400 µg/ml Oligonukleotid zeigte nach 24 Stunden einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 300 nm, der möglicherweise auf eine Duplexbildung der Partikel zurückzuführen ist. An dieser Stelle sei aber auch darauf hingewiesen, dass eine Zunahme des Partikeldurchmessers um 10 % eine Massenzunahme von 33 % entspricht. Die Polydispersität, ein Maß für die Partikelgrößenverteilung, lag für alle vermessenen Proben zwischen 0,12 und 0,18, sodass von einer annähernd monomodalen Partikelverteilung gesprochen werden kann.

Zusätzlich wurde mittels dynamischer Lichtstreuung auch der Einfluss des Oligonukleotid-Protamin-Verhältnis auf die Durchmesser verschiedener Partikelpräparationen bestimmt und diese Ergebnisse mit rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen (REM) verglichen. In den DLS Messungen wiesen die Präparationen, die mit einer Konzentration von 30 µg/ml Oligonukleotid hergestellt und in den Massenverhältnissen 1 : 0,5, 1 : 2, 1 : 2,5, 1 : 3, 1 : 5 (Oligonukleotid : Protamin) komplexiert wurden, alle einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 150 bis 200 nm auf. Ausnahmen bildeten die Präparationen im Verhältnis 1 : 1 und 1 : 1,5. Die Partikel, die mit gleichen Massen an Oligonukleotid und Protamin hergestellt wurden (1 : 1), zeigten einen mittleren Durchmesser um 700 nm und eine multimodale Partikelgrößenverteilung (Polydispersität 0,45). Auch die Präparationen mit einem Massenverhältnis 1 : 1,5 (Oligonukleotid : Protamin) waren mit einem mittleren hydrodynamischen

Durchmesser von circa 300 nm etwas größer als die anderen Ansätze. Dieses Phänomen könnte auf den Ausgleich der Nettoladungen in den Komplexen zurückzuführen sein, der sich, wie zuvor beschrieben, in einem geringen Zetapotential messen lässt. Um diese Befunde durch die DLS-Methode zu verifizieren, wurden diese Proben auf eine polierte Stahloberfläche aufgebracht und mittels flüssigen Stickstoff fixiert. Nachfolgend wurden die Proben lyophilisiert und in einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die gemessenen Durchmesser der DLS-Methode konnten durch die Rasterelektronenmikroskopie bestätigt werden. Das Massenverhältnis der beiden Komponenten (Oligonukleotid und Protamin) stellt somit in diesem binären System den kritischsten Parameter bezüglich eines größenkontrollierten Self Assembly dar.

Da in den verschiedenen Ansätzen von Laborversuchen und auch Therapien unterschiedliche Oligonukleotidlängen verwendet werden, untersuchten wir deren Einfluss auf den Partikeldurchmesser. Dabei wurden Partikel mit 10mer, 15mer, 20mer und 25mer Oligonukleotiden mit einer Oligonukleotid-Konzentration von 30 µg/ml und einem Massenverhältnis von 1 : 2 (Oligonukleotid : Protamin) hergestellt. Alle Partikel wiesen einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 145 bis 195 nm auf und hatten eine Polydispersität von 0,08 bis 0,13, was einer monomodalen Partikelverteilung entspricht. Die Länge der Oligonukleotide beeinflusst somit zwar leicht die Partikelgröße, dominiert sie aber nicht.

Da die dynamische Lichtstreuung schnell und sicher Partikeldurchmesser ermitteln kann, aber nur semiquantitative Aussagen über genaue Partikelgrößenverteilungen zulässt (Polydispersität), etablierten wir eine analytische Ultrazentrifugationsmethode (AUZ). Diese Methode wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Dieter Schubert am Institut für Biophysik erarbeitet (siehe auch 3).

Partikel mit einer Oligonukleotid-Konzentration von 30 µg/ml und einem Massenverhältnis von 1 : 2 (Oligonukleotid : Protamin) wurden nach 5 Minuten, 30 Minuten, sowie nach einer, drei und vierundzwanzig Stunden in der AUZ vermessen. Es zeigte sich, dass es in den ersten 30 Minuten ein starkes Partikelwachstum gibt und dann die Durchmesser bis zur dritten Stunde konstant bleiben. Nach 24 Stunden war der mittlere Durchmesser leicht verändert, aber vor allem die Partikelgrößenbreite stark vergrößert. Dieser Befund bestätigte die zuvor durchgeführten Messungen und den

daraus gezogenen Schluss, dass sich die Partikelpräparationen nach einigen Minuten stabilisieren können und dann folgend in einem zweiten, langsamen Schritt anfangen miteinander zu aggregieren.

Alle bisherigen Messungen wurden in demineralisiertem Wasser durchgeführt. Daher war die sich anschließende Fragestellung, wie sich das System in gepufferten Lösungen oder in Zellmedium verhalten würde. Auch hierfür wurde gegenüber der DLS-Methode die aufwendigere AUZ-Methode verwendet, da diese Aggregationsgeschehen, Präzipitation und ähnliche Prozesse in den kolloidalen Proben genauer auflösen kann.

Messungen der analytischen Ultrazentrifugation zeigten, dass die Partikel zwar nach 30 Minuten Inkubationszeit die gewünschten Durchmesser ergaben, aber in Zellmedium und einer 15 mM NaCl Lösung rasch aggregierten. Hierbei waren die Aggregate in Zellmedium weitaus kleiner als in der schwach ionischen NaCl Lösung. Dies führte zu der Überlegung, dass sich makromolekulare Verbindungen wie zum Beispiel Proteinkomponenten in dem Zellmedium stabilisierend auf die Partikel auswirken, wohingegen reines Kochsalz schon in geringen Konzentrationen zu einem Zusammenbruch des Zetapotentials führt oder eine Umgruppierung des noch frei vorliegenden Protamins vermittelt.

Für die AUZ Messungen wurden die Proben in 15 % (m/V) Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 20.000 Dalton (PEG 20.000) vermessen, um die Sedimentationsgeschwindigkeit zu verringern und somit präzisere Messungen zu ermöglichen. Dabei beobachteten wir, dass durch das Einbringen von PEG 20.000 es gelang das Nanopartikelsystem in Zellmedium für einige Stunden zu stabilisieren. Es ist jedoch unbestritten, dass ein Drug Delivery System, welches 15 % PEG 20.000 zur Stabilisierung benötigt, in keiner Zellkultur oder gar *in vivo* eingesetzt werden kann. Trotzdem war dies ein guter Hinweis, der zu weiteren Entwicklungen führen sollte.

(4.2 Lochmann et al. Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles)

In allen beschriebenen Versuchen wurden bisher chemisch modifizierte Oligonukleotide eingesetzt. Bei diesen wurde ein nicht bindendes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt (Phosphorothioate, siehe auch 2.3.3), um die Stabilität gegenüber Endonukleasen, sowie Exonukleasen zu erhöhen. Hierbei entstehen n-1 Stereoisomere, was sich auf die Spezifität der Bindung an das Zielmolekül (mRNA) negativ auswirken kann und sich in breiteren Peaks in der strong anion exchange HPLC (SAX-HPLC) darstellt. Auch sind diese Moleküle lipophiler und binden im großen Maße an zelleigene Proteine, eine Eigenschaft, die zu unerwünschten Seiteneffekten in den Zelltestungen führen kann. Es war daher für uns wichtig Informationen über die Instabilität von Oligonukleotiden und ihrer Phosphorothioat-Modifikationen gegenüber Nukleasen zu erhalten, um in folgenden Versuchen die Anzahl der Schwefelmodifikationen in den Oligonukleotiden auf ein optimales Maß zu minimieren. Die Oligonukleotide sollten noch eine gewisse enzymatische Stabilität aufweisen, wobei ein minimaler Phosphorothioat-Anteil eine hohe spezifische Wirkung in den Zellversuchen gewährleisten sollte ("gefensterte Phosphorothioate").

Hierzu wurden neben unmodifizierte Oligonukleotide (ODN) auch gefensterte Phosphorothioate eingesetzt, welche am 3'- und 5'-Ende jeweils drei Modifikationen aufwiesen (MIX-ODN), sowie Phosphorothioate, die an allen Nukleotiden ein Schwefelatom tragen (PTO). Die HPLC-Methode wurde so präzise entwickelt, dass 6mer bis 20mer Oligonukleotide trennbar sind. Kleinere Fragmente waren nicht mehr zu erfassen und wurden mit dem Einspritzpeak eluiert. Die ersten Ansätze der Oligonukleotidproben wurden in die HPLC eingespritzt und die Retentionszeiten der Peaks ermittelt. Danach wurden die zweiten Ansätze mit der jeweils gleichen Menge an ODN, MIX-ODN und PTO mit 30 I.E. DNase I unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde nach 45 Minuten gestoppt und die Proben vermessen. Bei den Ansätzen mit unmodifizierten Oligonukleotiden konnten nur noch kleinste Mengen an Fragmenten detektiert werden: Die Oligonukleotide waren fast quantitativ kleiner eines 6mers gespalten worden, d.h. sie wurden unter diesen Bedingungen völlig abgebaut. Bei den MIX-ODN Proben wurde der größte Teil des Materials in die Größen von etwa 10mer bis 15mer gespalten, jedoch konnten aber noch 6 % der Oligonukleotide intakt wiedergefunden werden. PTO-Proben wurden durch die DNase I nicht messbar abgebaut. Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass (I.) ODN sehr schnell von Nukleasen abgebaut werden

kann, (II.) eine partielle Schwefel-Modifikation der Oligonukleotide eine Stabilisierung des Moleküls erfährt und (III.) dass PTO, wenn überhaupt, nur sehr langsam abgebaut wird. Diese Befunde bestätigen die in der Literatur beschriebenen Verhalten gegenüber Endonukleasen. Es ist aber noch hinzuzufügen, dass die Stabilität der MIX-ODN gegenüber Exonukleasen im Vergleich zu Endonukleasen weitaus höher einzuschätzen ist.

(4.3 Rohmann et al. Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2})

Zusätzlich zu der bereits oben beschriebenen, methodischen Entwicklung von Oligonukleotid-Analytik musste für das Peptidgemisch Protamin als ein schwierig zu detektierender Analyt ebenfalls eine neue Methode entwickelt werden, um es analytisch qualitativ, wie auch quantitativ zugänglich zu machen. Die Quantifizierung sollte mit einem Standardassay in Mikrotiterplatten schnell, einfach und genau durchzuführen sein, ohne dass eventuell vorhandene Oligonukleotide einen großen Einfluss auf die Analytik besitzen.

Peptide und Proteine enthalten meistens aromatische Aminosäuren, welche durch spektrometrische Methoden (UV-Absorption bei λ_{\max} 280 nm) leicht zu quantifizieren sind. Protamin stellt jedoch einen Ausnahmefall dar, da es ausnahmslos aus aliphatischen Aminosäuren besteht, die durch das Fehlen konjugierter π -Elektronen nur energiereiches Licht (λ_{\max} kleiner 210 nm) absorbieren. Auch zeigten Standardassays für Proteinquantifizierungen wie zum Beispiel BCA-Assay, Bradford-Test, Nano-Orange-Assay keine befriedigenden Nachweisgrenzen (größer 10 $\mu\text{g/ml}$ Protaminstandard). Die Standardmethode zum Nachweis von Protamin aus dem Jahre 1930 ist die Sakaguchi-Reaktion, die auf einer kolorimetrische Reaktion mit einer Absorption bei λ_{\max} 500 nm beruht. Sie war jedoch für unsere Anforderungen (I.) unbefriedigend in der Nachweisgrenze und (II.) nicht durchführbar auf Mikrotiterplatten. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde eine Koppelung von Protamin an einen Fluoreszenzfarbstoff zum Beispiel über eine Isothiocyanatkopplung an eine primäre Aminogruppe des Protamins verwendet. Dies ist aber zeit- und methodenaufwendig, da der Analyt vom freien Farbstoff gereinigt

werden muss und es darüber hinaus bei stark geladenen oder voluminösen Fluophoren zu unerwünschten Effekten in Versuchen führen kann.

Eine Reaktion, die standardisiert für Aminosäuren in der HPLC Analytik eingesetzt wird, wandelt primäre Aminogruppen mit nicht fluoreszierenden *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) in Anwesenheit von Thiolgruppen über einen Ringschluss in Isoindol-Derivate (Anregung λ_{ex} 345 nm, Emission λ_{em} 450 nm) um. Das überschüssige, nicht fluoreszierende OPA stört hierbei das Fluoreszenzsignal nicht, sodass ein Aufreinigungsschritt entfällt. Die dabei zuvor verwendeten Reaktionsschemata wurden für die HPLC oder CE Applikation auf schnelle Reaktionsgeschwindigkeiten optimiert, um eine Derivatisierung auf einer Säule oder in einer Kapillare zu ermöglichen. Die Derivatisierung bei diesen Methoden läuft innerhalb von wenigen Sekunden ab, jedoch sind die Isoindol-Derivate innerhalb von zwei Minuten verändert und lassen in der Fluoreszenzausbeute nach.

Meine Zielsetzung war dagegen die Entwicklung von stabilen Isoindol-Derivaten für ein robusten Quantifizierungsassay, der in einem sinnvollen Zeitraum reproduzierbare Ergebnisse liefert. Diese Anforderungen konnten über die Wahl der Thiolgruppen, des pH-Werts und des Verhältnisses OPA/Thiolgruppen/Analyt erfüllt werden. Reagierten die in der Literatur beschriebenen OPA-Reagenzien nach weniger als einer Minute ab, so ließ die Fluoreszenzausbeute nach 2 Minuten stark nach. Setzt man jedoch statt dem stark toxischen Mercaptoethanol *N*-Acetylcystein (NAC) ein, so verlangsamt sich die Reaktion und der Ansatz zeigt erst nach 7 Minuten die maximal Fluoreszenz, die über die nächsten 30 Minuten nahezu konstant bleibt.

Im nächsten Schritt mußte evaluiert werden, ob die aromatischen primären Aminogruppen der Basen von Oligonukleotiden ebenso wie die aliphatischen, primären Aminogruppen des Protamins mit dem OPA-Reagenz reagieren würden. Die Messungen ergaben, dass nur eine sehr geringe, tolerierbare Fluoreszenzausbeute bei der Umsetzung von Oligonukleotiden mit OPA entsteht, solange keine durch eine Ammoniumsalz-Präzipitation aufgereinigten Oligonukleotide eingesetzt werden. Diese Art der Oligonukleotid-Aufreinigung ist für die Quantifizierung ungeeignet, da Ammonium *per se* eine intensive Fluoreszenz ergibt und in diesem System daher störend wirkt.

Protamin freie Base, Protaminchlorid und Protaminsulfat konnten mit dieser Methode schnell und einfach in 96-Well Mikrotiterplatten mit einer Nachweisgrenze von 0,935 µg/ml, 0,861 µg/ml und 1,081 µg/ml nachgewiesen werden. Die Bestimmungsgrenzen lagen bei 1,397 µg/ml, 1,286 µg/ml und 1,615 µg/ml. Die Methode wurde durch eine Crossvalidierung mit Protamin freie Base Standards (50 µg/ml) mit dem BCA-Assay verglichen. Die Ergebnisse konnten in diesem Konzentrationsbereich bestätigt werden. Die Signale wurden auf ihre Linearität geprüft.

Dieser Quantifizierungsassay stellte eine neue Möglichkeit dar, Protamin und seine Salze sicher in einem Bereich von 1,5 bis 50 µg/ml zu bestimmen. Die Anwesenheit von Oligonukleotiden (Konzentration 30 µg/ml) stellt kein Problem für die Bestimmung des Protamingehaltes dar, jedoch können Ammoniumverbindungen beträchtliche störende Einflüsse ausüben, da diese auch zu Isoindol-Verbindungen reagieren und zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

(4.4 Lochmann et al. New protamine quantification method in microtiter plates using *o*-phthaldialdehyde/*N*-acetyl-*L*-cysteine reagent)

Nach der physikochemischen Charakterisierung der binären Nanopartikel und der Methodenentwicklung im Bereich der Oligonukleotid- und Protamin-Analytik war es von größtem Interesse, die Nanopartikel in der Zellkultur zu untersuchen. Diese Experimente wurden in enger Kooperation am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main von meinem Kollegen Norbert Dinauer durchgeführt.

Die eingesetzten Nanopartikel wurden nochmals bezüglich ihrer Größe mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht, wobei hydrodynamische Durchmesser von etwa 180 nm und eine monomodal Partikelgrößenverteilung gefunden wurden. Das Zetapotential lag zwischen +18 bis +30 mV und korrelierte damit ebenfalls mit den bereits zuvor gemachten Messungen. Die Beladung wurde mittels eines „gel shift assays“ bestimmt. Bei dieser Methodik können nur freie Oligonukleotide aus den Komplexen in ein Gel migrieren, wo sie nachfolgend mit Hilfe von Ethidiumbromid mittels UV-Spektrometrie detektiert wurden. Es zeigte sich, dass schon ab einem Verhältnis von 1 : 1,25 (Oligonukleotid : Protamin) kein freies Oligonukleotid mehr nachweisbar war. In den SAX HPLC-Messungen lag die Grenze bei einem Verhältnis

von mehr als 1 : 1,5 (Oligonukleotid : Protamin). Diese Diskrepanz ist aus der niedrigeren Nachweisgrenze der SAX HPLC-Methode erklärbar.

Nachfolgend wurden Studien zur Zellaufnahme der Partikel an primären humanen Makrophagen und Jurkat-Zellen (humane T-Lymphozyten-Zelllinie) vorgenommen. Die Zellen wurden mit Nanopartikeln inkubiert, die an den Oligonukleotiden kovalent gebundene Fluophore beinhalteten. Als Vergleich dienten Zellen, die mit der gleichen Menge an freiem, nicht in Nanopartikel eingebundenem fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid inkubiert wurden. Anschließend wurden beide Zellproben mittels Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) vermessen. Es konnte eine 4-fach bis 20-fach höhere Fluoreszenzausbeute in den mit Nanopartikeln inkubierten Zellproben gefunden werden. FACS Analysen lassen zwar eine quantitative Aussage zu, beschreiben aber nicht sicher, ob die Nanopartikel in die Zellen aufgenommen wurden oder nur in der Zellmembran oder gar auf der Zellmembran lokalisiert sind. Um die Lokalisierung eindeutig zu klären, wurden konfokale Laser Scan Mikroskopie (CLSM) Aufnahmen der Zellen gemacht. Diese bestätigten eine Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der bei der Entwicklung von kolloidalen Drug Delivery Systemen zu berücksichtigen ist, ist die eventuell vorhandene Zytotoxizität. Diese wurde für unser System mittels eines ATP-Metabolismus abhängigen, Lumineszenz basierten Assays bestimmt. Humane Makrophagen und Jurkat-Zellen wurden für 12 Stunden mit Nanopartikel mit einer Oligonukleotid-Konzentration von 0,2 bis 5 μM inkubiert und danach vermessen. Diese Werte wurden mit dem ATP Metabolismus von nicht inkubierten Zellen verglichen. Nur eine 20 %-ige Reduktion der Zellviabilität konnte bei der höchsten Oligonukleotid-Konzentration in beiden Zelltypen gemessen werden. Dies ist ein guter Hinweis auf die geringe Zelltoxizität dieses Nanopartikelsystems.

Um die Dissoziation der Oligonukleotide aus den Nanopartikel zu untersuchen, wurden humane Makrophagen mit fluoreszenzmarkierten Nanopartikel inkubiert. Diese trugen sowohl eine Fluorescein-Markierung am Protamin, wie auch eine Tetramethylrhodamin-Markierung am Oligonukleotid. Es wurden sowohl Nanopartikel mit unmodifizierten Oligonukleotiden, als auch Phosphorothioate hergestellt, da unserer Meinung nach die veränderte Lipophilie auch ein verändertes Freisetzungverhalten bedingen könnte. Nach 24 Stunden Inkubation hatten die Makrophagen

zumeist mehrere Partikelassoziate aufgenommen. Erst nach 48 Stunden konnte man eine Dissoziation der unmodifizierten Oligonukleotide aus den Nanopartikeln detektieren. Dieser Effekt nahm nach 72 Stunden weiter zu, wobei sich die Oligonukleotide scheinbar vesikulär in der Zelle anreicherten. Bei den Makrophagen, die mit Phosphorothioate-Nanopartikeln inkubiert waren, konnte auch nach 72 Stunden keine klare intrazelluläre Dissoziation der Partikel gezeigt werden. Bei eingehender Betrachtung der Nanopartikelassoziate in den Zellen wurden 2 bis 5 μM große Aggregate gefunden. Diese bestanden aus 100 bis 300 nm großen Untereinheiten, die Protamin an der Oberfläche präsentierten. Es ist zu vermuten, dass während der Inkubation in den Zellmedien ähnliche Prozesse abliefen, die schon bei der physikochemischen Charakterisierung beobachtet wurden: Die Nanopartikel aggregierten im Zellmedium, sodass die Makrophagen Mikrometer große Partikel aufnahmen, die sich nur sehr langsam oder gar nicht auflösten.

Da sich die unmodifizierten Oligonukleotide im Gegensatz zu den PTO wieder aus den Nanopartikeln bzw. Nanopartikelassoziaten langsam herauslösten, wurde diese Formulierung einer genaueren Betrachtung unterzogen. Denn neben der Zellaufnahme eines Drug Delivery Systems, der Zytotoxizität und der intrazellulären Verteilung spielt natürlich die eigentliche Oligonukleotid-Wirkung letztendlich eine entscheidende Rolle.

Zur Bestimmung der Antisense Wirkung der Oligonukleotide wurde ein HIV-1-Promotor-Assay etabliert. Oligonukleotide, gerichtet gegen die kodierende Sequenz des viralen TAT-Proteins (Antisense Sequenz), wurden in Nanopartikel eingebunden und mit einer nichtkomplementären Sequenz (Scrambled Sequenz) sowie freien Oligonukleotiden (Antisense und Scrambled) in ihrer Wirkung verglichen. In diesem Assay konnten durch Nanopartikel in die Zellen eingebrachte Antisense-Sequenzen 30 % der Aktivität spezifisch reduzieren. Die freien Antisense Oligonukleotide reduzierten in der gleichen Konzentration von 2 μM Oligonukleotid die TAT-Aktivität nur um 10 %. Die Scrambled Sequenz hingegen zeigten keine Reduktion der Aktivität bei dieser Konzentration. Bei einem Einsatz von 5 μM Oligonukleotid konnte die TAT-Aktivität um 50 % reduziert werden, wobei jedoch auch die Kontrollsequenzen signifikante Wirkungen zeigten.

Neben den Vorteilen wie hoher Oligonukleotidgehalt, geringer Zytotoxizität und guter Zellaufnahme zeigte diese Oligonukleotid-Nanopartikel-Formulierung auch klare

Nachteile. Die Nanopartikel aggregieren in Zellmedium und die Oligonukleotide penetrieren zu langsam oder gar nicht aus den Nanopartikeln in der Zelle. Daher zeigen sie auch nur eine sehr geringe Wirkung.

(4.5 Dinauer et al. Intracellular tracking of Protamine/Antisense Oligonukleotide Nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation)

Aufgrund dieser Ergebnisse war eine Weiterentwicklung des Nanopartikelsystems erforderlich. Die grundlegende Idee bestand darin, einen makromolekularen Hilfsstoff zu finden, der durch sterische Hinderung die Aggregationsneigung der Nanopartikel unterbindet. Auch sollte er das freie Protamin komplexieren können, um einer Umstrukturierung des kolloidalen Systems entgegenzuwirken. Dies würde zu kleineren Partikeln in der Zelle führen und somit die Oberfläche für die Dissoziation der Oligonukleotide vergrößern. Ein Einbau des Makromoleküls in den Partikel könnte eine schnellere Auflösung der Nanopartikel in der Zelle, sowie eine schnellere Wirkstofffreigabe bewirken. Typisches Beispiel für eine solche Strategie ist aus der Vergangenheit der Einbau von Dextran (40.000 Dalton) in Acrylat-Nanopartikel.

Verschiedene untoxische Makromoleküle wie zum Beispiel Dextrane, Cyclodextrine und ähnliche Verbindungen führten nicht zu der gewünschten Stabilisierung unseres kolloidalen Systems in isotonen Lösungen. Nach wenigen Stunden waren die Präparationen vollständig präzipitiert. Das Einbringen von humanem Serumalbumin (HSA), eines 65 kDa schweren Proteins aus dem menschlichen Blut, ließ dagegen die Lösungen noch nach einem Tag opaque erscheinen: ein Hinweis auf eine kolloidale Lösung. Humanes Serumalbumin (HSA) wurde daher als Stabilisator weiter untersucht.

Um ein besseres Verständnis des Self Assembly Prozesses mit drei makromolekularen Bestandteilen zu erhalten, untersuchten wir detailliert die drei Komponenten dieses ternären Systems und ihr Zusammenspiel. Mit Hilfe der Röntgen-Kleinwinkel-Streuung (small angle X-ray scattering, SAXS) wurden die hydrodynamischen Durchmesser von Protamin (2,5 nm) und HSA (7 nm) bestimmt. Diese Größen gingen konform mit zuvor in der Literatur beschriebenen Durchmesser und waren für uns somit zusätzlich eine Validierung unserer Methode. Da die SAXS-

Messungen jedoch in höher konzentrierten Lösungen durchgeführt werden müssen, um ein genügend gestreutes Signal zu erhalten, wurde eine weitere Methode verwendet.

Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) ist eine Methode zur Messung der Fluktuation eines Fluoreszenzsignals in einem konfokalem Volumen (siehe auch 4.9). Es ist damit möglich, einzelne Moleküle oder Molekülkomplexe *in situ* zu messen. Allerdings ist diese Methode aber gegenüber der SAXS-Messung nicht so robust. Für die FCS-Messungen wurden die zu vermessenden Analyten Oligonukleotid, HSA und Protamin mit einem geeigneten Fluorophor (Trimethylrhodamin) markiert. Als Ergebnis der FCS-Messungen wurden für die Analyten folgende hydrodynamischen Durchmesser und Molekulargewichte errechnet: Oligonukleotide 2,8 nm und 6.800 Dalton, HSA 5,9 nm und 66.000 Dalton, Protamin 2,7 nm und 5.900 Dalton. Diese Befunde korrelieren gut mit den Werten der SAXS-Messungen. Gerade das Molekulargewicht von Protamin war von großem Interesse, da es zuvor nicht gelang durch Massenspektrometrie (MALDI TOF Analysen durchgeführt von Dr. Ralf Krüger, Institut für Pharmazeutische Chemie, Instrumentelle Analytische Chemie, AK Prof. Michael Karas) diese hochgeladenen kleinen Peptide in ihrer Masse zu bestimmen.

Im ersten Herstellungsschritt der ternären Partikel wird eine definierte wässrige Protamin-Lösung in eine isotonische HSA-Lösung gegeben und intensiv gemischt. Wenn man diese Mischung in der dynamischen Lichtstreuung vermisst, findet man ein diffuses Signal bei etwa 10 bis 13 nm Durchmesser. Da aber in diesem Bereich die dynamische Lichtstreuung mit einem Streuwinkel von 90° keine soliden Ergebnisse mehr liefert, konnte nur festgestellt werden, dass diese initiale Mischung noch keine Nanopartikel enthält.

Um diese „initialen Komplexe“ weiter aufzuklären, wurden wiederum SAXS-Messungen vorgenommen, da diese gut zur Charakterisierung von makromolekularen Komplexen wie Dimeren oder Tetrameren geeignet sind. Es wurden dabei Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 12 bis 45 nm gefunden, die aber keine klare Stöchiometrie zwischen Protamin und HSA besitzen. Diese initiale Komplexbildung ist gut zu erklären, wenn man sich vergegenwärtigt, dass HSA bei pH 7,4 leicht negativ geladen ist und *per se* schon ein hohes Bindungsvermögen für eine Vielzahl von Stoffen aufweist. Protamin ist als

starke Base bei dem gleichen pH-Wert stark positiv geladen. Allerdings kann die SAXS-Messung nicht mit völliger Sicherheit beschreiben, ob nicht zum Beispiel primär HSA-Komplexe entstanden sind. Um nochmals abzusichern, dass die initialen Komplexe auch wirklich aus den zwei Komponenten HSA und Protamin bestehen, wurden zusätzliche FCS-Messungen vorgenommen.

Nach kovalenter Bindung von Fluophoren an beide Komponenten konnte mit der FCS-Methode verifiziert werden, dass sowohl HSA als auch Protamin in diesen initialen Komplexen enthalten sind. Neben dieser qualitativen Information wurden auch die hydrodynamischen Durchmesser dieser Komplexe quantifiziert. Durchmesser von etwa 13 nm mit einer breiten Partikelgrößenverteilung wurden aus den FCS-Daten errechnet. Dieser Befund betätigte die zuvor vorgenommenen DLS- und SAXS-Messungen. Zusätzlich wurden keine Interaktionen zwischen den beiden negativ geladenen Molekülen Oligonukleotid und HSA detektiert. Diese Wechselwirkung würde also zum eigentlichen Self Assembly Prozess der Nanopartikelbildung kaum einen Beitrag leisten.

Wenn man nun diesen initialen Komplex aus HSA und Protamin mit einem Durchmesser von um die 15 nm in isotoner, wässriger Lösung Oligonukleotide hinzufügt, den Ansatz nach 10 Minuten einfriert und in einem Rasterelektronenmikroskop vermisst, so sind runde Nanopartikel mit einem Durchmesser von unter 300 nm zu sehen. Man kann damit sehr schön darstellen, dass der eigentliche Assemblierungsprozess zum endgültigen Nanopartikel erst durch die Zugabe der Oligonukleotide erfolgt.

Um den Einfluss der HSA-Konzentration auf die Partikelgröße zu bestimmen, wurden dynamische Lichtstreuungsversuche durchgeführt. Mischt man Protamin und Oligonukleotide in salzfreiem Wasser, so entstehen sehr schnell Nanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 150 bis 200 nm, wie bereits aus den Untersuchungen des binären Systems (Proticles) bekannt war. Setzt man diesem Gemisch unterschiedliche Mengen an HSA hinzu, so verändert sich die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung (monomodal) bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml HSA kaum. Bei Konzentrationen von 1 oder 2 mg/ml HSA in der kolloidalen Lösung aggregieren die Nanopartikel zu größeren Assoziaten mit einem mittleren Durchmesser von etwa 1 µm und einer breiten Partikelgrößenverteilung. HSA hat daher nicht *per se* eine stabilisierende Wirkung auf das Partikelsystem, sondern kann

in höheren Konzentrationen das elektrostatische Gleichgewicht im Kolloid nachhaltig stören. Unser Ziel war aber die Herstellung von Partikeln bereits in isotonischen Puffern, um später Umstrukturierungen der Partikel in zum Beispiel Zellmedium zu vermeiden und um das Drug Delivery System verträglicher für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen zu gestalten. Wie schon zuvor untersucht, weisen binäre Oligonukleotid-Protamin-Partikel (Proticles), hergestellt in isotonischer Kochsalzlösung, isotonischen Phosphatpuffer (PBS; pH 7,4) oder Zellmedium, Partikelgrößen um 2 µm auf. Setzt man diesem System schon im ersten Schritt des Assemblierens HSA zu (initialer Komplex), kann die Partikelgröße konzentrationsabhängig und reproduzierbar verkleinert werden. Bei einer Konzentration von 1 mg/ml HSA sind die Partikel mit einem Durchmesser von etwas 250 nm und einer monomodalen Partikelgrößenverteilung für mindestens 6 Stunden stabil. Dieser Befund konnte durch fluoreszenzmarkierte Partikel mit der FCS Methode bestätigt werden und korreliert mit den Durchmesser ermittelt in der Raster-elektronenmikroskopie.

Nachfolgend wurde der Einfluss der Protaminmenge auf die Partikelgröße wiederum mit der dynamischen Lichtstreuung untersucht. Hierbei wurden Partikel in einem Standard-Zellmedium mit 1 mg/ml HSA und 30 µg/ml (etwa 5 µM) Oligonukleotid assembliert, wobei die Protaminmenge variierte. Bei einem Massenverhältnis weniger als 1 : 1,5 (Oligonukleotid : Protamin) wurden Partikel mit einem mittleren Durchmesser von mehr als 650 nm und einer multimodalen Partikelgrößenverteilung gefunden. Ab einem Massenverhältnis von mehr als 1 : 2 (Oligonukleotid : Protamin) wiesen die Partikel einen Durchmesser von 200 bis 250 nm und eine monomodale Partikelgrößenverteilung auf.

Die Oberflächenladung (Zetapotential) eines Kolloids ist, wie zuvor beschrieben, nicht nur ein Parameter für die Stabilität, sondern kann auch Informationen über die an der Oberfläche präsentierten Moleküle liefern. Wir untersuchten daher die Zetapotentiale der Nanopartikel, hergestellt in Zellmedium mit 1 mg/ml HSA, 30 µg/ml Oligonukleotid und verschiedenen Mengen Protamin. Die Protaminmenge hatte in dem binären Nanopartikelsystem einen maßgeblichen Einfluss auf das Zetapotential, allerdings nicht in dem neuen, ternären System nach Assemblierung von Oligonukleotiden und Protamin in Gegenwart von HSA. Das Zetapotential der ternären Partikel variierte nur von -12 mV bis -25 mV. Eine Erklärung hierfür könnte

eine Auflagerung von HSA auf der Oberfläche der Partikel sein, die damit auch das sekundäre Aggregieren verhindern.

Zusätzlich zu den physikalischen Charakterisierungen wurde die chemische Zusammensetzung der Partikel analysiert. 90 % der Oligonukleotide wurden bei einem mindestens doppelten Überschuss an Protamin in die Partikel eingebunden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für den effektiven Transfer der Oligonukleotide in die Zellen, da nur eingebundenes Oligonukleotid vor enzymatischen Abbau geschützt werden kann. Im Verhältnis wurde etwa 10 % mehr Protamin als Oligonukleotid in der Partikelmatrix fixiert; der Rest verblieb im umgebenden Medium. Nur 7 % bis 10 % des eingesetzten HSA wurden in oder auf den Partikeln gebunden, ein Befund, der typisch ist für ein „Schutzkolloid“. Schutzkolloide sind Makromoleküle oder Kolloide, welche durch sterische Hinderung an der Oberfläche eine Aggregation oder Präzipitation einer Suspension unterbinden. Zusätzlich hat in unserem Fall HSA einen weiteren Einfluss auf den Assemblierungsprozess, insbesondere auf die Kinetik des Self Assembly. Das Protamin muss zuerst von einem initialen, instabilen Komplex mit HSA abdiffundieren, um mit Oligonukleotiden Nanopartikel zu bilden. Zuletzt könnten die 10 % eingebundenes HSA den intrazellulären Release der Oligonukleotide aus den Nanopartikeln unterstützen, da HSA schnell durch zelleigene Proteasen abgebaut werden kann und somit den Zerfall der Nanopartikel beschleunigt.

Man kann den Self Assembly Prozess hinsichtlich der molekularen Massen anschaulich beschreiben. Eine Mischung aus Protamin (6 kDa) und HSA (65 kDa) bilden initiale Komplexe mit etwa einer mittleren Molmasse von 650 kDa. Gibt man hierzu Oligonukleotide (6 kDa) und mischt das System, entstehen spontan Nanopartikel mit einer Molmasse von 10^6 bis 10^7 kDa abhängig von der Partikelgröße.

Nach der grundlegenden Charakterisierung dieser Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel (AlPrO-Nanopartikel) sollte evaluiert werden, ob dieses Drug Delivery System als eine Basis für verschiedene Oligonukleotid-Qualitäten eingesetzt werden kann. Hierzu wurden exemplarisch unmodifizierte und phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide mit variierten Schwefelanteil, sowie doppelsträngige RNA (small interfering RNA, siRNA) in Nanopartikel eingebaut und mittels dynamischer Lichtstreuung vermessen. Die Partikeldurchmesser nahmen mit steigendem

Schwefelanteil in den Oligonukleotiden ab (285 nm bis 109 nm), wobei die Partikelgrößenverteilung breiter wurde, sich aber noch in einem tolerierbaren Bereich bewegte (Polydispersität 0,12 bis 0,26). Nanopartikel hergestellt mit siRNA wiesen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von etwa 190 nm mit einer monomodalen Partikelverteilung auf.

(4.6 Lochmann et al. Albumin-Protamine-Oligonukleotid Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation)

Mit diesen Ergebnissen war es nun möglich, ein stabiles Drug Delivery System für Oligonukleotide basierend auf HSA-Protamin-Nanopartikeln für Zellversuche zur Verfügung zu stellen. Hierzu wurde von meinem Kollegen Herrn Jörg Weyermann ein zelluläres Testsystem an murinen Fibroblasten entwickelt. Das neuartige Testsystem basiert auf einem excitotoxischen Zellassay der mit verschiedenen Standard-Zytotoxizitätsmethoden (LDH, MTT, Neutralrot) kombiniert wurde, um unterschiedliche toxische Reaktionen auf die Zellen differenziert zu erfassen. Diese methodische Weiterentwicklung hat den Vorteil, dass unspezifische Nebeneffekte vom Drug Delivery System von der eigentliche Oligonukleotid-Antisense Wirkung getrennt erfasst werden können. Bevor aber mehrere Drug Delivery Systeme für Oligonukleotide im Vergleich getestet wurden, wurde das Testsystem bezüglich der EC_{50} Werte und weiterer wichtiger Parameter mit Modellsubstanzen validiert.

(4.7 Weyermann et al. Comparison of in vitro cytotoxicity assays)

Für die zelluläre Testung wurden AlPrO-Nanopartikel mit unterschiedlicher Protaminmenge hergestellt und nochmals bezüglich Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung (Polydispersität), Oberflächenladung (Zetapotential) und Oligonukleotidgehalt analysiert und mit einem kommerziell erhältlichen, liposomalen Transfektionsreagenz (DOTAP) verglichen. Die physikochemischen Parameter der AlPrO-Nanopartikel entsprachen weitgehend der in 4.6 beschriebenen Werte. DOTAP-Liposomen waren nach der Beladung mit Oligonukleotiden in Zellmedium noch leicht positiv geladen (+5,6 mV), zeigten einen mittleren Durchmesser von 215

nm mit einer breiten, für kationische Liposomen typischen Partikelgrößenverteilung. Etwa 89 % des Oligonukleotides war an die Liposomen gebunden.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzassays wurde die Transfereffizienz von AIPrO-Nanopartikeln mit der von freien Oligonukleotiden und DOTAP-Liposomen in Zellen verglichen. Freie Oligonukleotide wurden nur in einem geringen Maße in die Zellen eingebracht, wohingegen eine sechs- bis zehnfach höhere Fluoreszenz bei beiden Drug Delivery Systemen detektiert werden konnte. Um abzusichern, dass das Ergebnis einer erhöhten Oligonukleotid-Zellaufnahme nicht auf der Anlagerung von großen Aggregaten in oder auf der Zellmembran beruht, wurden CLSM-Bilder angefertigt. Diese belegten die diffuse Verteilung der Oligonukleotide im Zytosol bei einigen mit DOTAP versehenen Zellen und bei nahezu allen mit AIPrO-Nanopartikeln inkubierten Zellen.

Die Zytotoxizität der freien Oligonukleotide und AIPrO-Nanopartikel war äußerst gering, wohingegen die kationischen DOTAP-Liposomen eine beträchtliche Zytotoxizität schon bei geringen Konzentrationen aufwiesen (Reduktion der Viabilität der Zellen von 50 %).

Der Antisense-Effekt der mit AIPrO-Nanopartikeln in die Zellen eingebrachten Oligonukleotide war vergleichbar mit der Effektivität der DOTAP-Liposomen und war etwa siebenfach höher als der Effekt durch Inkubation mit freien Oligonukleotiden. Diese Befunde aus einem funktionalen Assay wurden darüber hinaus in Western Blot Analysen auf Proteinebene bestätigt. Damit waren die AIPrO-Nanopartikel nicht nur physikochemisch dem binären System überlegen, sondern es konnte auch bei einer gleichwohl geringeren Zytotoxizität die Effektivität des Oligonukleotid Drug Delivery Systems erhöht werden.

(4.8 Weyermann et al. Albumin-Protamine-Oligonukleotid Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect)

Um einen weiteren Vergleich der AIPrO-Nanopartikel mit aktuell verwendeten Drug Delivery Systemen durchzuführen, wurden verschiedene Trägersysteme untersucht. Eine dieser Charakterisierungen der Drug Delivery Systeme für Oligonukleotide erschien uns besonders interessant. Hierbei handelt es sich um kationisierte

Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel. Diese wurden mittels Fluoreszenz Korrelationsspektroskopie (FCS) und anderen flankierenden Methoden bezüglich ihrer Herstellung, Beschaffenheit, chemischen Aufbau und ihres Beladungspotentials mit Oligonukleotiden charakterisiert. Um sie der FCS-Messung zugänglich zu machen, wurden neue Methoden der Fluoreszenzmarkierung für diese Art von Partikeln entwickelt. Zusätzlich wurden diese Partikel anschließend verwendet, um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Drug Delivery Systemen zu ziehen.

(4.9 Weyermann and Lochmann et al. Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy)

Dieser Vergleich der Oligonukleotid Drug Delivery Systeme wurde mit Hilfe der gleichen Methoden wie schon unter 4.8 beschrieben durchgeführt. Verglichen mit dem Antisense-Effekt von freien Oligonukleotiden wurden das binäre Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel System (Proticles), die AIPrO-Nanopartikel, DOTAP-Liposomen, Lipofectin-Liposomen, zwei kationisierte Acrylat-Nanopartikel Systeme (Polyhexylcyanoacrylat und Polybutylcyanoacrylat) und VP1-Polyoma-Viruskapsiden untersucht. Es zeigte sich, dass nur Lipofectin-Liposomen bessere Antisense-Wirkungen zeigten als die AIPrO-Nanopartikel. Diese erbrachten vergleichbare Resultate wie DOTAP-Liposomen und kationische Acrylat-Nanopartikel, wobei sie bedeutend geringere zytotoxische Effekte aufwiesen. Auch die bereits bekannte Tatsache, dass die „Proticles“ weniger effektiv im Oligonukleotid-Delivery sind als die AIPrO-Nanopartikel, konnte in diesem direkten Vergleich bestätigt werden.

(4.10 Weyermann et al. Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug Delivery Systems)

Die von mir entwickelten AIPrO-Nanopartikel stellen somit eine neue und sichere Möglichkeit eines peptidbasierten Drug Delivery von Oligonukleotiden in Zellen dar. Ein nächster Schritt in der Weiterentwicklung könnte das Aufbringen von Liganden an die Partikeloberfläche darstellen, um ein spezifisches Zelltargeting zu erreichen.

6 Addendum

Aus der Zusammenarbeit der Arbeitskreise von Herrn Prof. Dr. Dieter Schubert (Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität) und unseres Arbeitskreises (AK Prof. Dr. Andreas Zimmer) ist eine weitere Publikation erarbeitet und eingereicht, sowie eine zusätzliche zur Publikation vorbereitet worden. Diese sind Folgende:

Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: preparation, physical properties and intracellular processing

Vitali Vogel, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Gottfried Mayer, Christos Tziatzios, Jacomina A. van den Broek, Winfried Haase, Daan Wouters, Ulrich S. Schubert, Jörg Kreuter, Andreas Zimmer, Dieter Schubert*

Journal of Controlled Release 2004, in press.

*(*Corresponding author)*

Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: protamine sulfate causes drastic size reduction

Gottfried Mayer, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Jacomina A. van den Broek, Christos Tziatzios, Winfried Haase, Daan Wouters, Ulrich S. Schubert, Andreas Zimmer, Jörg Kreuter, Dieter Schubert*

Submitted.

*(*Corresponding author)*

Vogel et al. beschreiben in dieser Arbeit die Herstellung, physikalische Charakterisierung und die intrazelluläre Prozessierung von Oligonukleotid-Protamin-HSA Nanopartikeln. In dieser Kooperation wurden die ternären Partikel erstmals hergestellt und charakterisiert. Die Arbeit *Vogel et al.* stellt also die Basis aller anderen über die ternären Partikel dar.

Verschiedene Herstellungsverfahren für die Nanopartikel werden beschrieben, wobei zur homogenen Herstellungsweise der Nanopartikel eine Spritzenpumpe bei der Zugabe von Lösungen eingeführt wurde. Die Größe der Partikel wurde mittels der Analytischen-Ultrazentrifugation ermittelt. Diese Befunde wurden durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) und Raster-Kraft-Mikroskopie (atomic force microscopy, AFM) verifiziert.

Der Gehalt an humanem Serum-Albumin (HSA) in den Nanopartikeln wurde mittels UV-Spektroskopie (Derivative Spektroskopie) bestimmt.

Die Zellaufnahme wurde anhand von Versuchen mit Maus-Fibroblasten *in vitro* untersucht. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide in die Nanopartikel eingebunden und der Verbleib dieser in den Zellen mittels konfokaler Laser Scan Mikroskopie (confocal laser scan microscopy, CLSM) untersucht.

Mit diesem „ternären“ Self Assembly System, bestehend aus den drei Komponenten Oligonukleotide, Protamin und HSA, konnte gezeigt werden, dass (1.) die Zugabe von HSA zu dem „binären“ Gemisch aus Protamin und Oligonukleotiden eine erhöhte Stabilität in salzhaltigen Lösungen besitzt, (2.) diese einen Durchmesser von um die 200 nm aufweisen und (3.) diese Nanopartikel gut von Maus-Fibroblasten aufgenommen werden und diese die phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide intrazellulär gut freigegeben.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass diese Partikel eine positive Weiterentwicklung der Protamin-Oligonukleotide darstellt.

Mayer et al. beschreiben, aufbauend auf *Vogel et al.*, die Auswirkungen von dem Gebrauch des Protamin-Salzes Protaminsulfat auf das Self Assembly von Oligonuklotid-Protamin-Albumin Nanopartikeln.

Hierzu wurden wiederum die Methoden der Analytischen Ultrazentrifugation, der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) und der Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM) eingesetzt. Auch diese Nanopartikel wurden in einem Maus-Fibroblasten Zellmodell bezüglich der Zellaufnahme charakterisiert.

Hierbei wurde interessanterweise eine drastische Reduktion des mittleren Durchmessers von 200 nm (Nanopartikel hergestellt mit Protamin freie Base) auf 40 nm (Nanopartikel hergestellt mit Protaminsulfat) beschrieben. Auch bei diesen Partikeln konnte eine Aufnahme in Maus-Fibroblasten gezeigt werden.

Beide Arbeiten zeigen, dass Oligonukleotid-Protamin-Albumin Nanopartikel ein potentielles Drug Delivery System für die Wirkstoffklassen der Phosphorothioat-Oligonukleotide darstellen.

7 Präsentationen

7.1 Poster

9th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Antalya, Türkei (02.-04.11.2001)

A novel strategy for antisense delivery into cells using protamine-oligonucleotide nanoparticles; Lochmann D., Dinauer N., von Briesen H., Zimmer A.

4th European Graduate Student Meeting der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt am Main (08.-10.02.2002)

Characterisation of Protamine-Oligonucleotide Particles for antisense delivery into cells; Lochmann D., Vogel V., Schubert D., Zimmer A.

4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, APV, Florenz, Italien (08.-11.04.2002)

Characterisation of Protamine-Oligonucleotide Particles for antisense delivery into cells; Lochmann, D., Jennes I., Vogel, V., Schubert, D., Zimmer, A.

Antisense delivery into primary cells with protamine-based-nanoparticles; Dinauer N., Lochmann D., Demirhan I., Chandra A., Zimmer A., von Briesen H.

10th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Antibes Juan-les-Pins, Frankreich (12.-16.10.2002)

Protamine-based-nanoparticles as delivery system for oligonucleotides and siRNA into cells; Lochmann D., Dinauer N., Vogel V., Schubert D., v. Briesen H., Zimmer A.

5th European Graduate Student Meeting der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt am Main (08-11.03.2003)

Charakterisierung von Protamin in Lösung mittels der Fluoreszenz Correlations Spektroskopie (FCS), Georgens C., Lochmann D., Zimmer A

XVII. Wissenschaftliche Tagung der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft, Graz, Österreich (24.-26.04.2003)

Antisense Therapie gegen das HI-Virus mittels Protamin-Oligonucleotid-Nanopartikeln; Lochmann D., Weyermann J., Dinauer N., von Briesen H., Zimmer A.
Testung von Antisense-Oligonucleotid-Formulierungen am Beispiel des NMDA-Rezeptors; Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A.

Charakterisierung des Arzneistoffträgers Protamin mit Hilfe der Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS); Georgens C., Lochmann D., Zimmer A.

30th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Glasgow, Schottland (19.-23.07.2003)

Enhanced cellulare uptake of Oligonucleotides and siRNA using protamine-based-nanoparticles; Lochmann D., Weyermann J., Vogel V., Schubert D., Zimmer A.

Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems against N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor expression; Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A.

Characterisation of solvated Protamine using Fluorescence Correlation Spectroscopy; Georgens C., Lochmann D., Zimmer A.

RNA Structure, Function and Ligand Interaction, Symposium Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Frankfurt (30.10.-1.11.2003)

Physicochemical characterisation of Oligonucleotide loaded Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles using Fluorescence Correlation Spectroscopy; Georgens C., Lochmann D., Weyermann J., Zimmer A.

Characterisation of solvated Protamine using Fluorescence Correlation Spectroscopy; Georgens C., Lochmann D., Zimmer A.

RNA Structure, Function and Ligand Interaction, Symposium Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Frankfurt (03.03.2004)

Biopolymere Trägersysteme für RNA-Liganden, Georgens C., Lochmann D., Weyermann J., Zimmer A.

International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2004, Nürnberg (15.-18.03.2004)

Peptide-Based Nanoparticles: A promising approach towards antisense delivery; Jauk E., Lochmann D., Weyermann J., Zimmer A.

Physicochemical characterisation of cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles using Fluorescence Correlation Spectroscopy; Georgens C., Lochmann D., Weyermann J., Zimmer A.

7.2 Vorträge

BMBF Halbjahres-Meeting, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (07.02.2001)

Supramolekulare Drug Delivery Systeme zum gezielten Transport von Nucleinsäuren über Biologische Barrieren

BMBF Halbjahres-Meeting, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main (08.08.2001)

Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel

Symposium "Drug Delivery Systeme für Oligonukleotide", Karl-Franzens-Universität, Graz (18.09.2001)

Protamin-Oligonucleotid Partikel für die Antisense Therapie

Sommer-Symposium des Graduierten-Kollegs Arzneimittelentwicklung und Analytik, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (25.10.2001)

Self-Assembling-Protein/DNA-Assoziatsysteme zum gezielten Transport von Nucleinsäuren über biologische Barrieren

Jahres Meeting des Graduierten-Kollegs Arzneimittelentwicklung und Analytik, Geisenheim-Rheingau (25.10.2002)

Protamin-Oligonucleotid Partikel für die Antisense Therapie

BMBF Halbjahres-Meeting, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(08.02.2002)

Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel

BMBF Halbjahres-Meeting, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main
(07.10.2002)

Physiko-chemische Charakterisierung von Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel

Jahres Meeting des Graduierten-Kollegs Arzneimittelentwicklung und Analytik, Eltvill-Rheingau (18.01.2003)

Größenbestimmung von Nanopartikeln

BMBF Halbjahres-Meeting, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(09.02.2003)

Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel

BMBF Abschluss-Meeting, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(10.08.2003)

Protamin-basierte-Oligonukleotid Nanopartikel

Jahres Meeting des Graduierten-Kollegs Arzneimittelentwicklung und Analytik,
Lich-Wetteraukreis (09.01.2004)

Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 18. Juni 1972
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schule

1978 - 1982 Römerstadt-Grundschule, Frankfurt am Main
1982 - 1991 Wöhler-Gymnasium, Frankfurt am Main
1991 Abitur (Note: 1,7)

Studium

10/1991 - 09/1992 Studium der Pharmazie an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
10/1992 - 12/1993 Unterbrechung des Studiums, Einberufung zum Zivildienst
04/1994 - 10/1998 Studium der Pharmazie an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
09/1996 1. Staatsexamen (Note: befriedigend)
10/1998 2. Staatsexamen (Note: sehr gut)
06/2000 3. Staatsexamen (Note: gut), Gesamtnote: gut
07/2000 Approbation zum Apotheker

Praktika

12/1993	Schloss-Apotheke, Frankfurt am Main
09/1994	Apotheke St. Markus-Krankenhaus, Frankfurt am Main
05/1999 - 10/1999	STADA Arzneimittel AG, Bad Vilbel, Abteilung Validierung und Qualifizierung / Produktion
11/1999 - 04/2000	Süd-Apotheke, Bad Vilbel

Promotion

10/2000 - 08/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Technologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, im Rahmen des Verbundprojekt (03C0308A-C) "Supramolekulare Drug Delivery Systeme zum gezielten Transport von Nukleinsäure-Analoga über biologische Barrieren" vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
12/2000 - 03/2004	Kollegiat des Graduiertenkollegs (GK 137/3) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), "Arzneimittel-Entwicklung und Analytik"
05/2002 - 06/2002	Gastwissenschaftler am Institut für Pharmazeutische Chemie und Technologie, Karl-Franzens-Universität, Graz
09/2003 - 03/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Technologie Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
10/2000 - 03/2004	Anfertigung einer kumulativen Dissertation
14.12.2004	Disputation

Akademische Lehrer

G. Dannhardt, Th. Dingermann, J. Dressman, E. Ehlers, J. Kreuter, G. Lambrecht, H. Linde, W.E. Müller, E. Mutschler, C. Noe, H. Oelschläger, M. Schubert-Zsilavec, D. Steinhilber, A. Zimmer

9 Literaturverzeichnis

- Akhtar, S. and Lewis, K. J., 1997. Antisense oligonucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained-release biodegradable polymer microspheres. *Int J Pharm* 151, 57-67.
- Allen, M. J., Bradbury, E. M. and Balhorn, R., 1997. AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica. *Nucleic Acids Res* 25, 2221-6.
- Ammon, P. T., Häring, H. U., Kellerer, M., Laube, H. and Mark, M., 2000. Antidiabetika, Diabetes mellitus und Pharmakotherapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- An, K., Gillock, E. T., Sweat, J. A., Reeves, W. M. and Consigli, R. A., 1999. Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J Gen Virol* 80, 1009-16.
- Ando, T., Yamasaki, M. and Suzuki, K., 1973. Protamines - Isolation, Characterisation, Structure and Function. Berlin, Heidelberg, New York.
- Arellano, A., Canales, M., Jullian, C. and Brunet, J. E., 1988. Fluorescence studies on clupein protamines: evidence for globular conformation. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 633-9.
- Arnedo, A., Espuelas, S. and Irache, J. M., 2002. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm* 244, 59-72.
- Arnedo, A., Irache, J. M., Merodio, M. and Espuelas Millan, M. S., 2004. Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J Control Release* 94, 217-27.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. and McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 79, 137-159.
- Bauer, K. H., Frömring, K. H. and Führer, C. 2002 Mikropartikel, Nanopartikel und Liposomen. In *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, Vol. 7, Bauer, K. H., Frömring, K. H. and Führer, C. eds, pp. 361-369. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Bertling, W. M., Gareis, M., Paspaleeva, V., Zimmer, A., Kreuter, J., Nurnberg, E. and Harrer, P., 1991. Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers. *Biotechnol Appl Biochem* 13, 390-405.
- Berton, M., Benimetskaya, L., Allemann, E., Stein, C. A. and Gurny, R., 1999. Uptake of oligonucleotide-loaded nanoparticles in prostatic cancer cells and their intracellular localization. *Eur J Pharm Biopharm* 47, 119-23.
- Berton, M., Turelli, P., Trono, D., Stein, C. A., Allemann, E. and Gurny, R., 2001. Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Pharm Res* 18, 1096-101.
- Bianchi, F., Rousseaux-Prevost, R., Bailly, C. and Rousseaux, J., 1994. Interaction of human P1 and P2 protamines with DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 201, 1197-204.
- Bianchi, F., Rousseaux-Prevost, R., Sautiere, P. and Rousseaux, J., 1992. P2 protamines from human sperm are zinc-finger proteins with one CYS2/HIS2 motif. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 540-7.
- Boulikas, T. and Martin, F., 1997. Histones, protamine, and polylysine but not poly(E:K) enhance transfection efficiency. *International Journal of Oncology* 10, 317-322.

- Braun, H., Boller, K., Lower, J., Bertling, W. M. and Zimmer, A., 1999. Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 29, 31-43.
- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H. A., Krieg, A. M., Hartmann, G. and Endres, S., 2000. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 165, 6278-86.
- Brus, C., Santi, P., Colombo, P. and Kissel, T., 2002. Distribution and quantification of polyethylenimine oligodeoxynucleotide complexes in human skin after iontophoretic delivery using confocal scanning laser microscopy. *J Control Release* 84, 171-81.
- Budker, V. G., Knorre, D. G. and Vlassov, V. V., 1992. Cell membranes as barriers for antisense constructions. *Antisense Research & Development* 2, 177-84.
- Bunnell, B. A., Askari, F. K. and Wilson, J. M., 1992. Targeted delivery of antisense oligonucleotides by molecular conjugates. *Somat Cell Mol Genet* 18, 559-69.
- Cech, T. R., 2002. Ribozymes, the first 20 years. *Biochem Soc Trans* 30, 1162-6.
- Chavany, C., Le Doan, T., Couvreur, P., Puisieux, F. and Helene, C., 1992. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides. *Pharm. Res.* 9, 441-449.
- Chavany, C., Saisonbehmoaras, T., Ledoan, T., Puisieux, F., Couvreur, P. and Helene, C., 1994. Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexyl cyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake. *Pharmaceutical Research* 11, 1370-1378.
- Chen, C. P., Zhang, L. R., Peng, Y. F., Wang, X. B., Wang, S. Q. and Zhang, L. H., 2003. A concise method for the preparation of Peptide and arginine-rich Peptide-conjugated antisense oligonucleotide. *Bioconjug Chem* 14, 532-8.
- Cherng, J. Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J. and Hennink, W. E., 1996. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethylmethacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res* 13, 1038-42.
- Choksakulnimitr, S., Masuda, S., Tokuda, H., Takakura, Y. and Hashida, M., 1995. In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. *J Control Release* 34, 233-241.
- Citro, G., Ginobbi, P. and Szczylik, C., 1993. Receptor-mediated oligodeoxynucleotides delivery by estradiol and folic acid polylysine conjugates. *Cytotechnology* 11 Suppl 1, S30-4.
- Citro, G., Perrotti, D., Cucco, C., D'Agnano, I., Sacchi, A., Zupi, G. and Calabretta, B., 1992. Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7031-5.
- Citro, G., Szczylik, C., Ginobbi, P., Zupi, G. and Calabretta, B., 1994b. Inhibition of leukaemia cell proliferation by folic acid-polylysine-mediated introduction of c-myc antisense oligodeoxynucleotides into HL-60 cells. *Br J Cancer* 69, 463-7.
- Coester, C., Kreuter, J., von Briesen, H. and Langer, K., 2000a. Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA). *Int J Pharm* 196, 147-9.
- Coester, C. J., Langer, K., van Briesen, H. and Kreuter, J., 2000b. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul* 17, 187-93.

- Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H. and Birnstiel, M. L., 1990. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4033-7.
- Couvreur, P. and Malvy, C., 2000. *Pharmaceutical Aspects of Oligonucleotides*. Taylor & Francis, London.
- Crooke, S. T., 1999a. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489, 31-44.
- Crooke, S. T., 1999b. Molecular Mechanisms of Antisense Drugs: Human RNase H. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 9, 377-379.
- D'Auria, G., Paolillo, L., Sartorio, R. and Wurzbürger, S., 1993. Structure and function of protamines: an ¹H nuclear magnetic resonance investigation of the interaction of clupeines with mononucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1162, 209-16.
- Degols, G., Leonetti, J. P., Benkirane, M., Devaux, C. and Lebleu, B., 1992. Poly(L-lysine)-conjugated oligonucleotides promote sequence-specific inhibition of acute HIV-1 infection. *Antisense Res Dev* 2, 293-301.
- Degols, G., Leonetti, J.-P., Mechti, N. and Lebleu, B., 1991. Antiproliferative effects of antisense oligonucleotides directed to the RNA of c-myc oncogene. *Nucleic Acids Research* 19, 945-948.
- Delie, F., Berton, M., Allemann, E. and Gurny, R., 2001a. Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly(D,L-lactic acid) particles. *Int J Pharm* 214, 25-30.
- Delie, F., Gurny, R. and Zimmer, A., 2001b. Fluorescence correlation spectroscopy for the characterisation of drug delivery systems. *Biol Chem* 382, 487-90.
- Deshpande, D., Toledo-Velasquez, D., Thakkar, D., Liang, W. and Rojanasakul, Y., 1996. Enhanced cellular uptake of oligonucleotides by EGF receptor-mediated endocytosis in A549 cells. *Pharm Res* 13, 57-61.
- Dingermann, T., 1999. *Gentechnik Biotechnik*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Eckstein, F., 2000. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: What Is Their Origin and What Is Unique About Them? *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 10, 117-121.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- Ellington, A. D. and Szostak, J. W., 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-22.
- Fattal, E., Vauthier, C., Aynie, I., Nakada, Y., Lambert, G., Malvy, C. and Couvreur, P., 1998. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J Control Release* 53, 137-43.
- Fischer, D., Bieber, T., Brusselbach, S., Elsasser, H. and Kissel, T., 2001. Cationized human serum albumin as a non-viral vector system for gene delivery? Characterization of complex formation with plasmid DNA and transfection efficiency. *Int J Pharm* 225, 97-111.
- Franklin, R. E. and Gosling, R. G., 1953a. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* 172, 156-7.
- Franklin, S. E. and Gosling, R. G., 1953b. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171, 740-1.

- Fritz, H., Maier, M. and Bayer, E., 1997. Cationic Polystyrene Nanoparticles: Preparation and Characterization of a Model Drug Carrier System for Antisense Oligonucleotides. *J Colloid Interface Sci* 195, 272-88.
- Ghosh, C. and Iversen, P. L., 2000. Intracellular Delivery Strategies for Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10, 263-274.
- Gilar, M., Belenky, A., Budman, Y., Smisek, D. L. and Cohen, A. S., 1998. Impact of 3'-exonuclease stereoselectivity on the kinetics of phosphorothioate oligonucleotide metabolism. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8, 35-42.
- Godard, G., Bourtine, A. S., Saisonbehmoaras, E. and Helene, C., 1995. Antisense effects of cholesterol-oligodeoxynucleotide conjugates associated with poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Biochem* 232, 404-410.
- Goldmann, C., Petry, H., Frye, S., Ast, O., Ebitsch, S., Jentsch, K. D., Kaup, F. J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T. and Luke, W., 1999. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol* 73, 4465-9.
- Gonzalez Ferreiro, M., Crooke, R. M., Tillman, L., Hardee, G. and Bodmeier, R., 2003. Stability of polycationic complexes of an antisense oligonucleotide in rat small intestine homogenates. *Eur J Pharm Biopharm* 55, 19-26.
- Gonzalez Ferreiro, M., Tillman, L., Hardee, G. and Bodmeier, R., 2001. Characterization of complexes of an antisense oligonucleotide with protamine and polyL-lysine salts. *J Control Release* 73, 381-90.
- Guntaka, R. V., Varma, B. R. and Weber, K. T., 2003. Triplex-forming oligonucleotides as modulators of gene expression. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 22-31.
- Hartmann, G. and Krieg, A. M., 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164, 944-53.
- Henke, S., Rohmann, A., Bertling, W. M., Dingermann, T. and Zimmer, A., 2000. Enhanced in vitro oligonucleotide and plasmid DNA transport by VP1 virus-like particles. *Pharmaceutical Research* 17, 1062-1070.
- Hermann, T. and Patel, D. J., 2000. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287, 820-5.
- Hope, M. J., Mui, B., Ansell, S. and Ahkong, Q. F., 1998. Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs (review). *Mol Membr Biol* 15, 1-14.
- Horrow, J., 1984. Protamine: A Review of its Toxicity. *Anesth. Analg.* 64, 348-361.
- Hud, N. V., Allen, M. J., Downing, K. H., Lee, J. and Balhorn, R., 1993. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 1347-54.
- Hud, N. V., Milanovich, F. P. and Balhorn, R., 1994. Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry* 33, 7528-35.
- Inaki, Y., Ishikawa, T. and Takemoto, K., 1980. Synthesis and interactions of polyL-lysines containing nucleic acid bases. *Nucleic Acids Symp Ser* s137-40.
- Jahrsdorfer, B., Hartmann, G., Racila, E., Jackson, W., Muhlenhoff, L., Meinhardt, G., Endres, S., Link, B. K., Krieg, A. M. and Weiner, G. J., 2001. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 69, 81-8.
- Junghans, M., Kreuter, J. and Zimmer, A., 2000. Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles. *Nucleic Acids Research* 28, e45.

- Junghans, M., Kreuter, J. and Zimmer, A., 2001. Phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotide condensation and preparation of antisense nanoparticles. *Biochim Biophys Acta* 1544, 177-88.
- Kabanov, A. V. and Kabanov, V. A., 1995. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjugate Chemistry* 6, 7-20.
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G., 2003. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170, 4465-74.
- Knippers, R., Otto, B. and Bohme, R., 1978. Binding of phosphorylated histone H1 to DNA. *Nucleic Acids Res* 5, 2113-31.
- Kreuter, J., 1983. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. I: Preparation Methods. *Pharm Acta Helv* 58, 196-209.
- Kreuter, J., 1992. Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy.
- Krieg, A. M., Yi, A. K. and Hartmann, G., 1999. Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA. *Pharmacol Ther* 84, 113-20.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and Klinman, D. M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-9.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G., 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31, 3026-37.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R., 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147-57.
- Lambert, G., Fattal, E. and Couvreur, P., 2001. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 47, 99-112.
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H. and Schubert, D., 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm* 257, 169-80.
- Langer, K., Coester, C., Weber, C., von Briesen, H. and Kreuter, J., 2000. Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *Eur J Pharm Biopharm* 49, 303-7.
- Leavitt, A. D., Roberts, T. M. and Garcea, R. L., 1985. Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 260, 12803-9.
- Lebedeva, I., Benimetskaya, L., Stein, C. A. and Vilenchik, M., 2000. Cellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm* 50, 101-19.
- Lebedeva, I. and Stein, C. A., 2001. Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 403-19.
- Lemaitre, M., Bayard, B. and Lebleu, B., 1987. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 648-52.
- Li, S. and Huang, H., 1997. Protamine sulfate provides enhanced and reproducible intravenous gene transfer by cationic liposome/DNA complex. *Journal of liposome research* 7, 207-219.

- Li, S., Rizzo, M. A., Bhattacharya, S. and Huang, L., 1998. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Therapy* 5, 930-937.
- Liang, W. W., Shi, X., Deshpande, D., Malanga, C. J. and Rojanasakul, Y., 1996. Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1279, 227-34.
- Lochmann, D., Jauk, E. and Zimmer, A., 2004. Drug Delivery of Oligonucleotides by Peptides. *Eur J Pharm Biopharm* in press,
- Lochmann, D., Stadlhofer, S., Weyermann, J. and Zimmer, A., 2004a. New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagent. *Int J Pharm*
- Lochmann, D., Vogel, V., Weyermann, J., Dinauer, N., von Briesen, H., Kreuter, J., Schubert, D. and Zimmer, A., 2004b. Physicochemical characterisation of protamine-phosphorothioate nanoparticles. *J Microencaps* 2004
- Mahato, R. I., Takemura, S., Akamatsu, K., Nishikawa, M., Takakura, Y. and Hashida, M., 1997. Physicochemical and disposition characteristics of antisense oligonucleotides complexed with glycosylated poly(L-lysine). *Biochem Pharmacol* 53, 887-95.
- Miescher, F., 1871a. Die Kerngebilde im Dotter des Hühnereies. *Hoppe-Seyler's medicinisch-chemische Untersuchungen* 4
- Miescher, F., 1871b. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hoppe-Seyler's medicinisch-chemische Untersuchungen* 4
- Miescher, F., 1874a. Das Protamin, eine neue organische Basis aus den Samenfäden des Rheinlachs. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 376
- Miescher, F., 1874b. Die Spermatozoen einiger Wirbeltiere. *Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel* 138
- Moulton, H. M. and Moulton, J. D., 2003. Peptide-assisted delivery of steric-blocking antisense oligomers. *Curr Opin Mol Ther* 5, 123-32.
- Mumper, R. J., Duguid, J. G., Anwer, K., Barron, M. K., Nitta, H. and Rolland, A. P., 1996. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res* 13, 701-9.
- Noguchi, A., Hirashima, N. and Nakanishi, M., 2002. Cationic cholesterol promotes gene transfection using the nuclear localization signal in protamine. *Pharm Res* 19, 933-8.
- Nyhan, D. P., Champagne, E. L., Hirshman, C. A., Hamilton, R. G., Frank, S. M., Baumgartner, W. A. and Adkinson, N. F., Jr., 1996. Single doses of intravenous protamine result in the formation of protamine-specific IgE and IgG antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 97, 991-7.
- Osborne, S. E., Matsumura, I. and Ellington, A. D., 1997. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects. *Curr Opin Chem Biol* 1, 5-9.
- Ou, W. C., Wang, M., Fung, C. Y., Tsai, R. T., Chao, P. C., Hseu, T. H. and Chang, D., 1999. The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J Gen Virol* 80, 39-46.
- Palkova, Z., Adamec, T., Liebl, D., Stokrova, J. and Forstova, J., 2000. Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Lett* 478, 281-9.
- Pichon, C., Goncalves, C. and Midoux, P., 2001. Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 53, 75-94.

- Prieto, M. C., Maki, A. H. and Balhorn, R., 1997. Analysis of DNA-protamine interactions by optical detection of magnetic resonance. *Biochemistry* 36, 11944-51.
- Rodman, Pruslin and Allfrey, 1984. Protamine-DNA Association in Mammalian Spermatozoa. *Experimental Cell Research* 150, 269-281.
- Rodriguez-Hernandez, J., Gatti, M. and Klok, H. A., 2003. Highly branched poly(L-lysine). *Biomacromolecules* 4, 249-58.
- Rothenfusser, S., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Endres, S. and Hartmann, G., 2001. CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA. *Deutsches Ärzteblatt* 15, 981-985.
- Sabelnikov, A. G., Ditjatkin, S. J. and Iljashenko, B. N., 1973. About the role of protamine in transfection. *Biochimica et Biophysica Acta* 299, 492-5.
- Salunke, D. M., Caspar, D. L. and Garcea, R. L., 1989. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J* 56, 887-900.
- Samani, T. D., Jolles, B. and Laigle, A., 2001. Best minimally modified antisense oligonucleotides according to cell nuclease activity. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11, 129-36.
- Sasnauskas, K., Buzaitė, O., Vogel, F., Jandrig, B., Razanskas, R., Staniulis, J., Scherneck, S., Kruger, D. H. and Ulrich, R., 1999. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol Chem* 380, 381-6.
- Sazani, P., Astriab-Fischer, A. and Kole, R., 2003. Effects of Base Modification on Antisense Properties of 2'-O-Methoxyethyl and PNA Oligonucleotides. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 13, 119-128.
- Schiffelers, R. M., Woodle, M. C. and Scaria, P., 2004. Pharmaceutical prospects for RNA interference. *Pharm Res* 21, 1-7.
- Schlingensiepen, R., Brysch, W. and Schlingensiepen, K. H., 1997. *Antisense - From Technologie to Therapy*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin - Wien.
- Sorgi, F. L., Bhattacharya, S. and Huang, L., 1997. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Therapy* 4, 961-8.
- Stanley, M. A., 2001. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* 52, 45-59.
- Stanley, M. A., 2002. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res* 89, 241-8.
- Stanley, M. A., 2003. Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection. *Expert Rev Vaccines* 2, 381-9.
- Stein, C. A., 1996. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity. *Trends Biotechnol* 14, 147-9.
- Stein, D., Foster, E., Huang, S.-B., Weller, D. and Summerton, J., 1997. A Specificity Comparison of Four Antisense Types: Morpholino, 2'-O-Methyl RNA, DNA, and Phosphorothioate DNA. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 7, 151-157.
- Stein, D. A., Skilling, D. E., Iversen, P. L. and Smith, A. W., 2001. Inhibition of Herpesvirus Infection in Mammalian Tissue Culture with Antisense Morpholino Oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11, 317-325.
- Steinhardt, J., Krijn, J. and Leidy, J. G., 1971. Differences between bovine and human serum albumins: binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochemistry* 10, 4005-15.

- Stephenson, M. L. and Zamecnik, P. C., 1978. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 285-8.
- Stewart, A. J., Pichon, C., Meunier, L., Midoux, P., Monsigny, M. and Roche, A. C., 1996. Enhanced biological activity of antisense oligonucleotides complexed with glycosylated polyL-lysine. *Mol Pharmacol* 50, 1487-94.
- Storni, T., Lechner, F., Erdmann, I., Bachi, T., Jegerlehner, A., Dumrese, T., Kundig, T. M., Ruedl, C. and Bachmann, M. F., 2002. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J Immunol* 168, 2880-6.
- Stryer, L., 1996. *Biochemie*. Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg.
- Summerton, J., 1999. Morpholino antisense oligomers: The case for an RNase H-independent structural type. *Biochem Biophys Acta* 1489, 141-158.
- Summerton, J. and Weller, D., 1997. Morpholino antisense oligomers: Design, Preparation and Properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 187-195.
- Taylor, S. and Folkman, J., 1982. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297, 307-12.
- Temsamani, J., Kubert, M., Tang, J., Padmapriya, A. and Agrawal, S., 1994. Cellular uptake of oligodeoxynucleotide phosphorothioates and their analogs. *Antisense Research & Development* 4, 35-42.
- Temsamani, J., Roskey, A., Chaix, C. and Agrawal, S., 1997. In vivo metabolic profile of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 159-65.
- Touze, A., Bousarghin, L., Ster, C., Combita, A. L., Roingeard, P. and Coursaget, P., 2001. Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J Gen Virol* 82, 3005-9.
- Tuerk, C. and Gold, L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-10.
- Uhlmann, E., Rytte, A. and Peyman, A., 1997. Studies on the mechanism of stabilization of partially phosphorothioated oligonucleotides against nucleolytic degradation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 345-50.
- Vuyisich, M. and Beal, P. A., 2002. Controlling protein activity with ligand-regulated RNA aptamers. *Chem Biol* 9, 907-13.
- Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H. and Birnstiel, M. L., 1990. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3410-4.
- Wartlick, H., Spänkuch-Schmitt, B., Strebhardt, K., Kreuter, J. and Langer, K., 2004. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J Control Release* in press,
- Watson, J. D. and Crick, F. H., 1953a. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-7.
- Watson, J. D. and Crick, F. H., 1953b. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-8.
- Weber, C. J., 1929. A Modification of Sakaguchi Reaction for the Quantitative Determination of Arginine. *J Biol Chem* 86, 217-222.
- Wehling, K., Krauss, S. and Wagner, K. G., 1976. Cooperative binding of fluorescein-labeled clupeine by DNA. *Nucleic Acids Res* 3, 149-64.
- Wei, Z., Tung, C. H., Zhu, T. and Stein, S., 1994. Synthesis of oligoarginine-oligonucleotide conjugates and oligoarginine-bridged oligonucleotide pairs. *Bioconjug Chem* 5, 468-74.

- Weyermann, J., Lochmann, D., Georgens, C., Reis, I., Kreuter, J., Karas, M., Wolkenhauer, M. and Zimmer, A., 2004. Characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Eur J Pharm Biopharm* in press,
- Weyermann, J., Lochmann, D. and Zimmer, A., 2004. Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-Systems. *J Controlled Release*
- Wilkins, M. H., Stokes, A. R. and Wilson, H. R., 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171, 738-40.
- Willmitzer, L. and Wagner, K. G., 1980. The binding of protamines to DNA; role of protamine phosphorylation. *Biophys Struct Mech* 6, 95-110.
- Wu, G. Y. and Wu, C. H., 1992. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 267, 12436-9.
- Yamakawa, I., Ishida, M., Kato, T., Ando, H. and Asakawa, N., 1997. Release behavior of poly(lactic acid-co-glycolic acid) implants containing phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Biol Pharm Bull* 20, 455-9.
- Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A. and Welsh, M. J., 1995. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 270, 18997-9007.
- Zamecnik, P. C. and Stephenson, M. L., 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 280-4.
- Zelphati, O., Degols, G., Loughrey, H., Leserman, L., Pompon, A., Puech, F., Maggio, A. F., Imbach, J. L. and Gosselin, G., 1993. Inhibition of HIV-1 replication in cultured cells with phosphorylated dideoxyuridine derivatives encapsulated in immunoliposomes. *Antiviral Res* 21, 181-95.
- Zelphati, O. and Szoka, F. C., Jr., 1996a. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res* 13, 1367-72.
- Zelphati, O. and Szoka, F. C., Jr., 1996b. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11493-8.
- Zelphati, O., Uyechi, L. S., Barron, L. G. and Szoka, F. C., Jr., 1998. Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta* 1390, 119-33.
- Zhang, W. W. and Roth, J. A., 1994. Anti-oncogene and tumor suppressor gene therapy--examples from a lung cancer animal model. *In Vivo* 8, 755-69.
- Zhou, X. and Huang, L., 1994. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1189, 195-203.
- Zobel, H. P., Junghans, M., Maienschein, V., Werner, D., Gilbert, M., Zimmermann, H., Noe, C., Kreuter, J. and Zimmer, A., 2000. Enhanced antisense efficacy of oligonucleotides adsorbed to monomethylaminoethylmethacrylate methylmethacrylate copolymer nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 49, 203-10.
- Zobel, H. P., Kreuter, J., Werner, D., Noe, C. R., Kumel, G. and Zimmer, A., 1997. Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 483-93.

- Zobel, H. P., Stieneker, F., Atmaca-Abdel Aziz, S., Gilbert, M., Werner, D., Noe, C. R., Kreuter, J. and Zimmer, A., 1999a. Evaluation of aminoalkylmethacrylate nanoparticles as colloidal drug carrier systems. Part II: characterization of antisense oligonucleotides loaded copolymer nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 48, 1-12.
- Zobel, H. P., Zimmer, A., Atmaca-Abdel Aziz, S., Gilbert, M., Werner, D., Noe, C. R., Kreuter, J. and Stieneker, F., 1999b. Evaluation of aminoalkylmethacrylate nanoparticles as colloidal drug carrier systems. Part I: Synthesis of monomers, dependence of the physical properties on the polymerization methods. *Eur J Pharm Biopharm* 47, 203-13.

10 Anhang (I-XI)

- (I) Dirk Lochmann*, Edith Jauk*, Andreas Zimmer; **Drug Delivery of Oligonucleotides by Peptides**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (2), (2004) page 237-251
*Beide Autoren haben gleichgroßen Anteil an dieser Arbeit
- (II) Dirk Lochmann, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Norbert Dinauer, Hagen von Briesen, Jörg Kreuter, Dieter Schubert, Andreas Zimmer; **Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles**; *Journal of Microencapsulation*, in press (2005)
- (III) Anke Rohmann, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Wolf M. Bertling, Theodor Dingermann, Andreas Zimmer; **Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2}**; *Oligonucleotides*, 1 (2004) page 1-9
- (IV) Dirk Lochmann, Sylvia Stadlhofer, Jörg Weyermann, Andreas Zimmer; **New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent**; *International Journal of Pharmaceutics*, 283 (1-2), (2004) page 11-17
- (V) Norbert Dinauer, Dirk Lochmann, Ilhan Demirhan, Andreas Zimmer, Angelika Chandra, Jörg Kreuter, Hagen von Briesen; **Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation**; *Journal of Controlled Release*, 96 (3), (2004) page 497-507
- (VI) Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Christiane Georgens, Ruth Prassl, Andreas Zimmer; **Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, in press (2005)
- (VII) Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer; **Comparision of *in vitro* cytotoxicity assays**; *International Journal of Pharmaceutics*; in press (2005)

- (VIII) Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Christiane Georgens, Andreas Zimmer; **Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, in press (2005)
- (IX) Jörg Weyermann*, Dirk Lochmann*, Christiane Georgens, Isam Rais, Jörg Kreuter, Michael Karas, Markus Wolkenhauer, Andreas Zimmer; **Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy**; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (1), (2004) page 25-35
* Beide Autoren haben gleichgroßen Anteil an dieser Arbeit
- (X) Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer; **Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems**, *Journal of Controlled Release*; 100 (3), (2004) page 411-423
- (XI) Vitali Vogel, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Christos Tziatzios, Winfried Haase, Daan Wouters, Ulrich S. Schubert, Andreas Zimmer, Jörg Kreuter, Dieter Schubert; **Oligonukleotide-protamine-albumin nanoparticles: preparation, physical properties and intracellular distribution**, *Journal of Controlled Release*; in press (2005)

[Die hier aufgeführten Publikationen können aus urheberrechtlichen Gründen nicht angefügt werden.]