



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Interaktions- und Aggregationsverhalten von Nanopartikeln in Blutserum

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von Kristin Rausch

Mainz, Februar 2013

Meiner Familie

Zusammenfassung

Das Interesse an nanopartikulären Wirkstoffsystemen steigt sowohl auf universitärer als auch auf industrieller Seite stetig an. Da diese Formulierungen meist intravenös verabreicht werden, kommt es folglich zu einem direkten Kontakt der Nanopartikel mit den Blutbestandteilen. Adsorption von Plasma Proteinen kann eine deutliche Veränderung der charakteristischen Eigenschaften des Systems induzieren, was dann Wirkungsweise sowie Toxizität stark beeinflussen kann. Derzeit findet die Charakterisierung nanopartikulärer Wirkstoffsysteme vor der *in vivo* Applikation in Pufferlösungen mit physiologischem Salzgehalt statt, es ist jedoch kaum etwas bekannt über deren Wechselwirkungen mit komplexen Proteinmischungen wie sie im Blutserum oder –plasma vorliegen.

Mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) wurde eine einfache und reproduzierbare Methode entwickelt um die Aggregatbildung zwischen Nanopartikeln, Polymeren oder verschiedenen Wirkstoff-Konjugaten in humanem Blutserum zu untersuchen. Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde durch Untersuchung verschiedener potentieller Nanotherapeutika (z.B. Polystyrol-Nanokapseln, Liposomen, amphiphile Blockcopolymere und Nanohydrogele) bezüglich ihrer Aggregation in humanem Blutserum mittels DLS gezeigt und teilweise mit aktuellen *in vivo* Experimenten verglichen.

Darüber hinaus wurden gröÙeneinheitliche Liposomen, basierend auf Distearoylphosphatidylcholin, Cholesterol und einem Spermin-Tensid, hergestellt. Die Einkapselung von siRNA ist, je nach Präparationsmethode, mit Einkapselungseffizienzen von 40-75% möglich. Nach detaillierter Charakterisierung der Liposomen wurden diese ebenfalls bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Blutserum untersucht. Unbeladene Liposomen aggregieren nicht mit Komponenten des Serums. Je nach Beladungsprotokoll können aggregierende sowie nicht aggregierende Liposomen-siRNA Komplexe hergestellt werden.

Weiterhin wurden, zur Identifikation der Aggregation induzierenden Serumkomponenten, verschiedenen Serumsfraktionierungstechniken erfolgreich angewendet. Albumin, IgG, und Lipoproteine (VLDL, LDL) sowie verschiedene Proteinmischungen konnten isoliert und für weitere Aggregationsstudien mittels DLS verwendet werden. Für einige ausgesuchte Systeme konnten die Interaktionspartner identifiziert werden.

Die Korrelation des Aggregationsverhaltens mit den strukturellen sowie funktionellen Eigenschaften der untersuchten Nanopartikel führt zu dem generellen Ergebnis, dass leicht negativ und leicht positiv bis neutrale Partikel eine geringe Tendenz zur Aggregation in Serum haben. Auch zwitterionische Substanzen zeigen eine hohe Serumstabilität. Hingegen aggregieren stark positiv und negativ geladene Partikel vermehrt.

Summary

Polymeric drug delivery systems are at the forefront of gene therapy and cancer research. Predominantly administered intravenously, adsorption of plasma proteins onto the polymeric surface can lead to physical changes in the formulations that include aggregation and charge neutralization. At present, the characterization of polymeric drug delivery systems is mostly done in physiological salt solutions prior to animal tests, but there is little known on the interaction with complex protein mixtures occurring at high concentrations in blood serum and plasma.

On the basis of DLS, an easy and reproducible procedure was developed to sensitively detect and quantify aggregate formation between nanoparticles, polymers, or various drug conjugates and blood serum. To explore the power of DLS as a method to evaluate the suitability of nanoparticles for "in vivo" experiments several groups of potential therapeutic polymers (e.g. polystyrene nanoparticles, liposomes, amphiphilic blockcopolymers and nanohydrogels) were investigated with DLS and the results were exemplarily compared with actual "in vivo" experiments.

In addition liposomes with narrow size distribution based on distereoylphosphatidylcholine, cholesterol and a spermine-surfactant were prepared. In these liposomes siRNA can be encapsulated with an encapsulation efficiency of 40-75 % depending on the preparation method. After detailed characterization liposomes were studied according to their aggregation behavior in human serum. Unloaded liposomes are stable against aggregation in human serum. After siRNA complexation the aggregation behavior depends on the preparation method.

For identification of aggregation inducing serum components, different serum fractionation techniques were successfully applied. Albumin, IgG and lipoprotein solutions, as well as low abundant serum protein mixtures were isolated and utilized for further aggregation studies via DLS. The correlation of the aggregation behavior with the structural and functional properties of the investigated systems leads to the general result, that slightly charged to neutral systems, as well as hydrophilic surfaces are showing the least aggregation behavior, while highly charged, positive and negative, tend to induce strong serum aggregation.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Problemstellung und Motivation.....	3
3. Theoretische Grundlagen.....	7
3.1. Blut.....	7
3.1.1. Blutplasma und Blutserum.....	8
3.1.2. Das Plasma Proteom.....	8
3.2. Nanopartikel als Drug Delivery Systeme.....	14
3.2.1. Hauptklassen nanopartikulärer Drug Delivery Systeme.....	15
3.2.2. Physiologische Verteilung und Eliminierung von Nanopartikeln im Körper.....	16
3.2.3. Biophysikalisch-chemische Wechselwirkungen biologischer Substrate mit nanopartikulären Grenzflächen.....	20
3.2.4. Analytik von Nanopartikeln in Wechselwirkung mit biologischen Medien.....	22
3.3. Liposomen zum Transport von siRNA zur Leber.....	25
3.3.1. Liposomen als Drug Delivery Systeme.....	25
3.3.2. siRNA Funktion und Delivery.....	27
3.3.3. Leberzirrhose: Krankheitsbild sowie Behandlung mit liposomalen siRNA Therapeutika....	28
4. Methoden.....	31
4.1. Lichtstreuung.....	31
4.1.1. Statische Lichtstreuung und Partikelformfaktor.....	32
4.1.2. Dynamische Lichtstreuung.....	35
4.1.3. Das ρ -Verhältnis.....	37
4.1.4. Die Auswertesoftware <i>HDRC</i>	38
4.1.5. Lichtstreuung an Multikomponentensystemen.....	38
4.2. SDS-Gelelektrophorese.....	40
4.3. Chromatographie.....	41
4.3.1. Gelpermeationschromatographie (GPC).....	41
4.3.2. Affinitätschromatographie.....	43
4.3.3. Ionenaustauschchromatographie.....	45
4.4. UV-VIS-Spektroskopie.....	45
4.5. Fluoreszenzspektroskopie.....	45
4.6. Cryogene Transmissionselektronenmikroskopie (CryoTEM).....	47
5. Ergebnisse und Diskussion.....	49
5.1. Fraktionierung und Charakterisierung von humanem Serum.....	49
5.1.1. Fraktionierung von humanem Serum mittels chromatographischer Methoden.....	54

5.1.2. Lipoproteinfraktionierung.....	61
5.1.3. Zusammenfassung.....	61
5.2. Serumstabile Tensidstrukturen zum effizienten und spezifischen siRNA Transport in die Leber	63
5.2.1. Vesikelpräparation	64
5.2.2. Beladung von Liposomen mit siRNA.....	72
5.2.3. Bestimmung des Gehaltes an siRNA der Liposomenlösungen.....	76
5.2.4. Toxizität der Liposomen in T3T-Fibroblasten.....	78
5.2.5. Zusammenfassung.....	81
5.3. Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Makromolekülen und Nanopartikeln in humanem Serum	84
5.3.1. Untersuchung des Aggregationsverhaltens oberflächenmodifizierter Polystyrolpartikel in humanem Serum.....	85
5.3.2. Aggregationsverhalten von liposomalen Systemen in humanem Serum.....	97
5.3.3. Aggregationsverhalten von kationisch geladenen Nanohydrogelpartikeln in humanem Serum vor und nach Beladung mit siRNA.....	105
5.3.4. Wechselwirkungen von p(HPMA)-co-p(LMA) mit humanem Serum	118
5.3.5. Korrelation des Aggregationsverhaltens in humanem Serum mit den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Systeme.....	130
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	133
7. Experimenteller Teil	138
7.1. Serumfraktionierung	138
7.1.1. Serumfraktionierung über Gelpermeationschromatographie.....	138
7.1.2. Präparative Isolierung von IgG über Protein-A Affinitätschromatographie	138
7.1.3. Präparative Isolierung von Albumin über AffiBlue Affinitäts-chromatographie ⁷	139
7.1.4. DEAE Anionenaustauschchromatographie ⁷	140
7.2. Lipoproteinfraktionierung	141
7.3. Gesamtproteinbestimmung in Serum und Plasma nach Bradford	142
7.4. SDS-Gelelektrophorese von humanem Serum und Serumfraktionen	143
7.5. Präparation der Serum- und Serumproteinproben für die DLS	144
7.6. DLS an Nanopartikeln in Serum und in Lösungen verschiedener Serumkomponenten	145
7.7. Liposomen Präparation	145
7.8. Beladung von Liposomen mit siRNA	146
7.9. Bestimmung der siRNA-Einkapselungeffizienz mittels Ribogreen Assay	147
8. Verwendete Geräte und Materialien.....	149
8.1. Material	149

8.2. Lichtstreuung	149
8.3. UV/VIS Messungen.....	150
8.4. GPC-Messungen	150
8.5. SDS-Gelelektrophorese.....	150
Anhang	152
A. Einfluss verschiedener experimenteller Parameter auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von humanem Serum	152
1. Einfluss der Temperatur	152
2. Verdünnung von humanem Serum	154
3. Filtration von humanem Serum	155
B. Charakterisierung von Nanopartikeln in humanem Serum.....	157
1. Polystyrol- und Poly-Laktid –nanopartikel mit p(HPMA)-co-p(LMA) als Tensid	157
2. Dextran	157
3. Ferromagnetische Nanopartikel in humanem Serum	158
4. Kationische zylindrische Polymerbürsten zur DNA Transfektion.....	159
5. Polybetaine als zwitterionische Polyampholyte in humanem Serum	160
6. HPMA-co-LMA in humanem Serum	161
D. Abkürzungsverzeichnis.....	163
Literaturverzeichnis	166

1. Einleitung

Der Bereich der Nanomedizin zeigt immense Fortschritte in der Entwicklung hocheffektiver nanopartikulärer Wirkstoffsysteme. Über 100 Nano-Transporter erreichten bereits im Jahre 2006 klinische Studien und das Interesse an diesem stark zukunftssträchtigen Forschungsgebiet steigt sowohl auf universitärer, als auch auf industrieller Seite stetig an [5].

Der Transport niedermolekularer Wirkstoffe über nanopartikuläre Formulierungen führt zu einer deutlichen Verbesserung der Pharmakokinetik, Biodistribution und der Stabilität in *in vivo* und *in vitro* Experimenten [6-8]. Damit ein neues Therapeutikum von der „US Food and Drug Administration“ (FDA) für klinische Studien zugelassen wird, sind umfassende Toxizitätsstudien sowie eine detaillierte physikochemische Charakterisierung des jeweiligen Systems unabdingbar [9]. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass Eigenschaften wie Oberflächenladung, Größe, Polydispersität und Funktionalität von Nanopartikeln einen äußerst starken Einfluss auf *in vivo* und *in vitro* Verhalten haben [10-12]. Diese Eigenschaften sind in hohem Maße von der Umgebung, so auch dem Lösemittel in welchem die Charakterisierungen durchgeführt wurden, abhängig. Wesentliche Charakterisierungen sollten deshalb direkt in den physiologisch relevanten Medien durchgeführt werden [5]. Es ist bekannt, dass die Bindung von Proteinen zu Veränderungen von Oberfläche und Größe eines Nano-Therapeutikums führen kann [13].

Nanopartikel, allgemein makromolekulare Substanzen, werden bei medizinischen Applikationen über den parenteralen Weg verabreicht, Polymer-Protein-Konjugate werden zumeist subkutan oder intramuskulär injiziert und Polymer-Wirkstoffkonjugate werden intravenös verabreicht [14]. Die stark verbreitete intravenöse Injektion führt zu einem direkten Eintritt der Derivate in den Blutkreislauf. Alternative Verabreichungsformen führen über verschiedene Adsorptions- und Permeationsprozesse zu einem verzögerten Eintritt in den Blutkreislauf. Auch bei lokaler Applikation können Degradierungsprodukte des Wirkstoffsystems zu späteren Zeitpunkten in den Blutkreislauf eintreten. Eine Charakterisierung der Formulierungen sowie deren Degradationsprodukte in Gegenwart des Multikomponentensystems Blut ist somit wesentlich zum Verständnis des Wirkmechanismus. Adsorbierte Plasmaproteine können die Targeting Eigenschaften sowie die Toxizität des

Systems immens beeinflussen [15-17]. Auch Prozesse wie die Oponisierung können zu einer deutlichen Absenkung der Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe führen [12, 18].

Auf Grund der beschriebenen Effekte ist es äußerst wichtig, die durch den Kontakt mit biologischen Medien hervorgerufenen Veränderungen von Struktur und physikochemischem Verhalten der Nanopartikel detailliert zu untersuchen. Bis jetzt werden Eigenschaften wie Größe und Struktur der Nanopartikel in wässriger Pufferlösung bei physiologischer Salzkonzentration untersucht. Verbreitet sind mittlerweile auch Proteinkorona Studien nach Inkubation mit humanem Plasma [19-20]. Ferner existieren einige Routinemethoden zur Analyse von Interaktionen zwischen Nanopartikeln und einzelnen Proteinen. Die in früherer Arbeit [Diplomarbeit, Rausch Kristin, 2010] entwickelte Methode zur Messung des Aggregationsverhaltens von Nanopartikeln in humanem Serum mittels DLS [21] ist eine der wenigen bekannten Möglichkeiten zur „in situ“ Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und hochkonzentrierten Proteinmischungen [17, 22].

2. Problemstellung und Motivation

Die Untersuchung von Nanopartikeln in biologisch relevanten Medien wie z.B. Blut, Lymphe und Cytosol ist wesentlich um medizinisch relevante nanopartikelbasierte Biokonjugate hinsichtlich ihres Transport- und Wirkungsmechanismus zu verstehen und zu beurteilen.

Die vielfältigen Wechselwirkungsmöglichkeiten nanopartikulärer Systeme mit biologischen Komponenten können im Extremfall zur Aggregation und Präzipitation führen. Aber auch die zum Teil erwünschte Belegung der Oberfläche mit Mono- oder Multilagenn biologischer Bestandteile, sowie eine völlige Inertheit sind ebenso vorstellbar, wie die Fällung des Nanopartikels selbst, die durch die hohe Ionenstärke biologischer Medien möglich sein kann.

Ein wesentliches Indiz für Vorgänge, wie die Adsorption von Biomolekülen an der Oberfläche ist fast immer eine Größenzunahme der Nanopartikel, bzw. von Nanopartikel und Medium. Erste Untersuchungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit [Diplomarbeit, Rausch Kristin, 2010] durchgeführt wurden, konnten demonstrieren, dass die Größencharakterisierung in humanem Blutserum mittels dynamischer Lichtstreuung möglich ist und damit auch ein etwaiges Aggregationsverhalten der Nanopartikel mit Serumkomponenten detektierbar wird [Diplomarbeit, Rausch Kristin, 2010].

Diese Methode hat sich als schnell, effizient und vergleichsweise einfach in der Durchführung erwiesen.

Aufbauend darauf, soll die Methodik dahin weiterentwickelt werden, dass diese als universelles Testwerkzeug für das Verhalten von Nanopartikeln im Serum herangezogen werden kann, und so ein schnelles Screening von Partikeln hinsichtlich ihres Verhaltens in biologisch relevanten Medien ermöglichen.

Dazu sollen ausgewählte Hauptklassen nanopartikulärer Wirkstofftransporter unter physiologischen Bedingungen, wie auch in Gegenwart von Serum untersucht werden.

Im Blickpunkt steht dann dabei auch die Frage nach den aggregationsinduzierenden Bestandteilen des Serums.

Um hier genaueren Einblick zu erhalten, sollen neben reinen Serumbestandteilen auch nach Ladung oder Größe differenzierte Serum- oder Plasmafraktionen untersucht werden.

Plasmafraktionierungstechniken sind anzuwenden um Hauptkomponenten des Serums präparativ zu isolieren. Durch deren Charakterisierung hinsichtlich physikochemischer Eigenschaften und Prüfung hinsichtlich Wechselwirkung mit den verschiedenen Nanopartikeln wird ein Einblick in ihre vielfältigen Wechselwirkungsmöglichkeiten gegeben.

Die Identifikation der aggregationsinduzierenden Serumbestandteile wechselwirkender Systeme kann dazu beitragen *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse mit diesen Wechselwirkungseffekten zu korrelieren und eventuell auch Struktur-Funktionsbeziehungen zu etablieren. Hierbei sind auch Effekte hinsichtlich der Unterschiede der Biodistribution aggregierender und nicht aggregierender Systeme zu diskutieren. Ist eine Identifikation aggregierender Serumkomponenten möglich, wird die Relation von *in vitro* und *in vivo* Verhalten der Nanopartikel sehr wahrscheinlich auch verständlicher werden.

Um nicht ausschließlich nur auf die Bereitstellung von Nanomaterialien externer Kooperationspartner angewiesen zu sein, wird ein kationisches, liposomales System zur siRNA-Transfektion entwickelt. Hiermit wird der Partikelpool um das wesentliche Element der Liposomen erweitert, die bereits auch kommerziell (Lipofectamine u.a.) verfügbar sind und eine sehr wichtige Klasse nanopartikularer Wirkstoffsysteme darstellen.

Die zu untersuchenden Liposomen basieren auf multikationischen Tensiden im Gemisch mit den Colipiden DSPC und Cholesterin.

Dieses wird die Möglichkeit eröffnen, systematisch die Effekte von Zusammensetzung und Präparationseffekten detailliert zu untersuchen. Insbesondere Effekte von Struktur, Größe, und Polydispersität nach siRNA-Komplexierung sind darzustellen und dann weiter bezüglich des Verhaltens der Liposomen im Blutserum zu beurteilen.

Neben Methoden der Lichtstreuung sollen auch bildgebende Verfahren, etwa CryoTEM eingesetzt werden, um die innere Struktur bezüglich des Membranaufbaus zu detektieren, um insbesondere uni- und multilamellare Liposomenstrukturen in Abhängigkeit der Präparationstechnik unterscheiden zu können.

Die Untersuchung dieses ganzen „Zoos“ von Nanopartikeln wird es dann im Idealfall erlauben, Größen-, Ladungs- und Oberflächeneffekte bezüglich ihrer Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen und mit den Serumkomponenten zu beurteilen und

Effekte bezüglich des *in vitro* und *in vivo* Verhaltens weiterer Systeme mittels des erarbeiteten methodischen Spektrums prognostizieren zu können.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Blut

Blut ist ein „flüssiges Körpergewebe“, welches etwa 8% des Körpergewichtes eines Menschen ausmacht. Es besteht aus einem Zellverband in wässriger Lösung (Plasma). Blut dient vor allem als Transportmittel innerhalb des Organismus.

Durch die Zirkulation in den Blutgefäßen werden die Gase Sauerstoff und Kohlendioxid transportiert. Ebenso erfolgt die Verteilung von Substanzen wie Enzymen, Hormonen, ionisierten Salzen und Vitaminen. Des Weiteren ist Blut an der Aufrechterhaltung eines konstanten inneren Milieus (Homöostase) und an der Abwehr von Fremdstoffen beteiligt.

Eine weitere wichtige Funktion ist die Regulierung des Säure-Base Haushaltes und der Körpertemperatur. Zum Schutz vor zu starkem Blutverlust bei Gefäßverletzungen besitzt das Blut Mechanismen zur Blutstillung und Blutgerinnung, wobei letztere als Hämostase bezeichnet wird. Auch die Wiederauflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) wird vom Blut selbst reguliert.

Der Zellverband des Blutes setzt sich im Wesentlichen aus drei Zelltypen zusammen:

- Erythrozyten (rote Blutkörperchen)
- Leukozyten (weiße Blutkörperchen)
- Thrombozyten (Blutplättchen)

In den Erythrozyten ist der rote Blutfarbstoff, das Hämoglobin, enthalten. Hämoglobin kann Sauerstoff komplexieren und ist somit am Gastransport im Körper beteiligt. Die wesentlichen Aufgaben der Leukozyten bestehen in der Antikörper Produktion und in der Erkennung sowie Speicherung von antigenen Informationen. Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Hämostase [23-24].

3.1.1. Blutplasma und Blutserum

Der flüssige Bestandteil des Blutes, das Blutplasma, besteht zu 90% aus Wasser. Es enthält eine Vielzahl verschiedener Proteine in einer durchschnittlichen Gesamtkonzentration von 60-80 g/L [24]. Der proteinogene Hauptbestandteil ist mit ca. 55% das Serumalbumin. Nach Gerinnung des Blutplasmas und Separation des flüssigen Anteils vom festen Anteil, bestehend aus den Zellresten und dem als Gerinnungsprodukt entstandenen Fibrinnetz, erhält man Blutserum.

Während der Gerinnung wird das Protein Prothrombin zu Thrombin gespalten und Fibrinogen wird entfernt da es in das entstehende Blutgerinnsel eingebaut wird. Die Proteinzusammensetzung des Plasmas gleicht der des Serums mit Ausnahme der nur im Plasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren [25].

Da im Plasma noch alle Gerinnungsfaktoren enthalten sind ist dieses nur unter Bedingungen welche die Gerinnung hemmen stabil. Üblicherweise erfolgt diese Stabilisierung durch die Zugabe von Citrat oder EDTA [26].

Auf Grund dieser Instabilität des Plasmas werden in dieser Arbeit alle Experimente in humanem Serum durchgeführt.

3.1.2. Das Plasma Proteom

Das Blutplasmaproteom des Menschen ist ein hoch komplexes interagierendes Multikomponentensystem. Zur Isolierung therapeutisch wirksamer Proteine werden deshalb Millionen Liter Plasma gesammelt und bis zur Einzeldarstellung fortschreitend fraktioniert.

Unter dem Begriff Plasmaproteom werden alle im Plasma präsenten Proteine zusammengefasst [25]. Die Charakterisierung des Plasmaproteoms ist erschwert durch den hohen Anteil an humanem Albumin (55%), welches geringer konzentrierte Proteinkomponenten überlagert. Auch die Vielfältigkeit der Proteinbestandteile sowie die hohe Varianz der vorhandenen Glykoproteine erschweren die Analytik dieses Systems.

Es können verschiedene Proteinklassen innerhalb des Plasmaproteoms unterschieden werden:

1. klassische Plasmaproteine
2. Immunoglobuline
3. Hormone
4. Cytokine
5. „Tissue-Leackage“ Proteine

Klassische Plasmaproteine werden aus dem Gewebe (v.a. Leber) freigesetzt um ihre Funktion dann innerhalb des Plasmas auszuführen. Ein mögliches Unterscheidungsmerkmal der klassischen Plasmaproteine ist, neben ihrem isoelektrischen Punkt, das Molekulargewicht, das typischerweise oberhalb der Ausschlussgrenze der Nierenfiltration liegt. Hierdurch wird eine längere Zirkulationszeit der Proteine im Blutkreislauf gewährleistet. Somit stellt der Körper sicher, dass die Plasmaproteine genug Zeit haben ihre jeweiligen Funktionen vollständig auszuführen.

Weitere Klassen sind die Immunoglobuline (Antikörper) als eine Komponente des Immunabwehrsystems (vgl. 3.1.2.2.), Hormone als Regulatoren und Cytokine.

Im Gegensatz zu den klassischen Plasmaproteinen besitzen die Cytokine kleinere Molekulargewichte, welche unterhalb der oberen Ausschlussgrenze der Filtration durch die Niere liegen. Sie weisen somit nur eine kurze Plasmahalbwertszeit auf und dienen der kurzweiligen Zell-Zell Vermittlung. Eine hohe Plasmakonzentration dieser Proteinklasse weist häufig auf ein bestehendes Krankheitsbild hin.

Eine weitere wichtige Proteingruppe sind die „Tissue-Leackage“ Proteine. Hierbei handelt es sich um Proteine, die normalerweise innerhalb von Zellen fungieren und von Zellen mit zerstörter Membran in den Blutkreislauf abgegeben werden. Diese Proteingruppe enthält viele diagnostische Marker, beispielsweise zur Identifikation eines Herzinfarktes.

Im Folgenden werden einige Komponenten des Plasmas genauer erläutert.

3.1.2.1. Albumin

Albumin stellt mit einer Gesamtkonzentration von 30-45 g/L das höchstkonzentrierte Protein im menschlichen Blutkreislauf dar. Es ist ein monomeres, unglykosyliertes Protein und gehört mit einem Molekulargewicht von 69 kDa zu den kleineren Plasmaproteinen.

Durch seine spezifische Struktur wechselwirkt das Albumin nicht mit den Fc Rezeptoren (vgl. 3.1.2.2.) des Endothels, wodurch es, trotz seines geringen Molekulargewichtes, vor glomerulärer Filtration geschützt ist. Dies resultiert in einer langen Plasmahalbwertszeit von 19-22 Tagen [27].

Albumin wird in der Leber synthetisiert. Zunächst wird das Preproalbumin gebildet, welches dann unter Abspaltung eines N-terminalen Peptides als Proalbumin vom rauen endoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird und schließlich im Golgiapparat zu Serumalbumin umgewandelt wird.

Albuminmoleküle besitzen eine sehr große Gesamtoberfläche, welche die temporäre Anbindung verschiedener Substanzen ermöglicht. Die Hauptfunktion des Albumins besteht im Transport von Steroiden und Hormonen sowie in der Stabilisierung des Volumens der extrazellulären Flüssigkeit [28].

Auch reguliert Albumin den pH-Wert innerhalb des Plasmas [29].

In neuerer Literatur wird die Funktion des Albumins als Hitzeschockprotein diskutiert. Hitzeschockproteine sind Proteine die unter physiologischen Extrembedingungen Proteinen bei der Faltung oder Entfaltung helfen [23]. Es wurde gezeigt, dass Albumin Aggregate mit falsch gefalteten Proteinen bildet. Nach Entfernung von Albumin aus dem Blutplasma konnte ein starker Anstieg von Aggregaten zwischen anderen Serumproteinen beobachtet werden, was auf die stabilisierende Funktion des Albumins hinweist [30].

Albumin gehört zu der Klasse der Dysopsonine (vgl.3.2.2.) [26]. Durch diese Eigenschaft ist Albumin als möglicher Interaktionspartner für nanopartikuläre Wirkstoffsysteme sowie als Bestandteil von polymeren Wirkstoffformulierungen von großem Interesse [16].

3.1.2.2. Immunoglobuline

Immunoglobuline sind Glykoproteine, die von Zellen des Blutplasmas in Folge einer Aktivierung durch ein Immunogen produziert werden. Ihre allgemeine Funktion besteht in der spezifischen Bindung von einem oder mehreren strukturell sehr ähnlichen Antigenen. Nach der Bindung des Antigens können verschiedene zelltypabhängige Mechanismen, wie z.B. Zellyse oder die Freisetzung verschiedener biologisch aktiver Moleküle ausgelöst werden.

Immunoglobuline bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden sind. Dreidimensionale Abbildungen zeigen die globuläre Struktur dieser Glykoproteine. In Abbildung 1 ist schematisch die Struktur eines Immunoglobulins gezeigt.

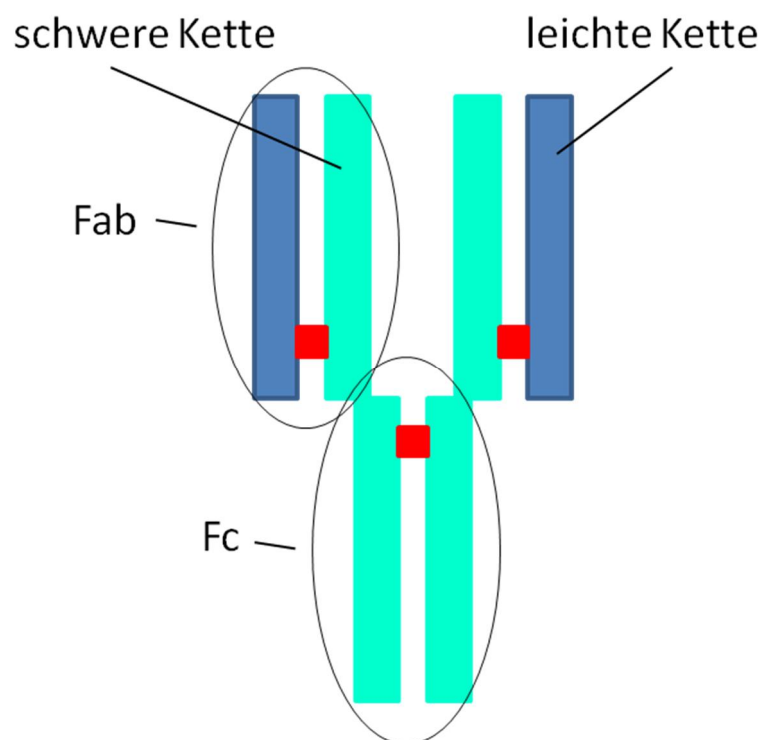


Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Immunoglobulins (Ig): Immunoglobuline bestehen aus zwei schweren (türkis) und zwei leichten Ketten (blau). In der Fab Region befindet sich die Antigenbindungsstelle, über die Fc Region kann eine Bindung an Fc Rezeptoren verschiedener Zellen stattfinden.

Man unterscheidet zwei funktionelle Regionen, die Fab und die Fc Region. Die Fab Region entspricht der Antigen Bindungsstelle, die Fc Region ermöglicht die Immunoglobulin-Zellvermittlung durch Bindung an Fc Rezeptoren, welche sich auf den jeweiligen Zellmembranen befinden.

Man unterscheidet fünf Klassen von Immunglobulinen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), wobei der Unterschied zwischen den Klassen in der jeweiligen Aminosäuresequenz innerhalb der konstanten Region der schweren Ketten liegt.

Immunglobulin G (IgG) macht 75% der Serumimmunglobuline aus. Es hat eine besonders starke Affinität zu den Fc Rezeptoren, welche insbesondere auf der Zellmembran von Makrophagen und Monozyten zu finden sind. Auf Grund dieser Eigenschaft gehört das IgG zur Klasse der Opsonine, d.h. es aktiviert phagozytotische Prozesse (vgl.3.2.2.).

IgA ist das zweithöchstkonzentrierte Serumimmunglobulin. Es besitzt keine Affinität zu Fc Rezeptoren, bindet überwiegend an Lymphozyten und ist kaum in die Komplementaktivierung involviert.

IgM weist eine pentamere Struktur auf und besitzt wie das IgG eine Affinität zu Fc Rezeptoren, wobei diese im Vergleich zum IgG weniger stark ausgeprägt ist. Die Hauptaufgabe des IgM liegt in der Erkennung und Zerstörung von Mikroorganismen.

IgD und IgE liegen nur in sehr geringer Konzentration im Serum vor, ihre Funktion innerhalb des Serums ist hier vernachlässigbar [31-32].

3.1.2.3. Lipoproteine

Lipoproteine sind makromolekulare Transporter für hydrophobe Lipide durch die wässrige Umgebung des Blutkreislaufs. Die kugelartigen Strukturen besitzen Durchmesser zwischen 35 Å und 6 µm.

Der hydrophobe Kern der Lipoproteine besteht aus Triglyceriden sowie verestertem Cholesterol. Die äußere Oberfläche besteht aus einer Monolage aus Phospholipiden, deren polare Kopfgruppen die Löslichkeit innerhalb der wässrigen Umgebung fördern. Diese Phospholipidschicht ist durchsetzt mit amphiphilen Molekülen (z.B. unverestertes Cholesterol) sowie mit speziellen Proteinen (Apolipoproteine).

Je nach Dichte werden vier verschiedene Lipoproteinklassen unterschieden:

VLDL (engl. very low density lipoprotein, $0.94 < \delta < 1.006$ g/ml)

LDL (engl. low density lipoprotein, $1.006 < \delta < 1.063$ g/ml)

HDL (engl. high density lipoprotein, $1.063 < \delta < 1.21$ g/ml) und Chylomikronen ($\delta > 0.94$ mg/ml).

Chylomikronen bestehen hauptsächlich aus Triacylglyceriden (80-88%, weight by weight (w/w)). Ihr Proteinanteil liegt bei nur 3% (w/w).

VLDLs bestehen zu 45-50% (w/w) aus Triacylglyceriden und enthalten zusätzlich noch freies sowie verestertes Cholesterol. Der Größenbereich der VLDLs liegt bei einem Durchmesser von 30-80 nm. Jedes VLDL enthält ein einzelnes ApoB Protein. Teilweise werden VLDL Partikel durch Leberzellen eliminiert, der Hauptanteil (ca. 70%) allerdings zirkuliert im Blutkreislauf. VLDL wird unter Abspaltung von Triacylglyceriden und ApoE in LDL umgewandelt (Abbildung 2).

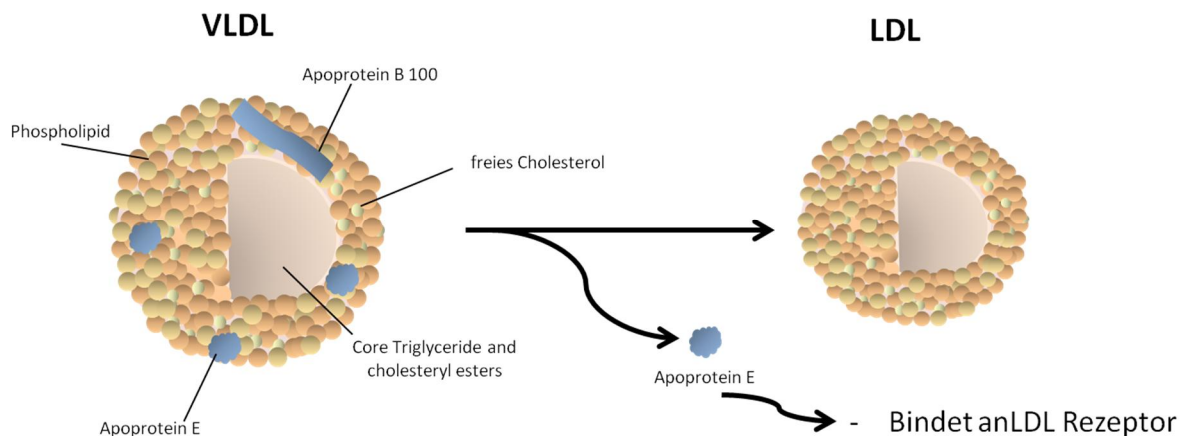


Abbildung 2: Umwandlung von VLDL (very low density lipoprotein) in LDL (low density lipoprotein). Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten sowie des Umwandlungsmechanismus.

Somit stellen die LDL Partikel das stabile Produkt des VLDL-Stoffwechsels dar. Ihr Durchmesser liegt zwischen 18-25 nm. LDL besteht vorwiegend aus Cholesterol und enthält ein einzelnes ApoB Protein, allerdings keine ApoE Proteine.

HDL Partikel bestehen aus einer heterogenen Mischung mit Partikeldurchmessern um die 12 nm. Charakteristisch für HDLs ist der relativ hohe Apolipoprotein Gehalt (35-56% (w/w) [23, 33-34]).

3.2. Nanopartikel als Drug Delivery Systeme

Die Problematik herkömmlicher niedermolekularer Wirkstoffsysteme liegt neben der schnellen Eliminierung durch glomeruläre Filtration auch in der unspezifischen Verteilung in krankem sowie gesundem Gewebe. Diese Mechanismen führen zu einem Anstieg der benötigten Arzneimittelkonzentration und damit zu einer erhöhten Toxizität und zu vermehrten Nebenwirkungen. Dies ist vor allem bei der in der Krebstherapie angewendeten Chemotherapie von großer Bedeutung [35]. Chemotherapeutika sind Zytostatika, deren Aufgabe in der Hemmung der Zellteilung bzw. des Zellwachstums besteht. Werden diese in gesunden Zellen angereichert kommt es zur Zerstörung des gesunden Gewebes und damit zu einer zusätzlichen Belastung des kranken Organismus [34].

Nanopartikel können sowohl über passive als auch über aktive Adressierungsmechanismen zu spezifischen Zellen im Körper geleitet werden. Durch diese spezifische Zelladressierung ist es möglich die lokale Konzentration eines Wirkstoffes (z.B. eines Chemotherapeutikums) im erkrankten Gewebe zu erhöhen, wobei gleichzeitig die Akkumulation in gesundem Gewebe verringert wird. Hierdurch gelingt es die Toxizität und Nebenwirkungen des Wirkstoffsystems zu verringern [36].

In Bezug auf die zielgerichtete Therapie von Krebs und auch anderen Krankheiten sind Antikörper-Konjugate von besonderer Bedeutung. Auf verschiedenen erkrankten Zellen, wurden bestimmte Tumormarker identifiziert, gegen die monoklonale Antikörper mit spezifischer Bindungsstelle entwickelt werden konnten [37].

Nanopartikel können insbesondere auf Grund ihres großen Oberflächen zu Masse Verhältnisses Wirkstoffe einschließen und diese kontrolliert und zielgerichtet wieder freisetzen. Durch die gezielte Freisetzung kann die Zirkulationszeit des Wirkstoffes im Blutkreislauf entsprechend der medizinischen Applikation gesteuert werden [38].

Über verschiedene Oberflächenmodifikationen kann die Plasmazirkulationszeit der Nanopartikel erhöht werden. Typische Gruppen für diese Modifizierung sind, neben der verbreiteten Polyethylenglykol (PEG)-Modifizierung [12]: Polyaminosäuren, Polyglycerole, Polyoxazoline und Polyvinyle (z.B. Polyacrylamide, Polyvinylpyrrolidone und Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide))[39].

3.2.1. Hauptklassen nanopartikulärer Drug Delivery Systeme

In der folgenden Tabelle sind die Hauptklassen nanopartikulärer Wirkstoffsysteme angeführt. Die Haupteigenschaften, sowie Beispiele für die Anwendung der verschiedenen Substanzen in Therapien sind aufgelistet. Genauere Erläuterungen der angeführten Beispiele können der Sekundärliteratur entnommen werden [36].

Tabelle 1: Hauptklassen nanopartikulärer Wirkstoffsysteme, charakteristische Eigenschaften und Anwendungsbeispiele aus der Krebstherapie[36].

System	Charakteristische Eigenschaften	Anwendungen In der Krebstherapie
Polymer Wirkstoff Konjugate	(a) wasserlöslich, atoxisch, bioabbaubar (b) Oberflächenmodifizierung möglich (PEGylierung) (c) selektive Anreicherung im Tumorgewebe (EPR Effekt) (d) spezifisches Targeting möglich	Albumin Taxol (Abraxan) PGA-Taxol (Xyotax) HPMA-DOX (PK1) HPMA-DOX-Galaktosamin (PK2)
Polymere Mizellen	(a) möglicher Transport von hydrophoben Wirkstoffen (b) biokompatibel, bioabbaubar (c) funktionelle Modifizierung möglich (d) Targeting möglich	PEG-pluronic-DOX PEG-PAA-DOX (NK911) PEG-PLA-Taxol (Genexol-PM)
Dendrimere	(a) Pharmakokinetik und Biodistribution können angepasst werden (b) starke Homogenität (c) leichte Funktionalisierbarkeit, hohe Ligandendichte (d) kontrolliert abbaubar (e) multifunktional	PAMAM-MTX PAMAM-Platinat
Liposomen	(a) amphiphil, biokompatibel (b) leicht modifizierbar (c) Targeting möglich	Liposomen-formulierung von: Peg-DOX (DOXIL) Dox (Myocet) Daunorubicin (Dauno Xome)
Virale Nanopartikel ^x	(a) Oberflächenmodifizierbar über Mutagenese oder Biokonjugation (b) spezifische Tumor Adressierung (c) definierte Geometrie (d) biokompatibel und inert	HSP-DOX CPMV-DOX
Kohlenstoff-nanoröhrchen	(a) wasserlöslich und biokompatibel nach chemischer Modifizierung (organischer Modifizierung) (b) multifunktional	CNT-MTX CNT-amphotericin B

^x Virale Nanopartikel: Viruspartikel, die keine Nukleinsäuren enthalten und sich damit nicht in den Zielzellen vermehren können. In diesen Strukturen können Proteine, DNA- und RNA-Moleküle transportiert werden. * Abkürzungen: PGA: Poly-(L-Glutamat); HPMA: N-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid; PEG: Polyethylenglykol; PAA: Poly-(L-Aspartat); PLA: Poly-(L-Lactid); PAMAM: Poly(Amidoamin); DOX: Doxorubicin; MTX: Methotrexat; EPR: enhanced permeability and retention; CTN: Kohlenstoffnanoröhrchen; HSP: Hitzeschockprotein; CMMV: cowpea mosaic virus.

3.2.2. Physiologische Verteilung und Eliminierung von Nanopartikeln im Körper

Die meisten nanopartikulären Wirkstoffsysteme werden intravenös appliziert. Somit gelangen die Partikel direkt in den Blutkreislauf und werden damit direkt zum Herzen transportiert (Abbildung 3). Nachdem die Nanopartikel das Herz passiert haben gelangen sie über den Blutkreislauf in die pulmonale Zirkulation. Die Lungenkapillaren sind hierbei die kleinsten Gefäße mit Durchmessern von 2-12 μm , somit bleiben Partikel mit einem Durchmesser größer als 3-6 μm in den Gefäßen der Lungenkapillaren stecken. Partikel < 3 μm können frei hinein und heraus diffundieren und verbleiben somit weiterhin im Blutkreislauf.

Innerhalb der Zirkulation eines nanopartikulären Systems kann es zur Eliminierung der Partikel durch verschiedene Organe und Gewebe kommen. Neben dem Blut sind an diesen Prozessen vor allem Leber, Niere und Milz beteiligt.

Die Ausscheidung über Niere und Milz spielt nur für sehr kleine Partikel mit einem Durchmesser kleiner 6 nm eine Rolle. In makromolekularen Formulierungen verpackte Wirkstoffe überschreiten üblicherweise die Ausschlussgrenze dieser Organe deutlich [16].

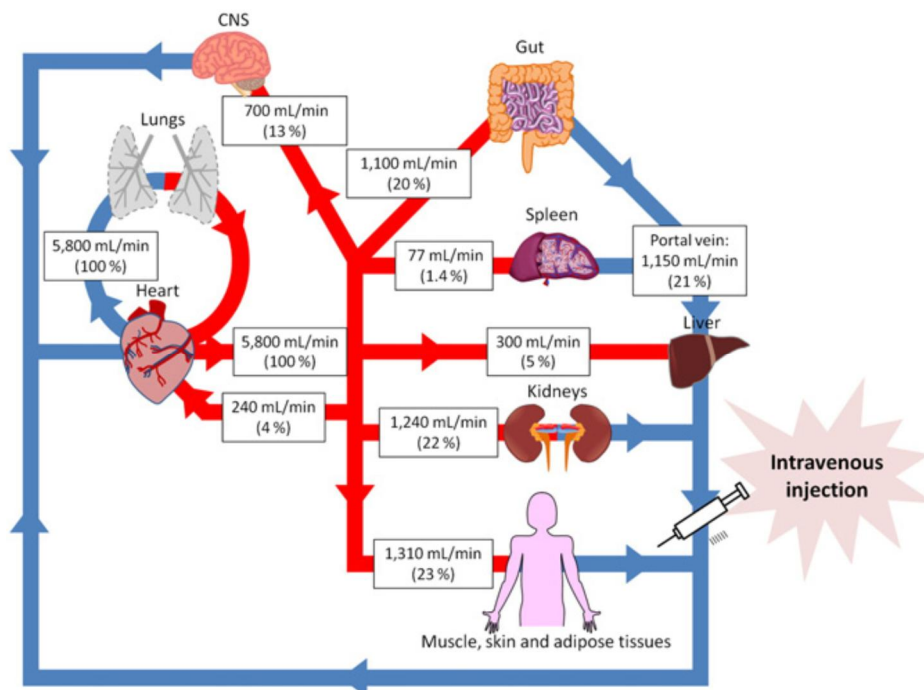


Abbildung 3: Verteilung des Blutes in der pulmonalen und systemischen Zirkulation. Die Werte in den Kästen geben den prozentualen Anteil des Blutes, an der durch ein bestimmtes Organ fließt. CNS = Zentrales Nerven System (engl.: central nervous system) [16].

Während ihrer Zirkulation im Blutkreislauf kommen die Nanopartikel in Kontakt mit dem gesamten Plasma Proteom (vgl. 3.1.3.) und damit mit dem Opsonin und Dysopsonin System. Der durch Adsorption von speziellen Plasmaproteinen (= Opsonine) ausgelöste phagozytotische Mechanismus (= Opsonisierung) führt zur Aufnahme der Nanopartikel von Makrophagen und damit zur Eliminierung durch die Leber [16, 18].

Wie in Abbildung 4 gezeigt, werden bioabbaubare Polymere, gleichermaßen wie Pathogene, im phagozytotischen System degradiert. Sind die Nanopartikel allerdings nicht bioabbaubar kommt es zu einer Akkumulation dieser in der Leber, was in unerwünschten Nebenwirkungen resultiert.

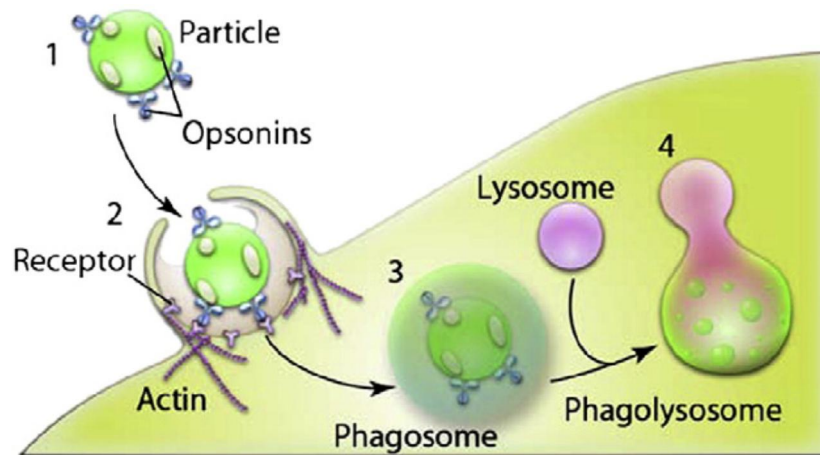


Abbildung 4: Phagozytose von Nanopartikeln: 1) Partikel werden im Blutstrom über die Anbindung von Opsoninen erkannt (Opsonisierung), 2) opsonisierte Partikel docken an Rezeptoren der phagozytotischen Zellen an, 3) Partikel werden in die Zelle aufgenommen, 4) Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen, dann erfolgt bei bioabbaubaren Polymeren Degradation durch lysosomale Enzyme [18].

Der Prozess der Opsonisierung kann hierbei in einem zeitlichen Rahmen von wenigen Sekunden bis zu mehreren Tagen erfolgen. Zur Klasse der Opsonine gehören u.a. Immunglobuline und Komplementfaktoren (z.B. CRP, SAP, A-beta42, SAA) sowie die Plasmaproteine Laminin, Fibronectin, C-reaktives Protein und Typ I Kollagen [12]. Sogenannte Dysopsonine hingegen bilden eine Schutzschicht gegen den Prozess der Opsonisierung. Zur Klasse der Dysopsonine gehört das humane Serumalbumin. Durch seine spezifische Struktur wechselwirkt das Albumin nicht mit den Fc Rezeptoren des Endothels, wodurch es vor glomerulärer Filtration geschützt ist und hat somit eine sehr lange Plasmahalbwertszeit von 19-22 Tagen [27].

Makrophagen haben ebenfalls eine hohe Expression des Fc Rezeptors auf ihrer Oberfläche, worüber sie beispielsweise mit Immunglobulinen wechselwirken können. Partikel, die mit einer Albuminschicht bedeckt sind werden somit nicht über den Fc Rezeptor abhängigen Weg von Makrophagen erkannt [40-41].

Die Wechselwirkungen zwischen Albumin und Nanopartikeln erfolgt sehr schnell nach der Injektion und kann sowohl ionischer als auch hydrophober Natur sein. Eine Albuminschicht kann die Partikel vor Opsonierung schützen. Haben allerdings geringer konzentrierte Proteine eine höhere Affinität zur Partikeloberfläche, wird das Albumin verdrängt, dieser Mechanismus wird als „Vroman-Effekt“ bezeichnet. Durch die Anbindung von Albumin an die Oberfläche polymerer Wirkstoffsysteme kann eine längere Plasmazirkulationszeit erreicht werden, dies findet beispielsweise Anwendung in dem Medikament Abraxane®. Hierbei handelt es sich um ein mit Albumin beschichtetes Paclitaxel [16].

Neben den Fc Rezeptoren befinden sich auch Scavenger Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche. Diese Rezeptoren sind trimere Membranproteine mit einer starken Affinität zu anionischen Liganden (z.B. Lipoproteinen (v.a. LDL), Polysaccharide, Polyribonukleinsäuren). Somit können Nanopartikel die mit ähnlichen Strukturen modifiziert sind ebenfalls von Makrophagen erkannt und unabhängig von einer Opsonin Adsorption eliminiert werden [42-43].

Desweiteren können Makrophagen Nanopartikel auf Grund der Größe und der Form erkennen, wobei dieser Mechanismus im Wesentlichen von der Kontaktfläche zwischen Partikel und Makrophage abhängt. Insbesondere werden Partikel mit einem Durchmesser von 2-3 μm von den Makrophagen aufgenommen, wobei dieser Bereich der Größe von vielen in der Natur vorkommenden Bakterien entspricht. Makrophagen, welche eine Größe von 2-3 μm strukturell bedingt favorisieren, nehmen die Partikel über Membraneinstülpungen auf (= Endozytose, vgl. Abbildung 4) [40-41].

Derzeit liegt die Größenvorgabe für therapeutische Nanopartikel zwischen 10 und 100 nm. Eine Größe von 10 nm sollte nicht unterschritten werden um eine direkte renale Ausscheidung zu verhindern. Die obere Grenze von 100 nm ist derzeit nicht genau definiert. Allerdings ist bekannt, dass Partikel, die eine Größe von 100 nm überschreiten, schneller durch endocytotische Mechanismen aufgenommen werden können [44].

Makromolekulare Krebsmedikamente, die direkt in den Blutstrom injiziert werden, können ab einer bestimmten Größe über den EPR-Effekt spezifisch von Tumorgewebe aufgenommen werden. Der Begriff EPR steht für: *enhanced permeability and retention* und beschreibt die Eigenschaft, dass die Blutkapillaren im Bereich von Tumorgewebe eine höhere Permeabilität aufweisen [45-46]. So können in diesen Bereichen Makromoleküle durch die Gefäßwände in die Tumorgewebe gelangen. Innerhalb gesunder Gewebezellen weisen die Gefäßwände nur Poren in der Größenordnung von 1-2 nm auf. Somit wird allein durch die Größe ein Targeting zu erkrankten Geweben bewirkt.

Um sowohl den Transport der Partikel zum erkrankten Gewebe als auch die endocytotische Aufnahme zu gewährleisten, müssen Oberflächenstruktur, Größe und auch Form der Partikel auf das jeweilige Anwendungsgebiet abgestimmt werden. In der Literatur wurde exemplarisch gezeigt, dass Nanopartikel mit einer Größe zwischen 10 und 100 nm und einer neutralen bis leicht positiven oder leicht negativen Oberflächenladung eine besonders hohe Aufnahme ins Tumorgewebe zeigen [47-49].

In Abbildung 5 ist zum einen die Aufnahmefähigkeit von Nanopartikeln in Zellen über Endocytose, zum anderen der Vergleich der Pharmakokinetik von makromolekularen und niedermolekularen Wirkstoffsystemen gezeigt [50].

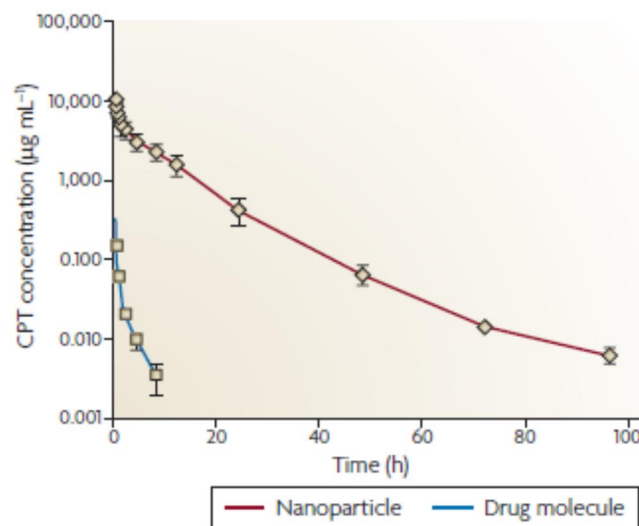


Abbildung 5: Pharmakokinetik von niedermolekularem Wirkstoff gegenüber Nanopartikel. CPT: Camptothecin polymer conjugate [47, 50].

3.2.3. Biophysikalisch-chemische Wechselwirkungen biologischer Substrate mit nanopartikulären Grenzflächen

Mögliche physikalische Wechselwirkungen nanopartikulärer Systeme in wässrigem Milieu sind im Wesentlichen begründet in:

1. elektrostatischen Wechselwirkungen (ionische Coulomb-, Ion-Dipol-, Dipol-Dipol-Ww. etc.)
2. Van der Waals Wechselwirkungen
3. Hydrophoben Wechselwirkungen (Hydratationsentropie, Aus-, Einsalzeffekte, Hofmeister Effekte, etc.)
4. Entropischen Wechselwirkungen (hydrodynamisch, sterisch als Depletion)

Oft verstärken sich diese Wechselwirkungen gegenseitig, z.B. führt in einfachen Polyelektrolytkomplexen eine „einfache“ Coulomb-Wechselwirkung zur Aggregation, die durch Freisetzung kleiner Gegenionen und Hydratationswasser, hydrophobe Wechselwirkung (als Entropieuzunahme des solvatisierenden Wassers) und Van der Waals Kräfte im Nahbereich „verstärkt“ wird, und in der Folge zu Präzipitation und Phasenseparation führen kann.

In biologischen Systemen treten zudem dann noch spezifische Wechselwirkungen, Stichwort molekulare Erkennung, und durch Interaktion bedingte dynamische Umwandlungen hinzu, die in der Folge natürlich auch zu Änderungen der physikochemischen Eigenschaften führen und Struktur und Funktion interagierender biologischer Komponenten bestimmen.

Auch an der Grenzfläche zwischen Nanopartikeln und biologischen Komponenten sind deshalb komplexe, physikochemisch gekoppelte Interaktionen zu erwarten, die zudem einer thermodynamischen oder kinetischen Kontrolle unterworfen sein können. Hierbei können die Oberflächen der Nanopartikel mit den Oberflächen der biologischen Komponenten (z.B. Proteine, Membranen, endocytotische Vesikel, Organellen, DNA, biologische Flüssigkeiten und Phospholipide) interagieren.

Es ist bekannt, dass die meisten Substanzen, die mit biologischen Medien (z.B. Blutplasma) in Kontakt kommen, sofort mit einer Schicht aus Proteinen belegt werden [22]. Die

angebundene, als Proteinkorona bezeichnete Schicht ist komplex und systemspezifisch. Beispielsweise enthält das Plasma mehrere hundert verschiedene Proteine, die auf Grund ihrer spezifischen Struktur mit Fremdkörpern in Abhängigkeit von deren struktureller, chemischer und physikalischer Beschaffenheit individuelle Wechselwirkungen eingehen können.

Die biophysikalischen Eigenschaften des Partikel-Protein-Komplexes unterscheiden sich dann deutlich von denen der ursprünglichen Formulierung. Diese veränderten Eigenschaften können zu einer signifikanten Veränderung des weiteren physiologischen Verhaltens nach *in vivo* Applikation führen [19].

Im Kontaktbereich der Nanopartikel mit dem biologischen Medium kann es zu einer ganzen Reihe von physikalischen und chemischen Interaktionen kommen. Neben hydrodynamischen Wechselwirkungen, welche zu einer erhöhten Kollisionsfrequenz zwischen den Partikeln und den im biologischen System vorhandenen Oberflächen führen können, müssen auch elektrodynamische und elektrostatische Wechselwirkungen in Betracht gezogen werden. Lösungsmittelleffekte können zu Aggregation führen, falls beispielsweise auf Grund veränderter Zusammensetzung in dem biologischen Medium gegenüber dem Partikel-Lösungsmittel ein lyophobes Verhalten auftritt. Auch müssen sterische Effekte und die Möglichkeit der Partikel-Protein-Verbrückung in Betracht gezogen werden (Abbildung 6).

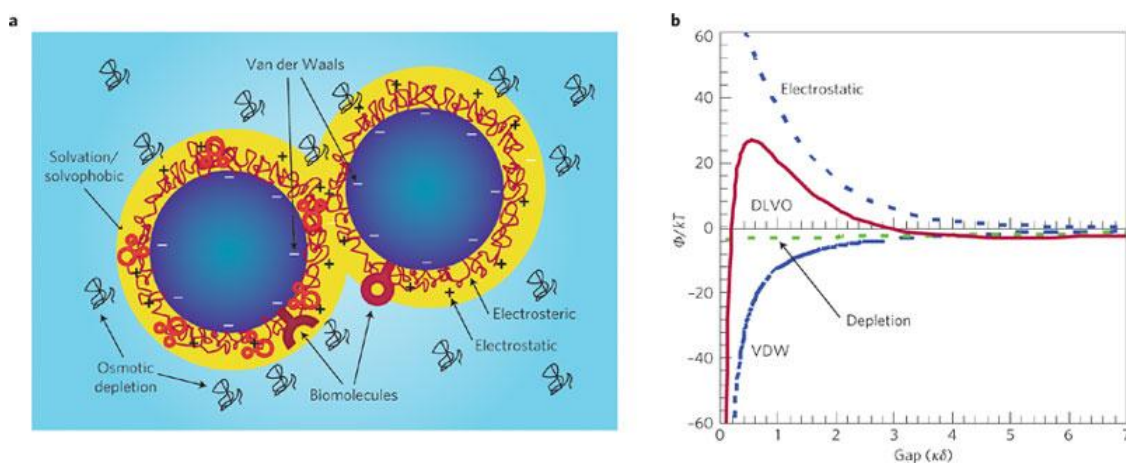


Abbildung 6: (a) Typische auftretende Wechselwirkungen bei Suspension eines Nanopartikels in einem biologischen Medium und bei Kontakt mit Zellen, (b) Darstellung der Abstandsabhängigkeit von attraktiven (VDW, Depletion) und repulsiven (elektrostatischen) Kräften, DLVO Theorie ergibt sich aus der Summation aller auftretenden Kräfte, ϕ = Wechselwirkungspotential, k = Boltzmann Konstante, T = absolute Temperatur, κ = inverse Debye Länge, δ = Abstand [22].

Das die Nanopartikel umgebende Medium innerhalb eines biologischen Systems kann durch physikalische Parameter (Temperatur, pH, Ionenstärke) sowie durch die Anwesenheit von großen organischen Molekülen (Proteine) oder Detergentien die Eigenschaften des Wirkstoffsystems stark beeinflussen. Dies kann sich auf effektive Oberflächenladung, Aggregationsverhalten, Biokompatibilität, Hydratations- und Dispersionsverhalten der Nanopartikel im biologischen Medium auswirken. Ebenso kann auch der Kontakt mit Nanopartikeln auf die physiologische Funktion der Proteine Einfluss nehmen, beispielsweise kann es durch Veränderungen der Elektronenstruktur an der Nano-Bio-Grenzfläche zur Spaltung kovalenter Verknüpfungsstellen in den katalytischen Domänen der Proteine kommen [22].

Zur Gewährleistung eines wirkungsvollen und sicheren Wirkstoffsystems ist es wichtig die Wechselwirkungen soweit es geht zu charakterisieren, um dann die Partikel entsprechend der Applikation zu modifizieren.

3.2.4. Analytik von Nanopartikeln in Wechselwirkung mit biologischen Medien

Die Wichtigkeit der Analyse von Nanopartikeln in Gegenwart biologischer Medien wird in der Literatur sowie von der FDA (engl. food and drug administration) immer mehr diskutiert [5].

Im Folgenden sind die zurzeit gängigen Methoden zusammenfassend dargestellt. Eine Möglichkeit ist, die Nanopartikel mit Plasma zu inkubieren, wobei die Nanopartikel im Überschuss zu den Plasmaproteinen eingesetzt werden. Die Mischung wird anschließend zentrifugiert, um die mit Proteinen überzogenen Nanopartikel vom restlichen Medium zu isolieren. Es können dann über SDS-Gelelektrophorese und UV/Vis-Spektroskopie die Änderungen von verschiedenen Proteinkomponenten (z.B. Albumin, Immunoglobulinen und Fibronectin) bestimmt werden.

Allerdings sind diese Methoden sehr ungenau und durch den Prozess werden die meisten der den physiologischen Bedingungen entsprechenden Parameter verändert [17].

Die Proteinkorona kann über eine Kombination aus Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (LC-MS/MS), ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese und Immunplotting quantitativ sowie qualitativ bestimmt werden [19].

Mit ITC (*isothermal titration calorimetry*) kann über Messung von Enthalpieänderungen die Affinität und Stöchiometrie von Proteinen, die an Nanopartikel binden,

untersucht werden. Durch den Vergleich von GPC-Elutionsdiagrammen von reinen Proteinmischungen und Proteinmischungen, denen ein Nanopartikel zugesetzt wurde, kann man mittels einer nachgeschalteten SDS-Gelelektrophorese Wechselwirkungen beurteilen [51].

Mittels Fluoreszenz-Spektroskopie kann durch Nanopartikel hervorgerufenes Quenching von fluoreszierenden Proteinen detektiert werden.

Ebenfalls werden CD-Spektrometrie und elektronenmikroskopische Messungen an Nanopartikel-Proteinmischungen routinemäßig durchgeführt [52]. Über REM (Rasterelektronenmikroskopie) und TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) können Nano-bio-Grenzflächen mit dichter Elektronenstruktur untersucht werden.

Das Verhalten von fluoreszenzmarkierten Partikeln in biologischen Systemen kann über konfokale Mikroskopie beobachtet werden. Bei dieser Methode bestehen die Probleme meistens in der Instabilität des Fluoreszenzfarbstoffes und in der Entstehung von strukturellen Defekten innerhalb der Zellen, hervorgerufen durch Laserlicht.

Die zuvor beschriebenen Verfahren eignen sich gut, um Wechselwirkungen zwischen metallischen Nanopartikeln und biologischen Systemen zu untersuchen, sind aber nicht geeignet zur Analyse weicher Materialien, wie Dendrimere oder Liposomen. Zudem sind diese Methoden allerdings nicht oder nur bedingt geeignet Nanopartikel-Protein-Wechselwirkung direkt in den biologischen Medien zu untersuchen [22].

Mittels dynamischer Lichtstreuung kann die Größe von entstehenden Aggregaten zwischen Nanopartikeln und Komponenten des Blutserums direkt im konzentrierten Blutserum untersucht werden. Die Methode wurde im Rahmen einer Diplomarbeit [Diplomarbeit, Rausch Kristin, 2010] entwickelt und wird in dieser Arbeit weiter verifiziert. Sie ermöglicht die Untersuchung von Größe der Wirkstoffsysteme direkt im Applikationsmedium. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode als screening Test *in vivo* Versuchen vorgeschaltet werden kann und dabei hilft die zu erwartenden physiologischen Reaktionen des nanopartikulären Systems besser einzuschätzen.

Die Wahrscheinlichkeit einsetzender und unerwarteter Nebenwirkungen im *in vivo* Experiment, ausgelöst durch Protein-Partikel Interaktionen wird damit erheblich gesenkt. Auch kann durch das Ausschließen einer Immobilisierung des Wirkstoffsystems durch

Aggregation der Partikel mit Blutkomponenten am Injektionsort eine Applikation ohne Konzentrationsverlust gesichert werden [21].

3.3. Liposomen zum Transport von siRNA zur Leber

Im folgenden Abschnitt sind die Grundlagen liposomaler Drug Delivery Systeme dargestellt. Der theoretische Hintergrund des siRNA Deliveries wird erklärt und es wird auf die Anwendung von liposomalen siRNA Systemen zur Behandlung von Leberzirrhose eingegangen.

3.3.1. Liposomen als Drug Delivery Systeme

Liposomen sind mikroskopische Kugeln, deren Innenraum mit einem Lösungsmittelgefüllt ist und deren Membran aus einer ein- oder mehrschichtigen Lipidschicht besteht. Ihre strukturellen Eigenschaften machen sie zu hochinteressanten Kandidaten für den Transport von hydrophilen, sowie hydrophoben Wirkstoffen und Nukleotid/Ribonukleotid-Therapeutika [53].

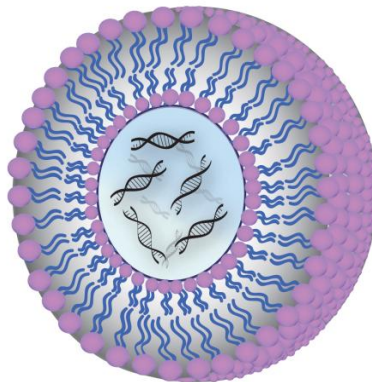


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Liposoms als siRNA Delivery System: Die Lipidschicht umgibt hierbei den wässrigen Innenraum, in welchem die siRNA lokalisiert ist. Die hydrophilen Lipidköpfe zeigen nach außen, die hydrophoben Lipidschwänze nach innen [54].

Insbesondere monodisperse Liposomen, hergestellt durch Extrusionstechnologie liefern vielversprechende Ergebnisse. Große einschalige Liposomen (ca. 100 nm Durchmesser) zeigen eine gute Verkapselungskapazität und sind dabei immer noch klein genug, um eine ausreichende Blutzirkulationszeit zu erreichen.

Eine lange Blutzirkulationszeit ist notwendig, um das jeweilige Zielgebiet (beispielsweise Tumorgewebe oder entzündete Gewebe) innerhalb des Körpers erreichen zu können. Wesentlich größere oder kleinere Vesikel werden hingegen sehr schnell aus der systemischen Zirkulation ausgeschleust [55]. Insbesondere Liposomen, bestehend aus

Cholesterol und Phosphatidylcholinen, zeigen hohe Biokompatibilität und eine effiziente Wirkstoffeinkapselung [56].

Eine weitere Verbesserung der Zirkulationszeit sowie eine verminderte Erkennung durch das phagozytotische System (vgl. 3.2.2.) kann durch die Modifizierung der Liposomenoberfläche mit PEG-Derivaten (PEG = Polyethylenglykol) erreicht werden. Diese oberflächenfunktionalisierten Liposomen werden als „stealth Liposomen“ bezeichnet [57-59]. Hinzu kommt auch, dass die PEG-Modifizierung zu einer erhöhten sterischen Stabilität der liposomalen Systeme führt [59].

Insbesondere für den Transport von Chemotherapeutika sind liposomale Formulierungen hoch interessant. Über einen Transmembran-pH-Gradienten können die meist leicht basischen Chemotherapeutika in den Vesikeln akkumuliert werden und in der sauren Umgebung des Tumorgewebes gezielt freigesetzt werden [55]. Als siRNA Delivery-Systeme (vgl. 3.3.1.) sind insbesondere Mehrkomponenten-Liposomen attraktiv. Jede der Komponenten erfüllt hierbei verschiedene Aufgaben. Cholesterol sowie Phosphatidylcholine sorgen für eine hohe Biokompatibilität und Membranstabilität. Die Einführung von natürlich oder synthetisch hergestellten kationischen Lipiden führt zu einer effektiveren siRNA-Komplexierung sowie zu einem zusätzlichen Schutz vor RNA-abbauenden Enzymen. Auch verbessert die positive Ladung den Zellmembrantransport.

Zusätzliche Oberflächenmodifizierungen der Liposomenmembranen, etwa durch Antikörper oder Zuckermoleküle können zudem ein zellspezifisches Targeting ermöglichen [54, 60].

3.3.2. siRNA Funktion und Delivery

Die doppelsträngige siRNA (engl.: short interference ribonucleic acid) besteht aus 21-23 Basenpaaren. Diese sind so hybridisiert, dass die jeweilige Base am 3'-Ende einzelsträngig vorliegt.

Die siRNA wird durch Spaltung eines großen doppelsträngigen RNA-Moleküls zugänglich und ihre Funktion liegt neben der Verteidigung gegen Viren in der Kontrolle der Genexpression im Rahmen des posttranskriptionalen Gen-Silencings. Hierbei assoziiert die nicht-kodierende siRNA mit Nuklease enthaltenden Komplexen zum RNA-induced-silencing-complex (RISC), wobei nur ein Strang der siRNA in den Komplex übernommen wird.

Der RISC Komplex dirigiert dann über den siRNA-Einzelstrang zur komplementären mRNA (messenger RNA) und bindet an diese. Hierdurch wird die Expression des Gens für welches die entsprechende mRNA kodiert inhibiert.

Somit bestimmt die siRNA durch die Anordnung ihrer Basen die Spezifität der Inhibition der Genexpression. Diesen Prozess der zielgerichteten Abschaltung von Genen bezeichnet man als RNAi (RNA interference), oder RNA silencing [23, 61]. Immer häufiger werden siRNA-Moleküle als mögliche Therapeutika im Menschen diskutiert [62]. Die Hauptschwierigkeit hierbei liegt in der Applikation der siRNA. Auf Grund der hohen Polarität der Moleküle sowie der Größe ist ein passiver Transport in die Zellen des Zielgewebes kaum möglich [60]. Auch werden siRNA Moleküle von RNasen die überall im Körper vorkommen, schnell degradiert [23].

Es gibt nur sehr wenige Beispiele in denen es möglich ist siRNA ohne einen Träger, bzw. ohne Einschluss in ein Transportsystem zu verabreichen [63]. Häufig erfolgt der Transport von siRNA über Komplexierung mit kationischen Lipiden oder als so genannte Polyplexe.

Unter Polyplexen versteht man Komplexe bestehend aus kationischen Polymeren und Nukleinsäuren, bzw. Ribonukleinsäuren [64]. Das Hauptproblem der Komplexierung besteht hierbei in der möglichen Dissoziation des Komplexes induziert durch bestimmte Serumproteine oder physiologische Ionenstärke.

Auf Lipid Basis hergestellte siRNA-Delivery-Systeme haben den Vorteil, dass sie die Zellmembran durch einen physiologischen Membranfusionsprozess durchdringen können

ohne die Zellmembran zu zerstören. Polyplexe hingegen sind auf endozytotische Aufnahmewege angewiesen [64-65].

3.3.3. Leberzirrhose: Krankheitsbild sowie Behandlung mit liposomalen siRNA Therapeutika

Leberzirrhose ist eine exzessive Akkumulation von anormaler extrazellulärer Matrix (ECM) der Leber. Diese Erkrankung geht meist auf eine Störung der Wundheilung nach einer chronischen Leberverletzung zurück.

Die Haupteffektorzellen innerhalb der Leber sind die hepatischen Sternzellen (HSCs) sowie Myofibroblasten.

Diese Zellen sind hauptsächlich für die Produktion der extrazellulären Matrix verantwortlich. Nach einer Leberverletzung kommt es zu einer Überproduktion der Wachstumsfaktoren TGF β und PDGF. Diese Faktoren aktivieren die HSCs zu vermehrter Zellteilung sowie verstärkter Produktion von ECM. Es ist möglich mittels siRNA Therapeutika bestimmte Gene die zur Produktion der ECM beitragen auszuschalten und damit die weitere Akkumulation der ECM zu stoppen.

Auch über verschiedene Cytokine, die an Rezeptoren (z.B. IFN γ) binden und hierdurch die vermehrte Zellteilung stoppen, kann der weitere Verlauf der Krankheit eingedämmt werden.

Die Problematik dieser Behandlung besteht allerdings in der weiten Verbreitung dieser Rezeptoren im Körper und damit in der gesteigerten nötigen Konzentration des Wirkstoffsystems sowie der damit gesteigerten Toxizität durch Wechselwirkungen mit den Rezeptoren gesunder Zellen [66-67].

Ein Vorteil liposomaler siRNA Systeme zur Behandlung von Leberzirrhose liegt neben deren erhöhten Biokompatibilität sowie langen Plasmazirkulationszeit in der Möglichkeit der Einführung verschiedener targeting Eigenschaften (Abbildung 8).

Zwar ist im Allgemeinen die Aufnahme von Wirkstoffsystemen in der Leber gut, allerdings ist die Aufnahme in fibrinogenen Zellen gegenüber anderen Leberzellen deutlich herabgesetzt.

Es gibt bereits einige Beispiele, die spezifisch zu Zellen fibrogenen Gewebes adressieren: PDGFR β oder Integrin α V β 6 Antagonisten, liposomale Aptamere und siRNA gegen Prokollagen 1.

Einzel betrachtet haben aber alle diese Systeme ihre Grenzen und für den weiteren Fortschritt wäre eine Kombination der verschiedenen Faktoren wichtig. In Abbildung 8 sind einige spezifische Liganden und ihre entsprechenden Zielzellen innerhalb der Leber dargestellt [67].

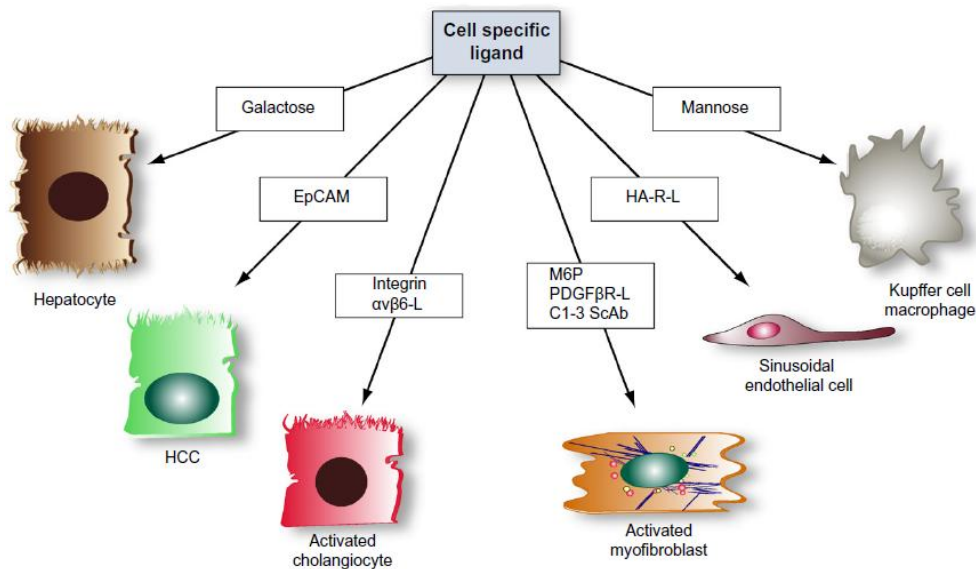


Abbildung 8: Übersicht über zellspezifische Liganden, die zu einer spezifischen Adressierung bestimmter Leberzellen verwendet werden können: Galactose bindet spezifisch an Hepatocyt, HCC (= hepatocellular cancer cells) besitzen die Bindungsstelle EpCAM für monoklonale Antikörper, aktivierte Cholangiozyten exprimieren den Integrinrezeptor $\alpha v \beta 6$, dieser bindet $\alpha v \beta 6$ -Liganden (Integrin $\alpha v \beta 6$ -L), aktivierte Myofibroblasten können über Mannose-6-Phosphat (M6P), Liganden des „platelet derived growth factor β “ (PDGF β R-L) und Antikörpern gegen Synaptophysin (C1-3 ScAb) adressiert werden, Sinusoidale Endothelzellen über den „hyaluronan acid rezeptor Ligand“ (HA-R-L), Kupferzellen und Makrophagen über Mannose Funtionalisierung [67].

4. Methoden

Im Folgenden werden die Grundlagen der in dieser Arbeit angewendeten physikalisch chemischen Methoden erläutert.

4.1. Lichtstreuung

Die Lichtstreuung ist eine Absolutmethode zur Bestimmung von Molmasse, Form und Struktur von Teilchen in Lösung. Man unterscheidet die statische Lichtstreuung (SLS) von der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Bei einem Lichtstreuexperiment wird Laserlicht durch eine Probenlösung gestrahlt. Der allgemeine Aufbau einer Lichtstreuapparatur ist in Abbildung 9 gezeigt. Diese besteht aus einem Laser, der als Lichtquelle dient, verschiedenen Linsen und Lochblenden zur Fokussierung des Laserstrahls, einem Detektor (Photomultiplier), der auf einem beweglichen Goniometerarm befestigt ist sowie einer Auswerteeinheit (Korrelator, Digital-Analog-Wandler und Rechner). Es ist möglich, dass mehrere Detektoren in einem festen Abstand zueinander auf dem beweglichen Goniometerarm angebracht sind, so dass eine simultane Messung mehrerer Winkel möglich ist. Bei der DLS werden typischerweise Streuwinkel im Bereich von 15° bis 160° erfasst, wobei im Hinblick auf große Teilchen die 30° Messung am aussagekräftigsten ist, da der Formfaktor von größeren Partikeln bei größeren Streuwinkeln stärker abfällt und diese somit weniger sichtbar sind (vgl. 4.1.1.). Die Lichtstreuökvetten werden in ein, auf die erwünschte Messtemperatur temperiertes, Toluolbad eingesetzt. Toluol wird als Badflüssigkeit verwendet, da dessen Brechungsindex mit dem von Quarzglas nahezu übereinstimmt, wodurch Reflexionen abgeschwächt werden können [68].

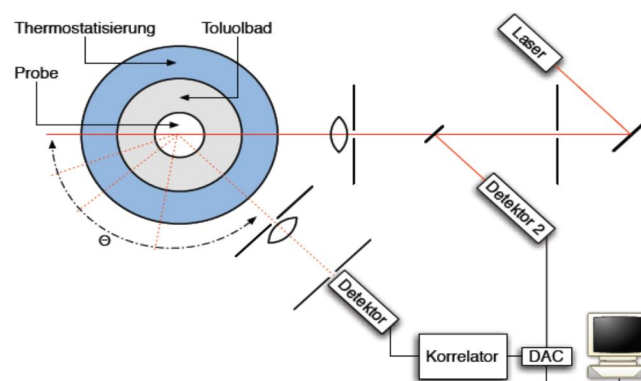


Abbildung 9: Aufbau einer Lichtstreuapparatur [69].

4.1.1. Statische Lichtstreuung und Partikelformfaktor

Der auf die Probenlösung einstrahlende Primärstrahl induziert in den Elektronenhüllen der Moleküle oszillierende Dipole von denen das vom Detektor erfasste Streulicht emittiert wird. Bei der SLS werden Werte der Streuintensität, die in Abhängigkeit vom Streuwinkel gemessen werden, über einen bestimmten Zeitraum gemittelt. Über den aus der Zimmgleichung (Gl. 4-1) abgeleiteten Zimmplot (Abbildung 10) lassen sich bei doppelter Extrapolation auf $c = 0$ und $q = 0$ das Gewichtsmittel der Molmasse, das z-Mittel des Trägheitsradienquadrates ($\langle R_g^2 \rangle_z$) und der 2. Virialkoeffizient (A_2) des osmotischen Drucks bestimmen.

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle_z q^2 \right) + 2A_2c \quad (\text{Gl.4-1})$$

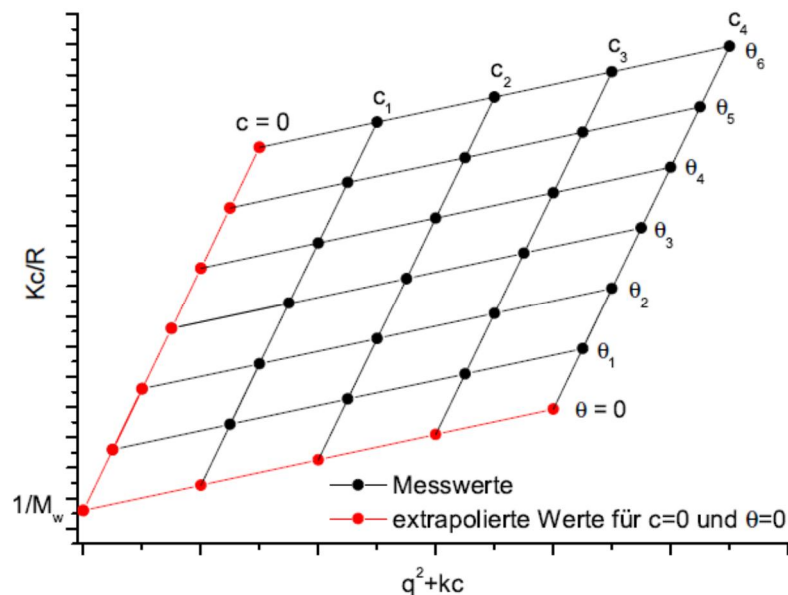


Abbildung 10: Exemplarischer Zimmplot: erhalten aus der winkel- und konzentrationsabhängigen statischen Lichtstreuung [69].

Das Trägheitsradienquadrat $\langle R_g^2 \rangle$ ist die Summe über das Quadrat der Abstände vom Schwerpunkt der untersuchten Struktur und steht in Bezug zum geometrischen Radius über

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{\int_0^R n(r)r^2 dr}{\int_0^R n(r) dr} \quad (\text{Gl: 4-2})$$

mit $n(r)$ der Anzahl der Punkte (Streuzentren, Volumen Elemente) die im Abstand r vom Schwerpunkt eines Partikels gefunden werden. Angenommen wird hierbei, dass alle Volumenelemente die gleiche Masse besitzen.

Über die Winkelabhängigkeit der Streuintensität kann die Form eines Partikels abgeschätzt werden, wobei man gemessene Daten mit Daten von kalkulierten Formfaktoren vergleicht. Beispielsweise kann man die Streukurve mit Formfaktoren von verschiedenen Modellen fitten.

Der Formfaktor von zufällig orientierten Partikeln (z.B. Makromoleküle, Kolloide in Lösung) ist über die Integration über alle möglichen Orientierungen definiert

$$P(q) = \frac{1}{z^2} \sum_{i=1}^z \sum_{j=1}^z \left\langle \frac{\sin(qr)}{qr} \right\rangle_r \quad (\text{Gl.4-6})$$

Für kleine Partikel, also kleine Abstände r_{ij} zwischen den Streuzentren, kann nach einer Taylor Reihenentwicklung über die Guinier Annäherung der Partikelformfaktor definiert werden als

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle + \dots \quad (\text{Gl.4-7})$$

Diese Beschreibung des Partikelformfaktors geht dann in die Zimm Gleichung ein (vgl. Gl. 4-1). Betrachtet man die Änderung des Partikelformfaktors $P(q)$ mit $q^2 \langle R_g^2 \rangle$, fällt auf, dass sich für verschiedene Partikelformen der Formfaktor bei kleinen Winkeln und somit kleinem q kaum unterscheidet (Abbildung 11). Bei größeren q -Werten ist allerdings eine deutliche Aufwärtsbiegung des Partikelformfaktors im Falle einer Kugel zu erkennen, wobei der Formfaktor des Stäbchens eine Abwärtsbiegung aufweist und sich der Formfaktor des Knäuls annähernd linear verhält (Abbildung 11). Es wird somit deutlich, dass für die Interpretation von Streukurven in der lin/lin Auftragung unbedingt der gesamte q -Bereich zu beachten ist, um eine qualitative Aussage über die Form des betrachteten Partikels treffen zu können.

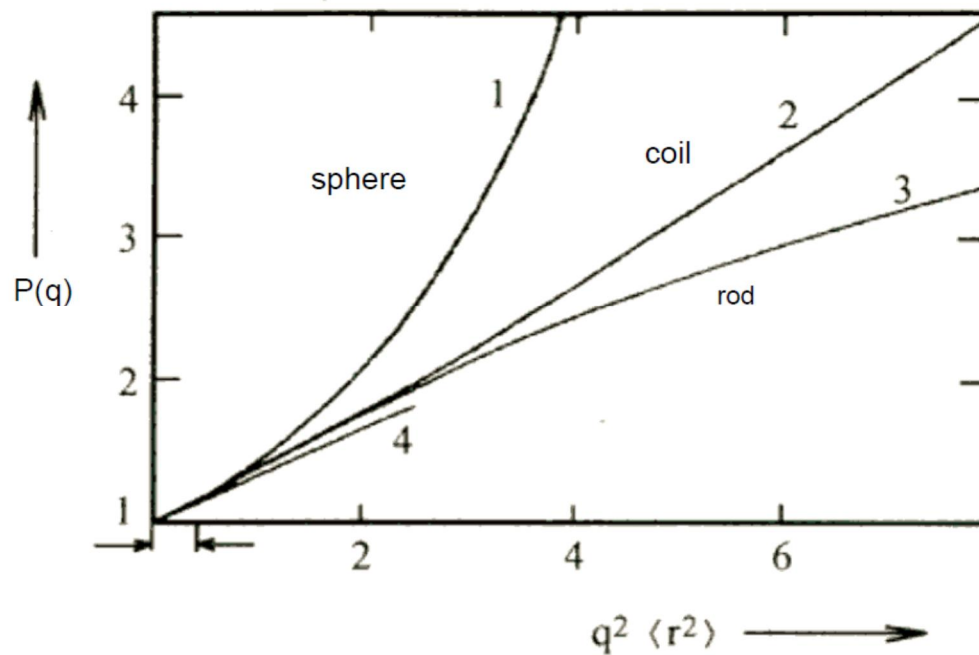


Abbildung 11: Darstellung der Änderung des Partikelformfaktors $P(q)$ für verschiedene Formen: Stäbchen (rod), Gauss Knäul (Gaussian Coil), Kugel (Sphere).

Während der Zimm Plot eine gute Linearisierung im Falle einer Knäul Struktur darstellt können Kugeln auf Grund der Aufwärtsbiegung des Formfaktors mit großem q nicht hinreichend gut beschrieben werden. Für die Streuintensität einer Kugel gilt

$$I(q) = I_0 \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (\text{Gl.4-8})$$

Wird nach der Auftragung von $\ln(1/I(q))$ gegen q^2 (Guinier Plot) ein linearer Kurvenverlauf erhalten, bestätigt dies die Existenz von Kugeln, wobei die Steigung dieser Kurve $-1/3 R_g^2$ entspricht.

Um im Allgemeinen Daten bei sehr großen q -Werten zu analysieren wählt man eine doppelte logarithmische Auftragung, d.h. $\log I(q)$ gegen $\log q$. Aus der Steigung der entsprechenden Kurven lässt sich dann die Form abschätzen. Eine Steigung von -2 entspricht dabei einem Knäul, eine Steigung von -1 einem Stäbchen. Die Steigung entspricht der fraktalen Dimension des jeweiligen Partikels [70-71].

4.1.2. Dynamische Lichtstreuung

Bei der DLS wird die Streuintensität bei einem bestimmten Winkel als Funktion der Zeit aufgenommen. Mittels eines Intensitäts-Zeit-Korrelators kann bei der DLS die durch Brown'sche-Molekularbewegung hervorgerufene zeitliche Fluktuation der Streuintensität gemessen werden. Große Partikel zeigen langsamere, kleine Partikel schnellere Brown'sche Molekularbewegung. Im Korrelator wird dabei die zu einem Zeitpunkt t detektierte Streuintensität mit der zum Zeitpunkt $(t + \tau)$ multipliziert. Durch Mittelung der sich ergebenden Produkte über die Messzeit erhält man die intensitätsgemittelte Autokorrelationsfunktion der Streuintensität (Gl.4-9, Abbildung 12).

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, \tau)I(q, t+\tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle^2} \quad (\text{Gl.4-9})$$

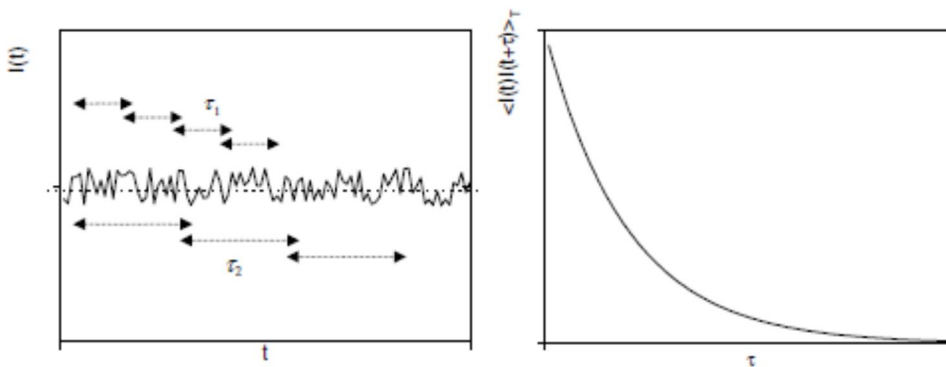


Abbildung 12: Prinzipien der dynamischen Lichtstreuung: Links sind die Intensitätsfluktuationen gezeigt, rechts die Entwicklung der Intensitäts-Autokorrelationsfunktion (ACF) [72]

Über die Siegert-Relation ist die experimentell bestimmte Intensitätskorrelationsfunktion mit der Korrelationsfunktion der Streuamplituden ($g_1(t)$) verknüpft. Es gilt bei einem festen Streuvektor q mit

$$q = \frac{4\pi n \sin(\frac{\theta}{2})}{\lambda} \quad (\text{Gl.4-10})$$

folgender Zusammenhang (Gl.4-4) [68]:

$$g_1(t) = \frac{S(q, t)}{S(q)} = \sqrt{\frac{g_2(t) - A}{A}} \quad (\text{Gl.4-11})$$

mit $S(q, t)$ dem dynamischen Strukturfaktor, $S(q)$ dem statischen Strukturfaktor und A der experimentell bestimmten Basislinie, wobei gilt $A = \langle I \rangle^2$. In der DLS wird die Intensitäts-Zeit-Korrelationsfunktion $g_1(t)$ gemessen. Für kleine, monodisperse Partikel kann diese als einfacher exponentieller Abfall beschrieben werden (Gl.4-12):

$$g_1(t) = A \cdot \exp(-t/\tau_D), \quad (\text{Gl. 4-12})$$

so dass in semilogarithmischer Auftragung die Steigung die reziproke Korrelationszeit ergibt, die über

$$\tau = 1/(q^2 D) \quad (\text{Gl.4-13})$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D und dem Streuvektor q verknüpft ist. Eine Mischung monodisperser Komponenten i unterschiedlicher hydrodynamischer Radien und damit Diffusionskoeffizienten D_i ergibt dann durch einfache Summation über alle individuellen Funktionen $g_1(t)_i$ jeder Spezies i die experimentelle Feldautokorrelationsfunktion. In halblogarithmischer Auftragung weicht diese dann mit größer werdender Zeit charakteristisch mit Aufwärtsbiegung nach größeren Werten $g_1(t)$ vom linearen Anfangsverlauf ab.

$$g_1(t)_{\text{exp}} = \sum (A_i \exp(-\frac{t}{\tau_{D,i}})) \text{ mit } \tau_{D,i} = \frac{1}{(q^2 D_i)} \quad (\text{Gl.4-14})$$

Die Amplituden A_i sind proportional dem Produkt aus Masse, Molmasse und Formfaktor.

$$g_1(t) = A * \frac{\sum m_i M_i P_i(q) \exp(-q^2 D_i t)}{\sum m_i M_i P_i(q)} \quad (\text{Gl.4-15})$$

Alternativ kann die Korrelationsfunktion über das Integral der Verteilungsfunktion $S(\Gamma)$ wie folgt beschrieben werden

$$g_1(t) = \int_0^\infty S(\Gamma) * \exp(-\Gamma * t) d\Gamma \quad (\text{Gl.4-16})$$

Das über die Anfangssteigung berechenbare z-Mittel des Diffusionskoeffizienten (Gl.4-17) kann über die Stokes-Einstein-Beziehung in das inverse z-Mittel des kugeläquivalenten hydrodynamischen Radius umgerechnet werden

$$\left[-\frac{d(\ln g_1(t))}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = q^2 \frac{\sum m_i M_i D_i}{\sum m_i M_i} \equiv q^2 D_z \quad (\text{Gl.4-17})$$

$$\frac{kT}{6\pi\eta_0 D_z} = \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} \quad (\text{Gl.4-18})$$

Gl. 4-15 lässt sich leicht entnehmen, dass das Resultat der Auswertung von $g_1(t)$ für polydisperser Teilchen größer 20 nm eine deutliche Winkelabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten erwarten lässt, führt doch die Wichtung mit dem Formfaktor auf

Grund dessen starker Abnahme mit größerem Winkel zur Abnahme erfasster größerer Anteile der Verteilung, so dass die Partikel im Mittel zu klein bestimmt werden.

Dieser Einfluß lässt sich nur ausschließen, in dem winkelabhängig gewonnene Messergebnisse des Diffusionskoeffizienten auf den Streuwinkel Null extrapoliert werden und dann der tatsächliche z-gemittelte Diffusionskoeffizient mit Gl.4-18 in den entsprechenden kugeläquivalenten hydrodynamischen Radius umgerechnet wird.

Monodisperse sphärische Partikel im Radienbereich von 200-400 nm, wie z.T. in dieser Arbeit untersucht, weisen im Messbereich der Lichtstreuung ein stark ausgeprägtes Minimum der Streuintensität auf, so dass im Gemisch mit anderen Partikeln unterschiedlicher Größe die Lichtstreuung nur bei einem einzelnen Winkel durchgeführt, zufällig ein völlig falsches Ergebnisse von Größen- und Konzentrationsverhältnissen darstellen kann.

Zudem kann nur durch die Winkelabhängigkeit der Messung die An- oder Abwesenheit auch nur geringer Anteile von größeren Aggregaten, Verunreinigungen etc. sicher und zweifelsfrei nachgewiesen werden, weshalb im Rahmen dieser Arbeit alle Messungen entsprechend durchgeführt wurden [71, 73].

4.1.3. Das ρ -Verhältnis

Das ρ -Verhältnis erlaubt anhand der experimentell bestimmten Daten aus SLS und DLS und durch Vergleich mit theoretisch berechneten Werten eine Aussage über die Geometrie von untersuchten Makromolekülen. Es ist wie folgt über das Verhältnis von Trägheitsradius R_g und hydrodynamischen Radius R_h definiert (Gl. 4-19) [74]:

$$\rho = \frac{\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}}{\left(\langle \frac{1}{R_h} \rangle_z\right)^{-1}} \quad (\text{Gl. 4-19})$$

Tabelle 2: Theoretisch berechnete ρ -Verhältnisse verschiedener Teilchengemetrien [74].

ρ -Verhältnis	Teilchengemetrie
0.775	Monodisperse harte Kugel
1	Monodisperse Hohlkugel, Vesikel
1.5	Monodisperses Gauss-Knäuel im θ -Zustand
1.78	Monodisperses Gauss-Knäuel im guten Lösungsmittel
1.73	Polydisperses Gaussknäuel im θ -Zustand
>2	Starre Stäbchen

4.1.4. Die Auswertesoftware *HDRC*

Mit der von Oliver Nirschl¹ programmierten Auswertesoftware *HDRC* werden die aus der DLS erhaltenen Ergebnisse mittels der Simplex Methode ausgewertet. Über den Simplex-Algorithmus (Downhill-Simplex) können nicht-lineare Funktionen, die von mehreren Parametern abhängen, an experimentelle Daten iterativ angepasst werden. Der Vorteil der Simplex-Methode gegenüber anderen Methoden, insbesondere gegenüber dem sehr weit verbreiteten *Marquardt-Levenberg* Algorithmus [75], liegt in ihrer außerordentlichen Robustheit [76], d.h. das Ergebnis ist weitgehend unempfindlich gegenüber der Wahl der Anfangsfitfunktionsparameter, die zur sich selbst optimierenden Anpassung in die Funktion eingesetzt werden müssen.

4.1.5. Lichtstreuung an Multikomponentensystemen

Unter Verwendung der Software *HDRC* können dynamische Lichtstreudaten von Multikomponentensystemen ausgewertet werden [21].

Man betrachtet eine Mischung aus zwei Systemen, die ihrerseits eine polydisperse Zusammensetzung aufweisen können. Die Systeme werden getrennt voneinander mittels DLS charakterisiert. Aus den Messungen der Einzelkomponenten erhält man die Fitfunktionen und damit die Parameter für die präsenten Abklingzeiten sowie deren Anteile an der Gesamtintensität innerhalb der jeweiligen Lösung. Falls beide Systeme unverändert bezüglich ihrer Komponenten koexistieren kann das Mischungssystem über eine Kombination der erhaltenen Einzelfitfunktionen beschrieben werden. Ist dies nicht der Fall und kommt es zu aggregatbildenden Wechselwirkungen zwischen den beiden Systemen, wird über eine Modifikation des Fits die Größe und Polydispersität der entstehenden Aggregate ermittelt.

Eine Mischung monodisperser Komponenten kann wie im vorherigen Abschnitt erläutert über

$$g_1(t)_{\text{exp}} = \sum(A_i \exp(-\frac{t}{\tau_{Di}})) \quad (\text{Gl.4-16})$$

beschrieben werden. Die Gesamtfunktion aller individuellen Funktionen $g_1(t)_i$ ergibt sich somit über einfache Summation. Mischt man zwei polydisperse Systeme und finden in der

¹ Oliver Nirschl, Diplomand im Arbeitskreis Prof. Dr. Manfred Schmidt, 2007

resultierenden Mischlösung keine oder vernachlässigbare Interaktionen statt, kann die ACF der Mischung $g_1(t)_m$ durch (Gl.4-20) beschrieben werden.

$$g_1(t)_m = f_a g_1(t)_a + f_b g_1(t)_b = g_1(t)_m \quad (\text{Gl.4-20})$$

Der Parameter f beschreibt hierbei den Beitrag der jeweiligen Komponente zur Gesamtamplitude der Mischung. Die Parameter a und b entsprechen den Fitfunktionen der Einzelkomponenten. Die durch *HDRC* gegebenen Parameter der jeweiligen Fitfunktion müssen dann in der Fitfunktion der Mischung konstant gesetzt werden und nur die Beiträge f der Komponenten a und b dürfen frei gefittet werden.

Zur Einschätzung der Qualität des Fits darf das Residuum der Mischungsfunktion, sowie das der Einzelkomponenten keine systematischen Abweichungen im Fitbereich aufweisen. Ergibt der Fit der Mischung über $g_1(t)_m$ systematische Abweichungen gegenüber den Rohdaten wird Gl.4-16 um eine weitere Fitkomponente ergänzt (Gl.4-21):

$$g_1(t)_{m+a} = f_a g_1(t)_a + f_b g_1(t)_b + f_c g_1(t)_c \quad (\text{Gl.4-21})$$

Alle Parameter der Funktionen $g_1(t)_{a,b}$ werden konstant gehalten, frei gefittet werden alle Amplitudenbeiträge f sowie die Funktion der zusätzlichen Komponente $g_1(t)_c$.

Aus dem mittels *HDRC* durchgeführten Fit erhält man schließlich einen Wert für die Abklingzeit und somit für den hydrodynamischen Radius der Komponente c . Auch kann aus dem Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ der Amplitudenanteil der drei Komponenten errechnet und Konzentrationsverhältnisse abgeschätzt werden.

4.2. SDS-Gelelektrophorese

Eines der gebräuchlichsten Verfahren zur Auftrennung von Proteinen ist die SDS-Gelelektrophorese. Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung großer geladener Teilchen (beispielsweise Proteine) unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes [77]. Wird angenommen, dass ein Teilchen $z \times e$ Ladungen trägt, erfährt es im elektrischen Feld E die Kraft

$$F = zeE \quad (\text{Gl.4-22})$$

Mit z der Ladungszahl und der Elementarladung e . Dieser Kraft wirkt die Reibungskraft entgegen, wobei im Gleichgewicht gilt

$$vf = zeE \quad (\text{Gl.4-23})$$

mit dem Reibungskoeffizienten f und der Wanderungsgeschwindigkeit v . Nimmt man an, dass die Teilchen eine kugelförmige Gestalt aufweisen gilt

$$v = \frac{zeE}{6\pi\eta_0 R_h} \quad (\text{Gl.4-24})$$

mit

$$f = 6\pi\eta_0 R_h \quad (\text{Gl.4-25})$$

mit η_0 der Viskosität des Lösemittels und dem hydrodynamischen Radius R_h [78]. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese hängt somit von Größe, Form und elektrischer Ladung der Moleküle ab. Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine zonale Technik. Die geladenen Makromoleküle wandern in einer Zone, der Matrix. Diese Matrix wirkt wie ein molekulares Sieb, welches die Makromoleküle nach ihrer Größe auftrennt.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird der Proteinmischung ein Schwefelsäureester des Laurylalkohols, das Natrium-Laurylsulfat (engl. Sodium dodecyl sulfate, SDS), zugesetzt. Das SDS entspricht einer amphiphilen Substanz. Es zerlegt oligomere Proteine in deren Untereinheiten und denaturiert diese. Es bilden sich Komplexe zwischen den denaturierten Proteinuntereinheiten und den SDS-Molekülen (etwa 4 g SDS/g Protein).

Die entstehenden Komplexe nehmen eine nahezu kugelförmige Gestalt an. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Komplexe ist nur noch von der Molekülmasse abhängig.

Das verwendete Polyacrylamid-Gel stellt ein dreidimensionales Netzwerk dar, das von Lösungsmittel-gefüllten porenartigen Strukturen durchzogen ist. Bei ihrer Wanderung durch das Gel kollidieren die Makromoleküle mit den Gefäßwänden der Poren. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt somit mit zunehmender Größe des Makromoleküls ab. Über einen Vergleich mit einer Mischung von Proteinen bekannter Molmasse (Marker) kann dann eine Bestimmung der Molmassen der unbekanntenen Probe erfolgen [79].

4.3. Chromatographie

Unter der Bezeichnung Chromatographie wird eine Reihe von Trennmethode zusammengefasst, mit deren Hilfe Substanzgemische über den Stoffaustausch zwischen zwei Phasen in ihre Komponenten zerlegt werden können. In dieser Arbeit werden die im Folgenden detaillierter beschriebenen chromatographischen Methoden angewendet: Gelpermeationschromatographie, Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie.

4.3.1. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Gelpermeationschromatographie (= Gelausschlusschromatographie) ist eine Relativmethode zur Bestimmung der Molmasse und Molmassenverteilung von Makromolekülen. Die Trennung erfolgt aufgrund des hydrodynamischen Volumens V_h der Substanzen, wobei der Trennmechanismus hier die Zugänglichkeit der Poren des Gels ist. Die Probe wird auf eine Säule bestehend aus porösen Kügelchen aufgetragen. Das Säulenmaterial einer wässrigen GPC besteht beispielsweise aus Dextran (Sephadex G), Agarose (Sephacrose, Bio-Gel A) oder Polyacrylamid.

Typischerweise beträgt der Durchmesser dieser Kügelchen (Poren) kann zwischen $5\mu\text{m}$ und $100\mu\text{m}$ je nach der gewünschten Trennung variiert werden. Der Konzentrationsgradient zwischen dem inneren Volumen (= Volumen der Poren) und dem äußeren Volumen (= Volumen der Zwischenräume) bildet die Triebkraft zur Diffusion der Makromoleküle in die Poren der stationären Phase.

Es können nur die kleineren Moleküle in die Poren eindringen, somit verteilen sich diese sowohl in der wässrigen Lösung innerhalb der Poren als auch in den Zwischenräumen. Die Verteilung der großen Moleküle beschränkt sich hingegen auf das wässrige Medium zwischen den Poren. Somit zeigen größere Moleküle eine geringere Verweildauer und werden zuerst eluiert.

Die Detektion der eluierten Substanzen erfolgt üblicherweise über einen RI- und einen UV/Vis-Detektor. Eine Kalibrierung kann mit Molekülen bekannter Molmasse durchgeführt werden, die sich im optimalen Fall nicht stark in ihren strukturellen Eigenschaften von den untersuchten Substanzen unterscheiden.

Das Elutionsvolumen V_e nimmt mit dem Logarithmus der Molmasse zu nach der Beziehung:

$$V_e = C_1 - C_2 * \log \quad (\text{Gl.4-26})$$

Die Konstanten C_1 und C_2 werden aus dem linearen Abschnitt der Auftragung von $\log M$ gegen V_e erhalten (Abbildung 13).

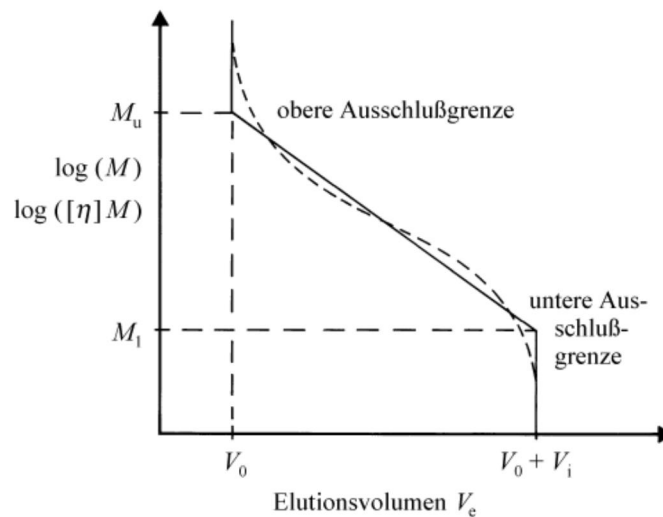


Abbildung 13: lineare Auftragung von $\log M$ gegen das Elutionsvolumen V_e [78].

Der lineare Teil umfasst den Bereich zwischen oberer und unterer Ausschlußgrenze der Säule. Die Ausschlußgrenzen können durch folgende Polynomialfunktion angenähert werden:

$$\log M = A + B * V_e + C * V_e^2 + D * V_e^3 + \dots \quad (\text{Gl.4-27})$$

Mittels einer Zweipunktkalibrierung kann aus dem linearen Teil der Kurve die Konstante C_2 nach folgender Gleichung berechnet werden.

$$C_2 = \frac{V_{e,II} - V_{e,I}}{\text{Log}\left(\frac{M_I}{M_{II}}\right)} \equiv S \quad (\text{Gl.4-28})$$

Die Konstante C_2 wird auch als Selektivitätsfaktor bezeichnet und ist charakteristisch für die jeweils verwendete Säule.

Die Abbildung zeigt, dass alle Moleküle mit einer Molmasse M größer M_u und dem zugehörigen Ausschlussvolumen $V = V_0$ gleichzeitig eluiert werden. Alle Moleküle die die Größe der oberen Ausschlussgrenze überschreiten diffundieren nicht in die Poren und werden somit simultan mit dem Fließmittel eluiert. Unterhalb der unteren Ausschlussgrenze werden alle Moleküle mit einer Molmasse M kleiner M_l und dem zugehörigen Ausschlussvolumen $V = V_0 + V_i$ gleichzeitig eluiert. Die Ausschlussgrenzen dieser Säule liegen daher bei $M = M_u$ und $M = M_l$. Eine spezifische Auftrennung kann somit nur für Moleküle mit Molmassen $M_l < M < M_u$ erfolgen [78, 80].

4.3.2. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf einer reversiblen Wechselwirkung zwischen einem Makromolekül (z.B. Protein, IgG) und dem Säulenmaterial. Durch Immobilisierung eines spezifischen Liganden (z.B. Protein A) innerhalb der chromatographischen Matrix kann diese Methode spezifiziert werden und zur Reinigung biochemischer Verbindungen, z.B. Immunglobulinen verwendet werden. Auf Grund der hohen Affinität verschiedener Biomoleküle zu spezifischen Molekülgruppen können über die Bindung von spezifischen chemischen Derivaten die wechselwirkenden Proteine von nichtgebundenen Proteinen abgetrennt werden [80].

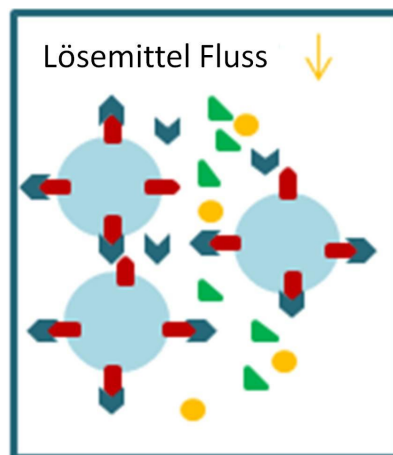


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer Affinitätschromatographie: rote Strukturen entsprechen den an das Säulenmaterial gebundenen Liganden (z.B. Protein A), woran die in blau gezeigten Substrate (z.B. IgG) binden, wohingegen andere Substanzen (grün, gelb) direkt eluiert werden.

Die Proteinmischung wird hierbei unter Bedingungen, welche die Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Liganden maximieren, auf die Säule aufgetragen. Nachdem die ungebundenen Komponenten abgewaschen wurden, können die adsorbierten

Makromoleküle durch Pufferbedingungen welche die Desorption begünstigen eluiert werden [81]. In dieser Arbeit werden zwei spezifische Affinitätschromatographien verwendet: eine Protein-A Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Immunglobulin G (IgG), sowie eine AffieBlue-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Albumin. Der Trennmechanismus der Protein A Säule besteht in einer hohen Affinität des Proteins zum kristallisierbaren Fragment des Antikörpers, der sogenannten Fc Region (engl. Crystallisable fragment). Das Binden der IgG-Moleküle erfolgt im neutralen, die Elution im sauren pH-Bereich (Abbildung 15) [82].

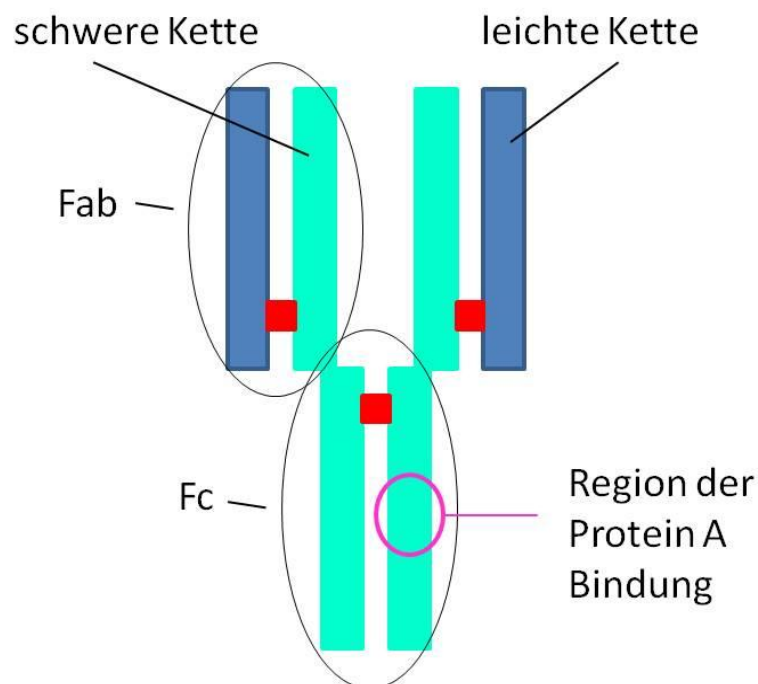


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers mit Lokalisation der Protein A Bindungsstelle.

Mittels der Affiblu Affinitätschromatographie kann Albumin isoliert werden. Der an die Säulenmatrix gebundene Ligand ist hierbei das Cibachron Blue F3G-A, welches eine hohe Bindungskapazität für Albumin aufweist [83].

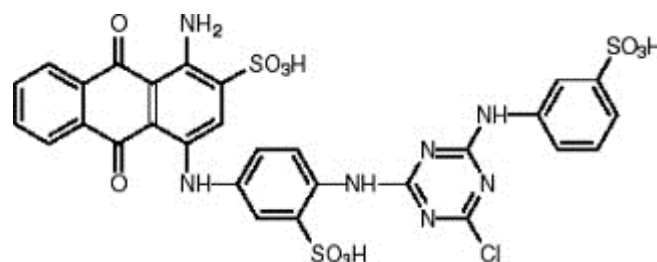


Abbildung 16: Chemische Struktur von Cibachron Blue 3FG-A

4.3.3. Ionenaustauschromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Trennung von Substanzgemischen nach der positiven oder negativen Nettoladung. Ionenaustauscher bestehen aus geladenen Gruppen, die kovalent an eine feste Matrix gebunden sind. Die Elution der gebundenen Substanzen erfolgt durch einen Salzgradienten. Verwendet man eine Säule mit negativen Gruppen (z.B. Carboxylatgruppen) können positiv geladene Proteine über eine Erhöhung der NaCl Konzentration im Elutionsmittel desorbiert werden. Hierbei konkurrieren die positiven Na⁺-Ionen mit den positiven Gruppen der Proteine. Proteine mit geringerer positiver Ladungsdichte verlassen die Säule zuerst, dann folgen diejenigen mit höherer Ladungsdichte. In dieser Arbeit wurde eine Säule zur Trennung anionischer Proteine verwendet. Die Chromatographiesäule ist hier mit positiv geladener Diethylaminocellulose (DEAE-Cellulose) bestückt [80].

4.4. UV-VIS-Spektroskopie

Bei der UV/VIS Spektrometrie werden Spektren bzw. Extinktionen im visuellen und ultravioletten Bereich erfasst. Die Geräte bestehen normalerweise aus einer Strahlungsquelle, einem Monochromator und einem Detektor. Das Messprinzip besteht in der Detektion von Absorptionsspektren, die durch Elektronenanregung in Atomen und Molekülen durch die jeweilige Lichteinstrahlung hervorgerufen werden. Die quantitative Analyse der Messungen kann dann über das LAMBERT-BEER'sche Gesetz erfolgen.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon * c * d \quad (\text{Gl.4-29})$$

Die UV/VIS Spektrometrie findet Anwendung in der Strukturanalytik, bei quantitativen Analysen sowie in kinetischen Untersuchungen [84].

4.5. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine hochempfindliche Methode zur Detektion von fluoreszierenden Molekülen in Lösung. Die Moleküle können mit elektromagnetischen Wellen aus dem UV/VIS-Bereich angeregt und damit auf höhere Energieniveaus angehoben werden. Gibt das durch Absorption eines Photons angeregte Molekül seine überschüssige Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung ab, bezeichnet man diesen Prozess als Fluoreszenz. Die Abgabe der Strahlung erfolgt innerhalb von 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁷ sec nach der Anregung der Moleküle. Die Strahlungsabgabe kann hierbei bei gleicher Wellenlänge

(Resonanz-Fluoreszenz) oder langwelliger Strahlung (Stokes'sche Regel) erfolgen. In speziellen Fällen kann die emittierte Strahlung auch energiereicher (d.h. kurzwelliger) als der Anregungsstrahl sein (Antistokes-Fluoreszenz) [85].

Die Zeitspanne in der sich das fluoreszierende Molekül im angeregten Zustand befindet, reicht aus um Wechselwirkungen mit der Umgebung einzugehen. Somit hängt das emittierte Licht neben der Molekülumgebung auch von den dynamischen Eigenschaften des Moleküls ab. Die möglichen Mechanismen der Desaktivierung eines fluoreszierenden Moleküls lassen sich anhand des Jablonski-Diagramms darstellen (Abbildung 17).

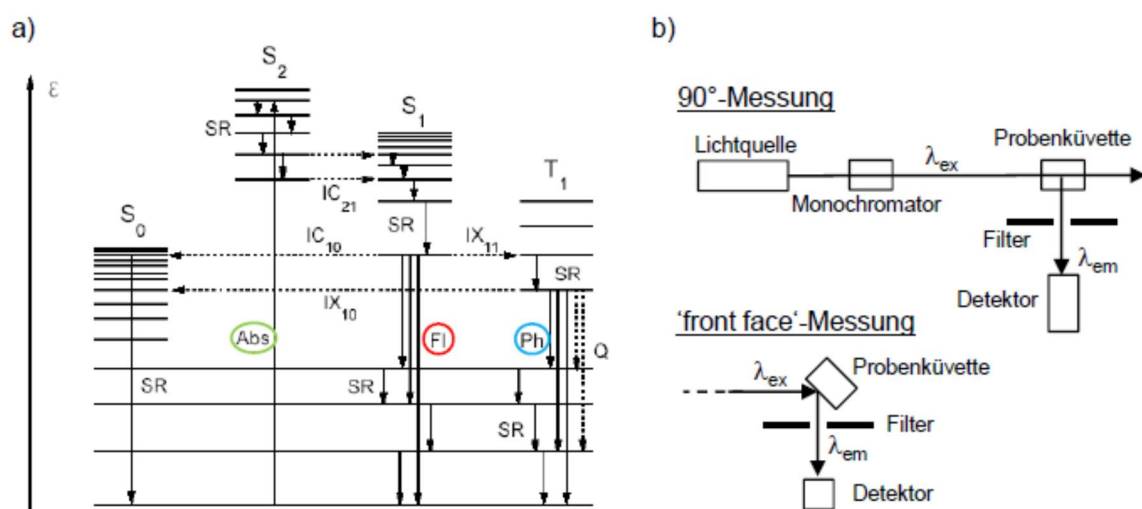


Abbildung 17: (a) Jablonski-Diagramm (Lit: Petzke), farblich hervorgehoben sind Absorption (grün), Fluoreszenz (Stokes-Linien, rot), Phosphoreszenz (blau); (b) prinzipieller Messaufbau

Der prinzipielle Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers ist in Abbildung 17b gezeigt. Es wird Licht mit Wellenlängen im UV/VIS Bereich vom Spektrometer ausgestrahlt. Durch einen Monochromator werden einzelne Wellenlängen des Anregungslichtes selektiert. Diese selektierten Wellenlängen werden anschließend durch die Probenküvette geleitet, wobei der Detektor die emittierte Fluoreszenzintensität orthogonal zur Anregung erfasst. Durch ein spezielles Filtersystem zwischen Küvette und Detektor wird das emittierte Licht von eventuell gestreutem Anregungslicht getrennt.

Mittels Fluoreszenzspektroskopie können Emissionsspektren sowie Anregungsspektren aufgenommen werden. Bei Messung eines Emissionsspektrums wird die Anregungswellenlänge im Bereich der Absorption λ_{abs} des zu untersuchenden Moleküls konstant gehalten ($\lambda_{ex} = \text{konstant}$). Hierbei wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der

detektierten Wellenlänge λ_{em} ausgewertet. Im Gegensatz hierzu wird bei der Aufnahme eines Anregungsspektrums die Wellenlänge der Detektion im Bereich des Emissionspeaks des zu untersuchenden Moleküls als konstant eingestellt ($\lambda_{em} = \text{konstant}$) und die Anregungswellenlänge variiert. Der Detektor nimmt hierbei die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge auf [86].

4.6. Cryogene Transmissionselektronenmikroskopie (CryoTEM)

Im Vergleich zu einem herkömmlichen Lichtmikroskop wird im Elektronenmikroskop anstelle einer Glühlampe ein Elektronenstrahler verwendet. Mittels des Elektronenstrahls können im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Objekte vergrößert dargestellt werden.

Bei der Cryogenen Transmissionselektronenmikroskopie (CryoTEM) werden Proben in einem Zustand gemessen, der dem in wässriger Lösung nahe kommt. Dieses Verfahren wird häufig zur Charakterisierung von biologischen Proben verwendet. Es wird dabei ein dünner Film der Probe auf ein mit Graphit beschichtetes Kupfergitter gegeben und in flüssigem Ethan oder Propan schockgefroren. Es findet dabei keine Kristallisation des Wassers statt und es bildet sich ein glasartiges Eis. Die Proben sind nun in einem Zustand der ihrer natürlichen Umgebung entspricht fixiert und können abgebildet werden.

Um die Kontrastunterschiede zwischen der Probe und dem Wasserfilm zu erhöhen wird versucht einen möglichst dünnen Film der Substanzlösung zu betrachten. [87].

5. Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die aus der dynamischen Lichtstreuung (DLS) an humanem Serum erhaltenen Ergebnisse diskutiert. Nach Beschreibung der verschiedenen Fraktionierungstechniken des humanen Serums wird die Charakterisierung der isolierten Fraktionen im Detail vorgestellt.

Die Präparation und Charakterisierung eines liposomalen siRNA Delivery Systems wird beschrieben. Die Ergebnisse der Toxizitätsstudien in 3T3 Fibroblasten werden dargestellt.

Die Methodik zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Nanopartikeln in humanem Serum wird an ausgewählten Beispielen vorgestellt. Es werden verschiedene Makromoleküle und Nanopartikel in humanem Serum untersucht und die erhaltenen Ergebnisse werden mit *in vivo* und *in vitro* Daten verglichen. Die eine Aggregation verursachenden Proteinkomponenten werden identifiziert und der Zusammenhang zwischen Proteininteraktion und Biodistribution diskutiert.

5.1. Fraktionierung und Charakterisierung von humanem Serum

Humanes Serum kann mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) charakterisiert werden [Diplomarbeit, Rausch Kristin, 2010]. Die Datenpunkte der Serumautokorrelationsfunktion können durch eine triexponentielle Fitfunktion perfekt gefittet werden, was an dem gezeigten Residuum zu erkennen ist (Abbildung 18). Wie bereits in früherer Arbeit ausführlich diskutiert [Diplomarbeit, Rausch Kristin 2010] müssen zur adäquaten Beschreibung der Feldautokorrelationsfunktion des Serums mindestens drei (mittlere) Diffusionskoeffizienten berücksichtigt werden (Gl.5-1). Jeder dieser drei Diffusionskoeffizienten entspricht einer Gruppe von Serumproteinen. Es handelt sich somit nicht um drei monodisperse Einzelfraktionen, sondern um drei Proteinmischungen die in sich eine nicht allzu große Polydispersität zeigen. Die sich ergebende Größenverteilungsfunktion entspricht damit nicht drei scharfen Peaks kann jedoch auf Grund der nur wenig überlappenden, vergleichsweise engen Einzelverteilungen der drei Größenfraktionen sehr gut (mit statistischen Residuen) durch eine triexponentielle Anpassung beschrieben werden (Abbildung 18).

Auch die Ergebnisse einer Laplace-Inversion legen die Existenz von drei diskreten Größenfraktionen nahe [Diplomarbeit, Rausch Kristin, 2010]. Der mittlere hydrodynamische Radius der Serumproben mehrerer Probanden liegt bei $R_h = 24 \pm 8$ nm und kann bei Wiederholungsmessung einer individuellen Probe in einem Genauigkeitsbereich von $\pm 12\%$ mittels DLS bestimmt werden. Diese Schwankungen gehen dabei auf Variationen innerhalb des Präparationsprozesses (z.B. Filtration) zurück. Die Größenbereiche der in Humanserum präsenten Fraktionen sind in Tabelle 3 dargestellt.

$$g_1(t) = a + b \times \exp\left(-\frac{c}{t}\right) + d \times \exp\left(-\frac{e}{t}\right) + f \times \exp\left(-\frac{g}{t}\right) \quad (\text{Gl.5-1})$$

Tabelle 3: Gemittelter hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle$ des humanen Serums verschiedener Probanden sowie zugehörige mittlere Einzelradien der drei Teilfraktionen der triexponentiellen Anpassung der Amplitudenautokorrelationsfunktion (AKF) nach (Gl. 5-1).

Radien	Größe \pm Schwankungsbreite/nm
R_{h1}	3.2 ± 0.7
R_{h2}	18 ± 5
R_{h3}	123 ± 41
$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	24 ± 8

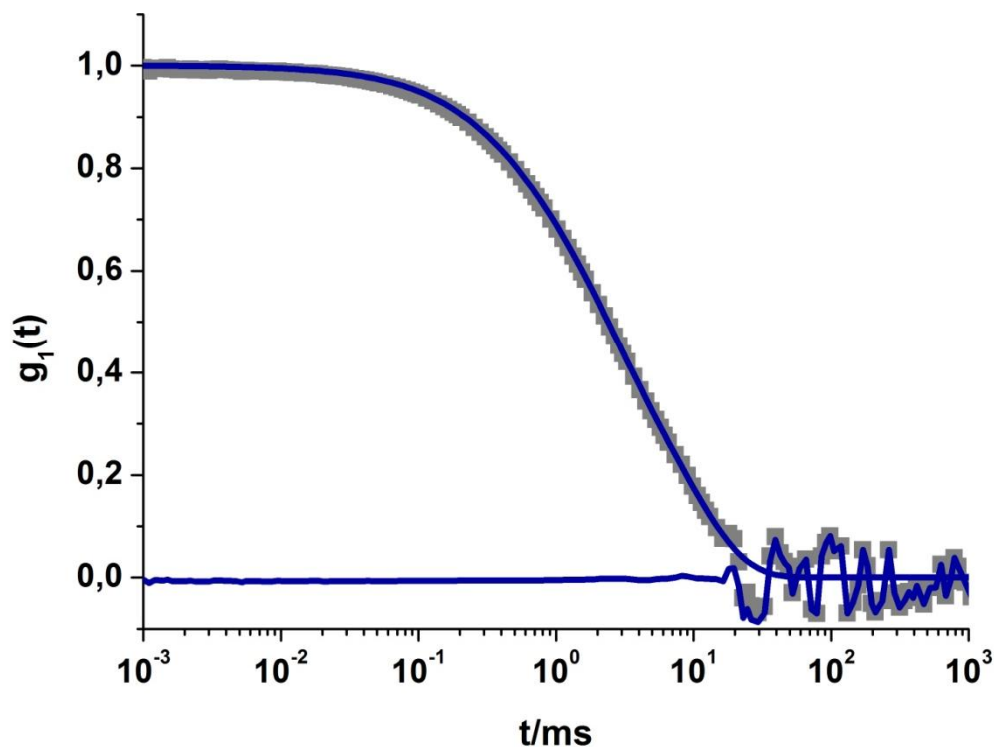


Abbildung 18: DLS an Humanserum an unverdünnter Probe: \blacksquare experimentelle AKF von reinem, originalkonzentriertem humanen Serum im Vergleich mit der $-$ triexponentiellen Anpassung und dem Residuum, Streuwinkel 30° , $T=293$ K.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Korrelation der Ergebnisse des Aggregationsverhaltens von Makromolekülen in humanem Serum mit den *in vivo* Daten (Organverteilung) in der Maus. Hierzu werden DLS Messungen an humanem Serum mit DLS Messungen in Mausserum verglichen. Es kann gezeigt werden, dass sowohl die Korrelationsfunktionen (Abbildung 19) der verschiedenen Seren übereinander liegen als auch die Größenfraktionen in humanem Serum und Mausserum im Bereich der Varianz der Messwerte individueller Probanden übereinstimmen (Tabelle 4).

Die Methode selbst liefert Genauigkeiten im Bereich eines Fehlers kleiner 10%, wie durch Wiederholungsmessungen belegt werden kann. Vergleicht man die Amplitudenanteile der einzelnen Moden fällt auf, dass sich auch diese kaum unterscheiden (Tabelle 4). Amplitudenanteile verhalten sich, wie die Streuintensität, proportional zur Konzentration gewichtet mit der Molmasse ($I \sim c \times M$) [71]. Der Anteil der kleinsten Größenfraktion ist im Mausserum etwas geringer als im humanen Serum. Diese Fraktion entspricht mit einem Radius um die 3 nm der Albuminfraktion. Der Anteil an Albumin liegt in humanem Serum bei ca. 55% [24], im Mausserum etwas niedriger bei ca. 35-50% [88].

Tabelle 4: Hydrodynamische Radien (R_h) der Größenfraktionen, sowie deren Amplitudenteile bei einem Streuwinkel von 30° (A/%) in Humanserum und Mausserum und die reziproken hydrodynamischen Radien als Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$. Alle Werte gewonnen aus der Messung an unverdünnter Probe.

	Mausserum		Humanserum	
R_{h1}	4.35 nm	A = 3%	3.4 nm	A = 10 %
R_{h2}	27.7 nm	A = 20%	23.9 nm	A = 26 %
R_{h3}	77.6 nm	A = 77%	103 nm	A = 64 %
$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	28.2 nm		22.8 nm	

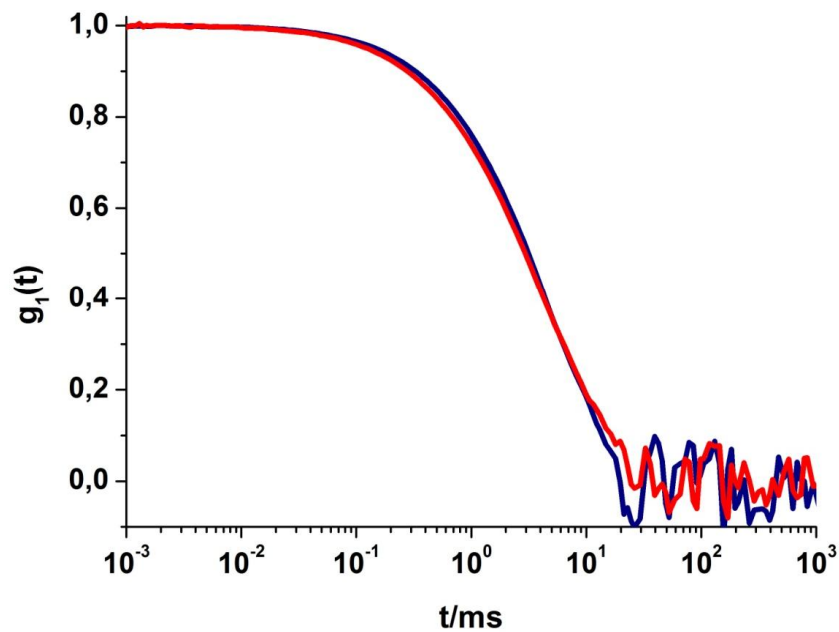


Abbildung 19: AKF von – Humanserum und – Mausserum an unverdünnten Proben , Streuwinkel 30° , $T = 293 \text{ K}$.

Der Gesamtproteingehalt des Humanserums und das Verhältnis der Proteinfractionen zueinander unterliegen einer natürlichen Varianz, die auf die unterschiedliche physiologische Konstitution der Probanden zurückgeführt werden kann (Abbildung 20).

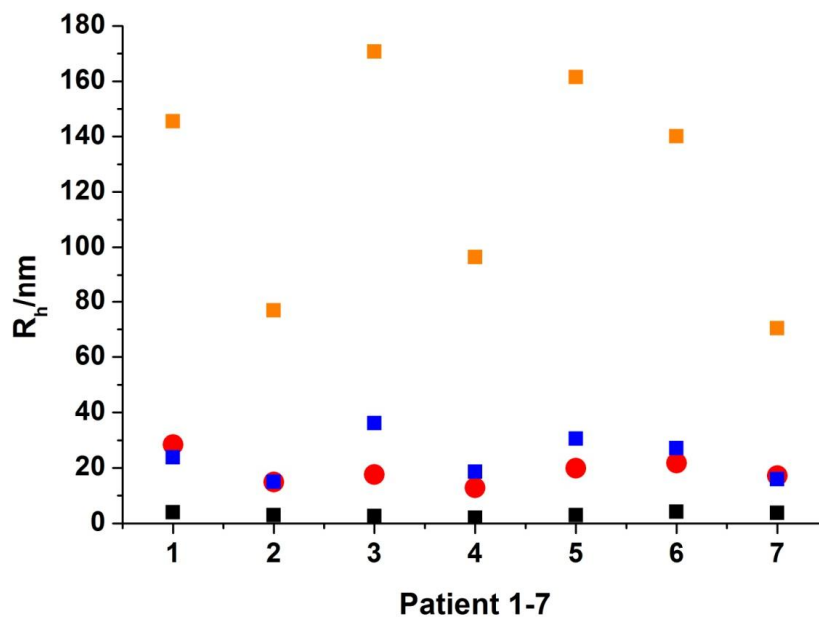


Abbildung 20: Patientenabhängigkeit der drei Größenfraktionen des humanen Serums: $\blacksquare R_h(3) = 123 \pm 41 \text{ nm}$, $\blacksquare R_h(2) = 18 \pm 5 \text{ nm}$, $\blacksquare R_h(1) = 3,2 \pm 0,7 \text{ nm}$, $\bullet \langle R_h \rangle = 24 \pm 8 \text{ nm}$.

Die kleinste der drei Größenfraktionen $R_h(1) = 3,2 \pm 0,7$ nm kann der Albuminfraktion zugeordnet werden, wobei Albumin ca. 55% [24] des gesamten Serumproteingehaltes ausmacht. Die Korrelation des größten hydrodynamischen Radius mit der Triglycerid- und Cholesterinkonzentration (Abbildung 21) zeigt einen Trend der daraufhin weist, dass es sich bei dieser Fraktion um Lipoproteine handelt, welche sich u.a. aus Triglyceriden und Cholesterin zusammensetzen (vgl. 3.1.2.3.).

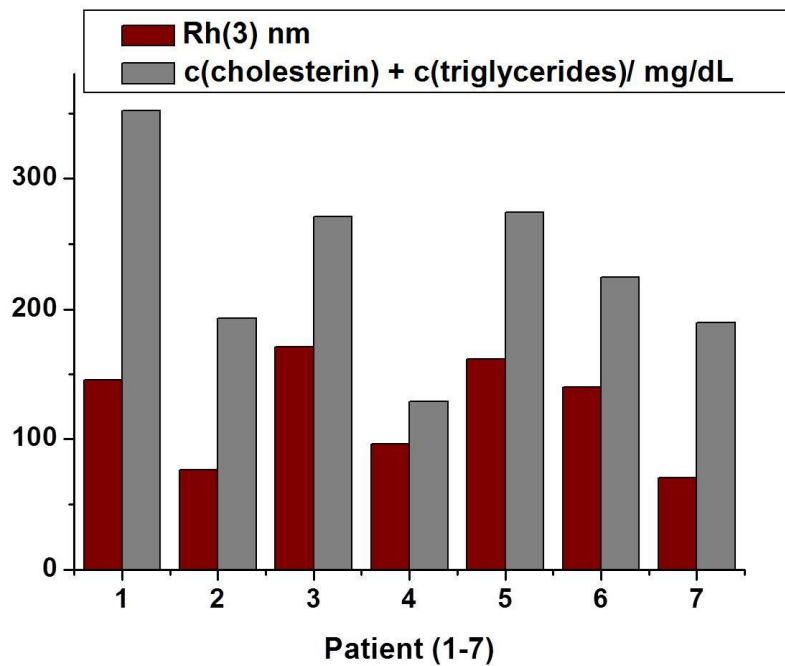


Abbildung 21: Korrelation der größten Radienfraktion des humanen Serums für 7 verschiedene Patienten mit der Triglycerid und Cholesterinkonzentration.

Der Einfluss verschiedener experimenteller Bedingungen auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des humanen Serums wird untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Anhang A dargestellt. Diese Experimente ermöglichen die Festlegung von Standardbedingungen unter denen DLS an humanem Serum durchgeführt werden kann. In Anhang A ist der Einfluss von Einfrier- und Auftauvorgängen beschrieben. Hierzu wird die Veränderung der DLS Ergebnisse sowie der Oberflächenspannung beobachtet. Es wird die Stabilität des Serums bei Verdünnung mit relevanten Pufferlösungen untersucht und das Ergebnis von Filtrationsexperimenten des humanen Serums dargestellt.

5.1.1. Fraktionierung von humanem Serum mittels chromatographischer Methoden

Um die Bestandteile der Größenfraktionen genauer zu identifizieren wird das Serum über eine Gelpermeationschromatographie (GPC) Säule wie unter 7.1.1. beschrieben fraktioniert. Das sich ergebende Elutionsdiagramm (Abbildung 22) zeigt vier Größenfraktionen, jede Fraktion wird sowohl mittels SDS-Gelelektrophorese als auch mit dynamischer Lichtstreuung charakterisiert.

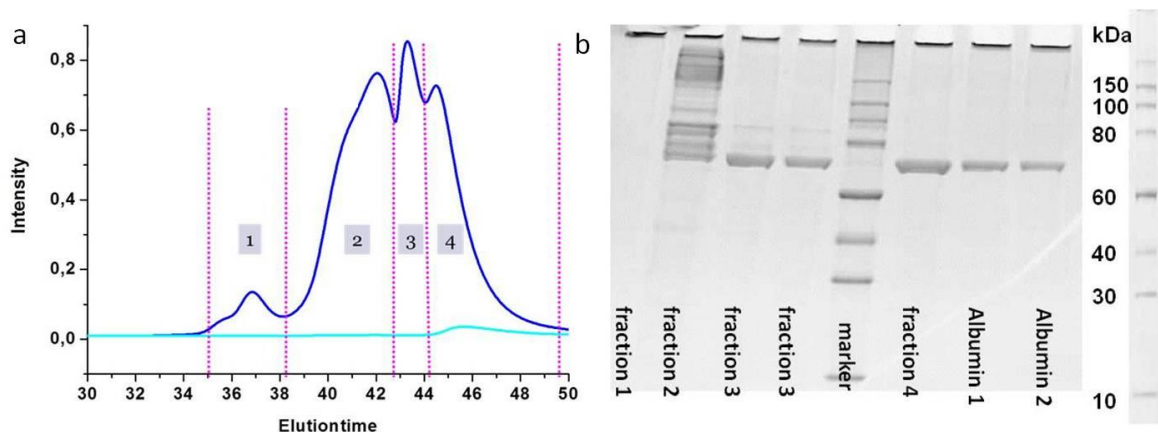


Abbildung 22: a) GPC von – humanem Serum und – humanem Albumin, SHODEX OH-Pak, 3 Säulen mit Vorsäule (SB 802.5 HQ 6 μm , 803 6 μm , 804 10 μm), Säulenmaße: 8 x 300 mm, Säulenmaterial: Polyhydroxymetharylate, 0,5 ml/min, 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH = 7,04, λ = 260 nm; T = 293 K; b) nicht-reduzierende SDS-PAGE der isolierten GPC-Einzelfraktionen und Albumin Kontrolle.

Es werden insgesamt vier Größenfraktionen aus der GPC des Humanserums erhalten, Fraktionen 3 und 4 entsprechen dem Albumin welches eine charakteristische Bande bei 66 kDa in der SDS-Page zeigt (Abbildung 22). Fraktion 2 besteht aus einer Proteinmischung von Proteinen mit einem Molekulargewicht > 60 kDa. Die größte Proteinfraktion zeigt keine Bande auf dem Gel, hierbei handelt es sich um kleinere Lipoproteine die in der herkömmlichen SDS-PAGE auf Grund ihrer biochemischen Struktur vollständig retardiert werden und somit keine charakteristische Bande ergeben. Auch hochmolekulare Serumkomponenten wie IgM (950 kDa) und Makroglobuline können dieser Fraktion zugeordnet werden. DLS Messungen an den verschiedenen Fraktionen bestätigen diese Zuordnung (Tabelle 5). Es fällt auf, dass nach GPC keine Größen über $R_h = 10$ nm gefunden werden können, dies lässt darauf schließen, dass größere Lipoproteine sowie Protein-Protein-Aggregate von der GPC-Säule auf Grund von attraktiven Wechselwirkungen zwischen der Säulenoberfläche und den Serumbestandteilen zurückgehalten werden.

Tabelle 5: DLS Ergebnisse der GPC-Fractionen aus Humanserum und Zuordnung der Fractionen zu bestimmten Proteinklassen

Fraktion	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	Serumkomponenten
1	10 nm	e.g. IgM (12.65 nm, 950 kDa), A2-Makroglobulin (9.1 nm, 760 kDa), HDL, LDL
2	5.2 nm	e.g. IgG (5.1 nm, 150 kDa), IgA (9 nm, 162 kDa), Transferrin (3.7 nm, 75 kDa)
3	4.7 nm	Transferrin, Albumin
4	3 nm	Albumin (3.6 nm, 66 kDa)

Unter Einsatz von Affinitätschromatographie in Kombination mit einer Ionenaustauschchromatographie kann eine weitere Fraktionierung der Proteinkomponenten erfolgen (vgl. 7.1.2-7.1.4). IgG kann über eine Protein-A Affinitätschromatographie Säule präparativ aus Humanserum isoliert werden.

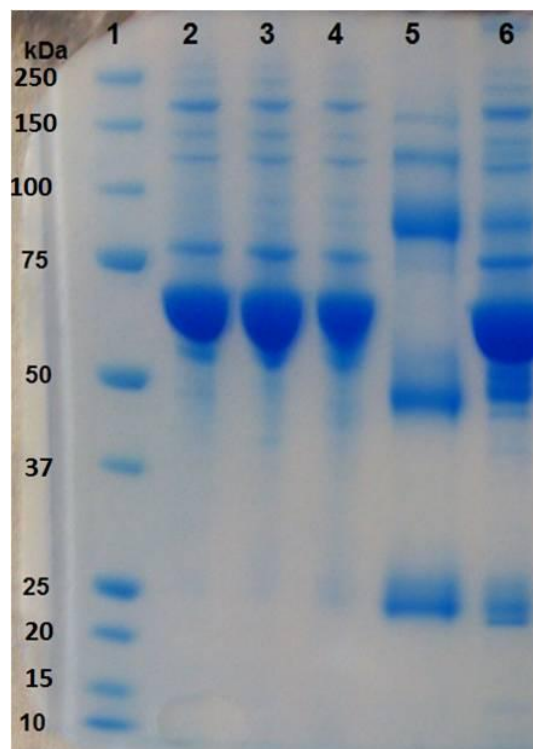


Abbildung 23: 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE (reduzierende Bedingung) nach Protein A –Säule. Es sind die Durchflussfraktionen sowie die IgG Elution aufgetragen. Tasche 1: Marker ALL Blue (Biorad), Tasche 2-4: Durchfluss (DF) 1-4 der Protein A Säule, Tasche 5: Elution der IgG-Fraktion, Tasche 6: humanes Serum; Auftragsmenge ist jeweils 10 µg Protein.

Die Durchflussfraktionen der Protein-A Säule zeigen eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 66 kDa, diese entspricht dem humanen Albumin [28].

Die Elution in Tasche 5 zeigt die für das Immunglobulin G (IgG) charakteristischen Banden. Die Bande bei ca. 25 kDa entspricht hierbei der leichten Ketten des IgG und die Bande bei 50 kDa der schweren Ketten des IgG. Es sind drei weitere Banden bei höheren Molekulargewichten zu erkennen. Die stark ausgeprägte Bande bei 80-100 kDa kann auf IgM-Moleküle [89] zurückgeführt werden. Die beiden Banden bei größeren Molekulargewichten entsprechen unvollständig reduzierten IgG oder IgM Molekülen.

Es ist anzumerken, dass kein Albumin in der Elutionsfraktion gefunden wird, dies ist dadurch zu erklären, dass Albumin keine Fc Region besitzt über welche es mit Protein-A, dem Liganden der Säule, wechselwirken kann. Allerdings ist eine Separation des IgG von IgM mit dieser Methode nicht möglich. Bezogen auf die amplifizierte Gesamtproteinmenge können 27 gew. % IgG erhalten werden. Der Literaturwert des IgG Anteils liegt für einen gesunden Erwachsenen zwischen 12- und 29 gew. % [90]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass IgG mittels der Protein-A Affinitätschromatographie fast vollständig aus dem humanen Serum entfernt werden kann. Dies bestätigt auch das Fehlen der charakteristischen IgG Banden in der SDS-PAGE des Durchflusses der Protein-A Säule (Abbildung 23). Es muss allerdings beachtet werden, dass eine Kontamination durch IgM Moleküle nicht zu vermeiden ist.

Auch in der DLS Analyse der IgG Elution kann eine leichte Kontamination festgestellt werden. Neben der IgG Fraktion mit $R_h = 6.5$ nm kann ein „slow mode“ mit $R_h = 55$ nm detektiert werden (Abbildung 24). Die Amplitudenanteile liegen für den „fast mode“ bei 75% und den „slow mode“ bei 25% bei einem Streuwinkel von 30° . Dies zeigt, dass die höhermolekularen Bestandteile, unklarer Herkunft, nur in sehr geringer Konzentration vorliegen. Eine Entfernung des „slow modes“ über Filtration mit einem Anotop Filter (Porendurchmesser 20 nm) ist möglich.

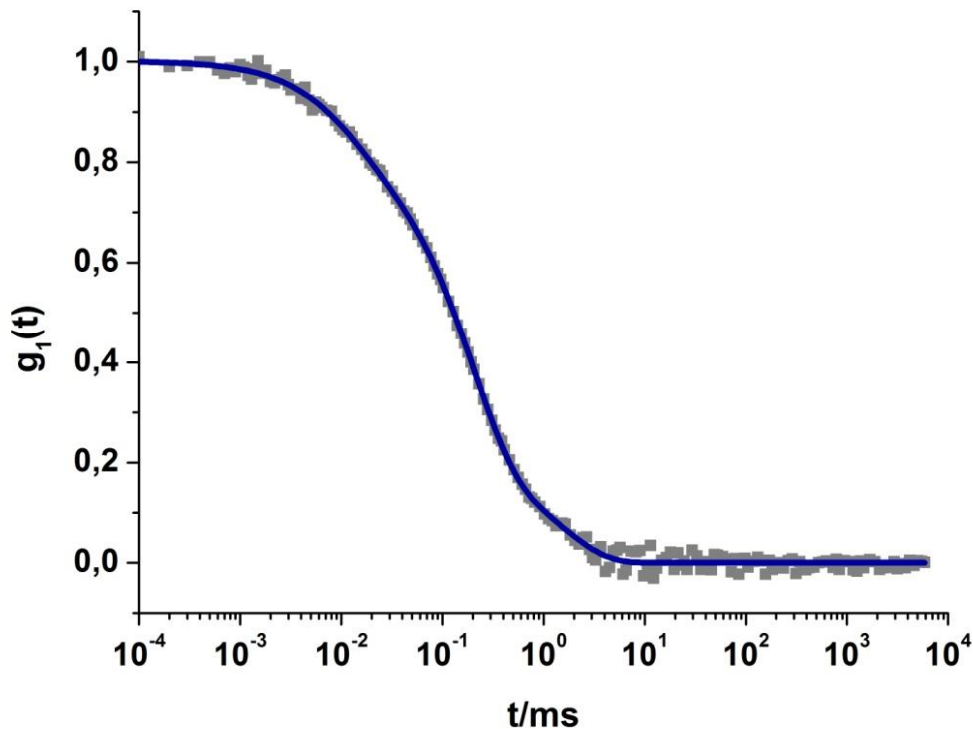


Abbildung 24: AKF der IgG Elution nach Protein A Säule, $c = 0.2$ mg/ml in DPBS Puffer, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

Albumin kann über eine Affi-Blue Affinitätschromatographie isoliert werden. Auf die Albuminsäule wird der Durchfluss der Protein A Säule aufgetragen (vgl. 7.1.3.).

Zur präparativen Isolierung von humanem Albumin wird das konzentrierte Serum zunächst auf die Protein-A Säule aufgetragen ($c_s = 59$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und das IgG wird hierbei aus der Proteinmischung entfernt. Der Durchfluss der Protein-A Säule wird dann auf die Affi-Blue Säule aufgetragen. In der Elution der Affi-Blue Säule kann humanes Albumin erhalten werden. Die Albumin Elution zeigt eine charakteristische Bande bei ca. 66 kDA. Die zusätzlich zur Albuminbande sehr schwach ausgeprägten Banden bei höheren Molekulargewichten werden hier als vernachlässigbar angesehen (Abbildung 25).

Bezogen auf die aufgetragene Gesamtmenge an humanem Albumin können ca. 47 gew. % Albumin eluiert werden. Der Literaturwert des prozentualen Anteils des Albumins am Serumproteom liegt bei ca. 55-66 gew.% [28]. Somit ist es nicht möglich Albumin vollständig über die AffiBlue Chromatographie zu entfernen. Es ist noch eine deutliche Albuminbande im Durchfluss der AffiBlue Säule zu erkennen (vgl. Tasche 4 und 5, Abbildung 25). Es ist anzunehmen, dass hier eine leichte Überladung der Säule vorlag.

Um einen möglichst Albumin freien Durchfluss zu erhalten sollte eine geringere Konzentration appliziert werden (vgl. 7.1.3.). Zur präparativen Isolierung des Albumins ist die gewählte Konzentration allerdings zu favorisieren.

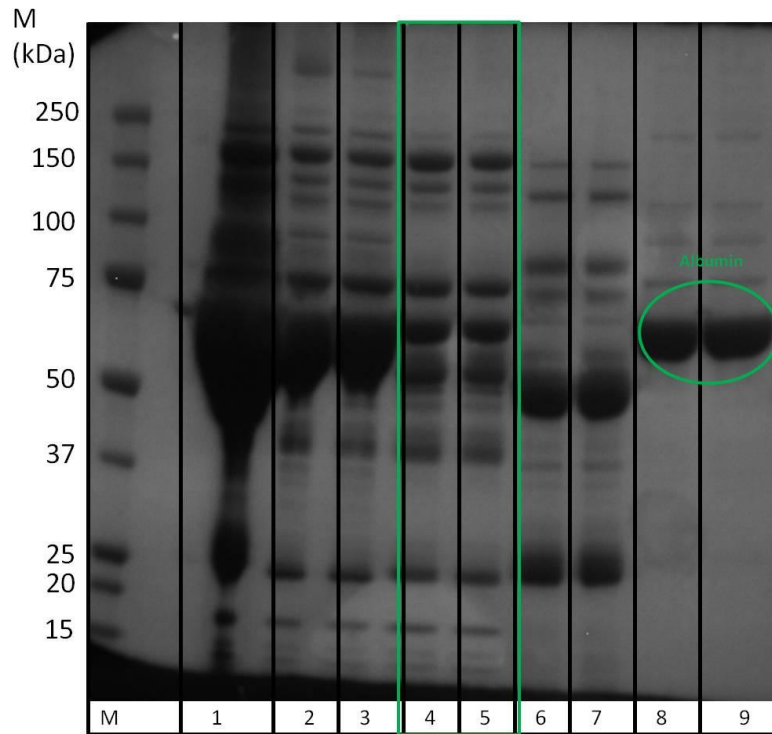


Abbildung 25: 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE nach Protein A –Säule und Affi-Blue Säule. Es sind die Durchflussfraktionen sowie die IgG Elution sowie die Albumin Elution aufgetragen. Tasche M: Marker ALL Blue (Biorad), Tasche 1: humanes Serum (Auftragungsmenge (AM) = 60 µg), Tasche 2,3: Durchfluss (DF) der Protein A Säule (AM = 10 µg), Tasche 4,5: DF Affi-Blue Säule (AM = 10 µg), Tasche 6,7: Elution der IgG-Fraktion (AM = 10 µg), Tasche 8,9: Albumin Elution (AM = 10µg).

In der DLS wird für die Albumin Elution ein hydrodynamischer Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 3.6$ nm erhalten. Die Autokorrelationsfunktion bei einem Streuwinkel von 30° ist in Abbildung 26 gezeigt. Die Autokorrelationsfunktion des Albumins kann nach Abziehen des Salzmodus durch einen monoexponentiellen Fit beschrieben werden.

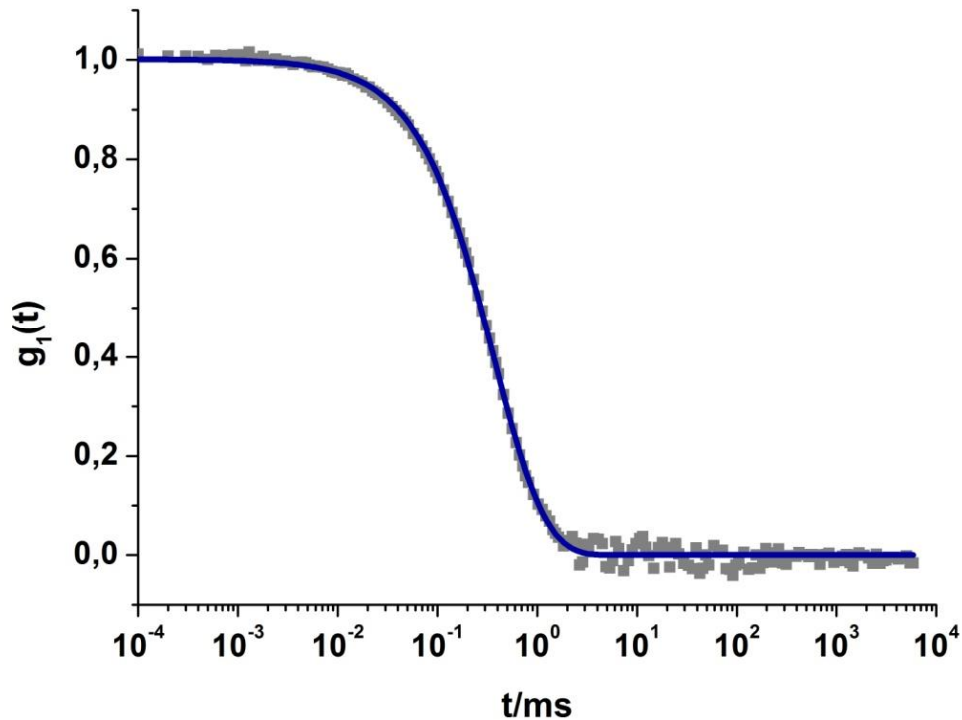


Abbildung 26: AKF der Albumin Elution nach AffiBlue Säule, $c = 0.62 \text{ mg/ml}$ in DPBS Puffer, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$.

Die Entfernung dieser beiden hochkonzentrierten Serumproteinkomponenten dient neben der präparativen Gewinnung von Albumin und IgG auch der Gewinnung einer Mischung der gering konzentrierten Serumkomponenten.

Veränderungen in der Zusammensetzung und Proteinstruktur dieser niedrig konzentrierten Komponenten, beispielsweise nach Inkubation mit verschiedenen Makromolekülen würden durch die hochkonzentrierten Bestandteile (Albumin, IgG) überdeckt und somit nicht oder nur unzulänglich detektierbar. Dies stellt eine prinzipielle Schwierigkeit der Proteombestimmung dar und erfordert sorgfältige Fraktionierung.

Über eine der Affinitätschromatographie nachgeschaltete Anionenaustauschchromatographie (vgl. 7.1.4.) können überwiegend kationische von anionischen Komponenten abgetrennt werden. Diese Mischungen können dann zur Analyse von elektrostatischen Wechselwirkungen mit nanopartikulären Systemen verwendet werden.

In der erhaltenen anionischen Proteinfraktion können alle drei Größenfraktionen des humanen Serums wiedergefunden werden: $R_{h,1} = 3.2 \text{ nm}$, $R_{h,2} = 15 \text{ nm}$, $R_{h,3} = 110 \text{ nm}$. Allerdings unterscheiden sich die Amplitudenanteile der einzelnen Moden (Tabelle 6). Die

mittlere Größenfraktion ist im anionischen Serum gegenüber dem Serum vor Fraktionierung deutlich angereichert. Auch Albumin liegt in relativ hoher Konzentration in der anionischen Proteinfraction vor, was auf dessen anionischen Charakter bei dem pH – Wert bei welchem die Chromatographie durchgeführt wird ($\text{pH} = 7.4$) zurückzuführen ist ($\text{pH}_{i,\text{Albumin}} = 5.67$). Eine genauere Identifikation der Bestandteile dieser Fraktion muss zukünftigen Versuchen vorbehalten bleiben. Diese Bestimmung kann über Massenspektrometrie und 2D-Gelelektrophorese erfolgen. Die kationische Proteinfraction kann im Durchfluss der DEAE Säule erhalten werden. Es gelang allerdings bisher nicht eine ausreichende hohe Konzentration der kationischen Proteinfraction zu isolieren. Die stark verdünnte Fraktion zeigt kaum Banden auf der SDS-PAGE und kann somit nicht als relevante Probe zur Untersuchung der Wechselwirkung mit Nanopartikeln verwendet werden (Abbildung 27).

Tabelle 6: Darstellung der Amplitudenanteile der Einzelmoden (R_h) in % (A, R_h (%)) für humanes Serum und die aus der Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Säule) erhaltene anionische Proteinfraction.

Probe	A, $R_{h,1}$ (%)	A, $R_{h,2}$ (%)	A, $R_{h,3}$ (%)
Serum	3	27	70
Anionische Proteinfraction	8.5	51	40

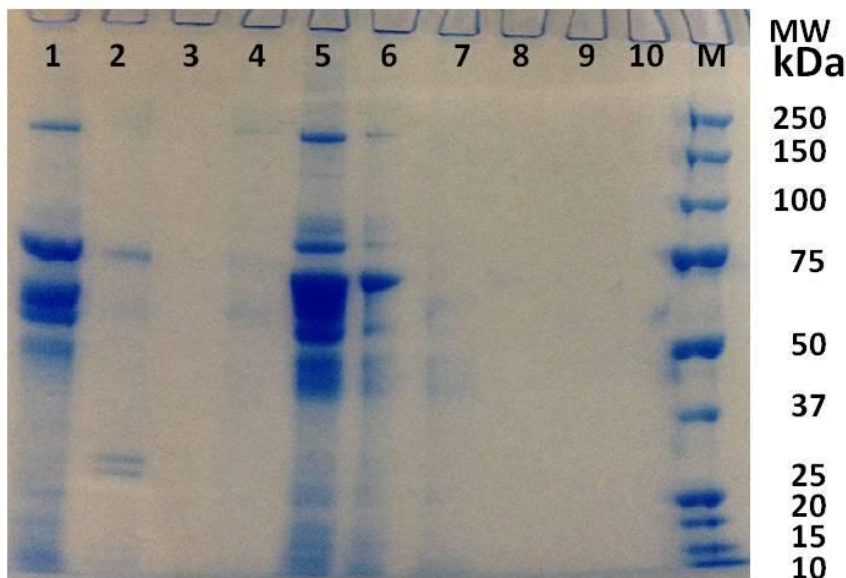


Abbildung 27: 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE nach DEAE-Säule. Tasche M: Marker ALL Blue (Biorad), Tasche 1: Durchfluss der DEAE Säule, Tasche 2: kationische Proteinfraction, Tasche 3: Waschschrift, Tasche 4-8 Elutionen der anionischen Proteinfraction, Tasche 9,10: Waschschrift.

5.1.2. Lipoproteinfraktionierung

Über sequentielle Ultrazentrifugation (vgl. 7.2.) können LDL (= low density lipoprotein) und VLDL (= very low density lipoprotein) aus humanem Plasma entfernt werden. Ebenso kann lipoprotein defizientes Plasma gewonnen werden (LDP).

Die erhaltenen Lipoproteinfraktionen werden mittels DLS charakterisiert, der hydrodynamische Radius des LDL beträgt $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 12 \text{ nm}$ und des VLDL $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 52 \text{ nm}$ (Abbildung 28). Somit liegen die Radien in dem in der Literatur beschriebenen Größenbereich ($d_{\text{LDL}} = 18\text{-}25 \text{ nm}$, $d_{\text{VLDL}} = 30\text{-}80 \text{ nm}$; vgl. 3.1.2.3.).

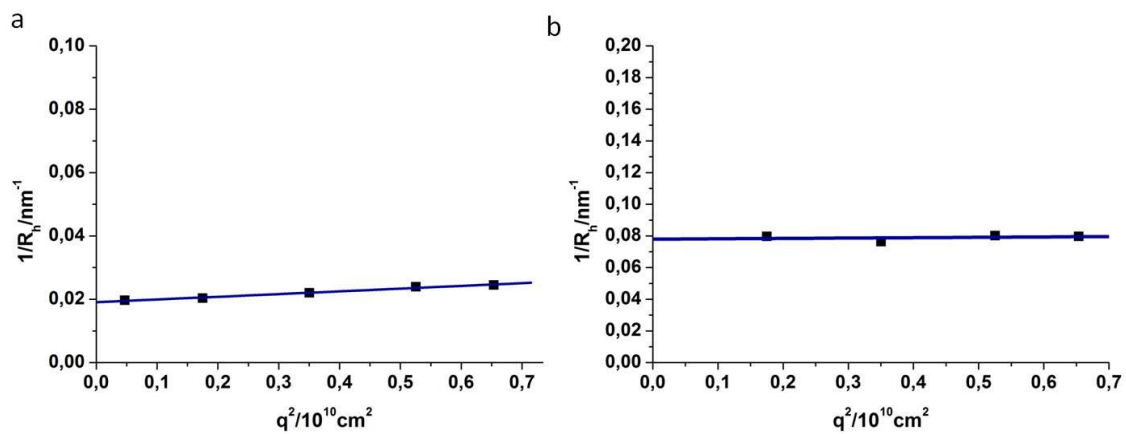


Abbildung 28: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius von (a) VLDL und (b) LDL in PBS Puffer.

5.1.3. Zusammenfassung

Die Proteinmischung des Serums kann perfekt durch eine triexponentielle Fitfunktion beschrieben werden. Die über eine Laplace-Inversion erhaltene Verteilungsfunktion legt nahe, dass es sich um drei diskrete Größenfraktionen handelt. Der mittlere hydrodynamische Radius liegt bei $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 24 \pm 8 \text{ nm}$ und kann für eine individuelle Probe in einem Genauigkeitsbereich von 12% mittels DLS bestimmt werden. Die größte Radienfraktion kann durch Korrelation mit Triglycerid- und Cholesterinkonzentration als Lipoproteinkonzentration identifiziert werden. Durch Anwendung von GPC, Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie können Serumproteine wie Albumin und IgG präparativ isoliert werden und verschiedene Proteinmischungen hergestellt werden. Mittels sequentieller Ultrazentrifugation können LDL und VLDL präparativ isoliert werden und es kann VLDL und LDL freies Plasma hergestellt werden.

5.2. Serumstabile Tensidstrukturen zum effizienten und spezifischen siRNA Transport in die Leber

Die im Rahmen einer Dissertation [Chai WY, Doktorarbeit Mainz 2012] synthetisierten und perfekt definierten kationischen Lipide (Abbildung 29) besitzen für Bindung, Transport und die zelluläre Abgabe von siRNA ideale physikochemische Eigenschaften.

Durch Stabilisierung mit Co-Lipiden (DSPC, Cholesterin) werden mittels „Injekt-Print-Technologie“ und Extrusionstechnologie Vesikel im Radienbereich zwischen 50 nm – 200 nm hergestellt und mittels DLS sowie Cryo-TEM² charakterisiert. Es werden verschiedene siRNA Beladungsstrategien auf ihre Effizienz getestet. Da die hergestellten Vesikel in späterer *in vivo* Applikation gezielt die Leber erreichen sollen, ist ihre Stabilität in murinem Blutserum von enormer Bedeutung. Eine Bedeckung der Liposomenoberfläche mit Serumproteinen könnte die Targeting Eigenschaften des Systems stark beeinflussen oder sogar aufheben. Somit handelt es sich bei diesem untersuchten System um einen typischen Kandidaten für die Analyse des Interaktionsverhaltens in humanem Serum mittels DLS.

Die präparierten Liposomen werden mit Lipidpartikeln der Firma Alnylam, Boston verglichen.

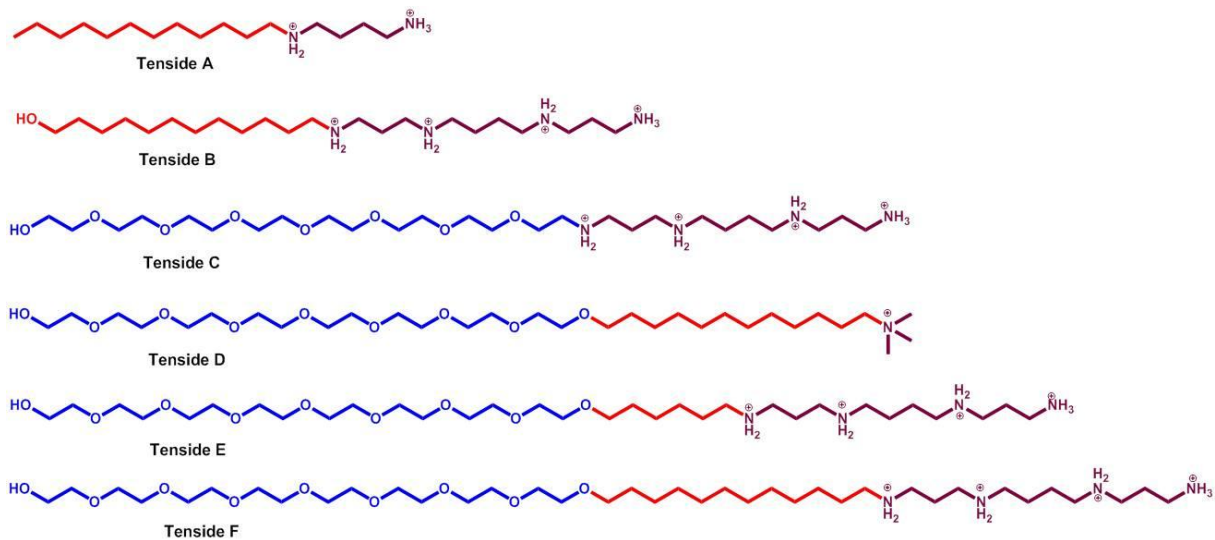


Abbildung 29: Tensidstrukturen [Chai WY, Doktorarbeit Mainz 2012]

² CryoTEM Messungen durchgeführt von Robert Branscheid, Arbeitsgruppe Dr. Ute Kolb, Johannes-Gutenberg Universität Mainz

5.2.1. Vesikelpräparation

Im Folgenden, wenn nicht anders beschrieben, werden Liposomen bestehend aus Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), Cholesterol (Chol) und dem Tensid F (TF) (Abbildung 29, Abbildung 30) diskutiert.

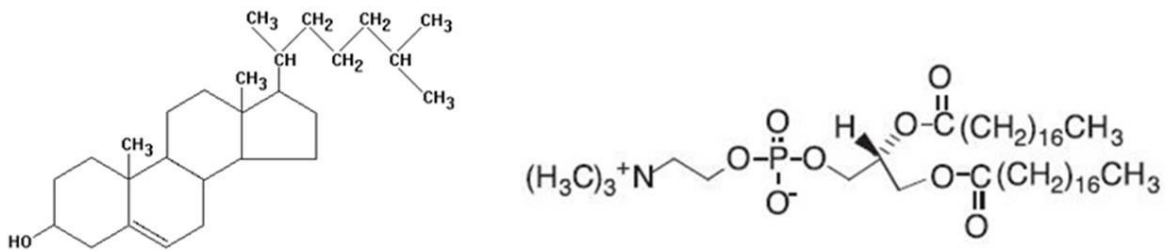


Abbildung 30: Strukturformeln von Cholesterol (links) und DSPC (rechts).

Bei der Präparation der Liposomen mittels „Injekt-Print Technologie“ (vgl. 7.8.) können Größenstrukturen von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 82 \text{ nm}$ und $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 104 \text{ nm}$ hergestellt werden (Abbildung 31). Das sich ergebende ρ -Verhältnis von $\rho = 1.3$ zeigt, dass es sich hierbei weder um eine monodisperse Hohlkugel ($\rho = 1$) noch um eine monodisperse harte Vollkugel ($\rho = 0.775$) handelt. Zudem zeigen die erhaltenen Strukturen eine relativ hohe Polydispersität, was auch an der Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius zu erkennen ist (Abbildung 31a).

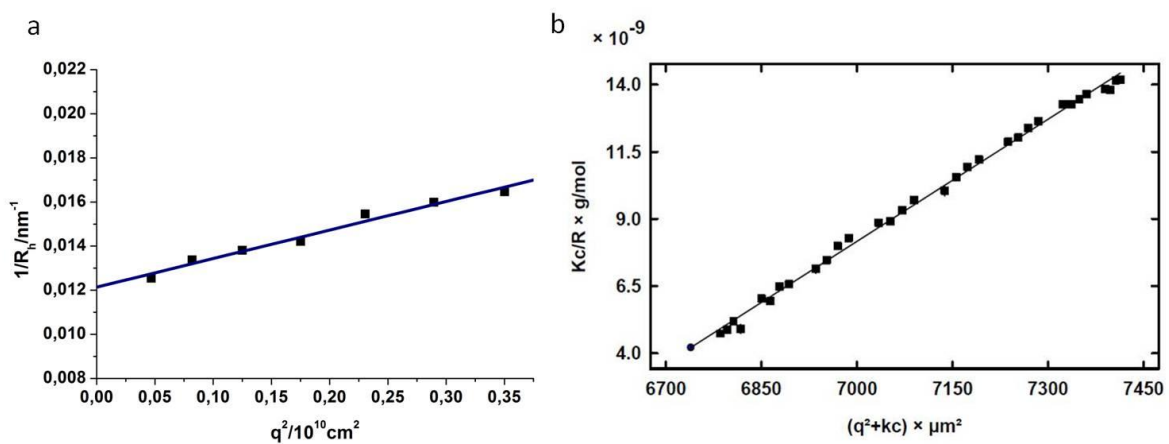


Abbildung 31: (a) Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius mit $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 82 \text{ nm}$ und (b) Zimm Analyse ($c=0.054 \text{ mg/ml}$) mit $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 104 \text{ nm}$ einer Liposomen Lösung (Gewichtsverhältnis TF:Chol: DSPC = 1:1:1), Lösemittel DPBS (Invitrogen), $(dn/dc) = 0.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293.15 \text{ K}$.

Durch Präparation der Vesikel mit der unter 7.8. beschriebenen Extrusionstechnologie können nahezu monodisperse Liposomen mit einem z-gemittelten hydrodynamischen Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 58 \text{ nm}$ und einem mittleren Trägheitsradienquadrat von $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 52 \text{ nm}$ (Zimm) bzw. $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 58 \text{ nm}$ (Berry) erhalten werden (Abbildung 32, Abbildung 33). In der in Abbildung 33a dargestellten Auftragung nach Zimm ist erkennbar, dass die Regressionsgerade systematische Abweichungen zeigt. Der nach oben leicht konkave Verlauf führt zur Sekantenbildung der berechneten Regressionsgerade. Dieses Verhalten wird durch den Einfluss des sphärischen Formfaktors des Vesikels hervorgerufen. In der Auftragung nach Berry ist diese Tendenz beseitigt, und die Messwerte fluktuieren statistisch (Abbildung 33b).

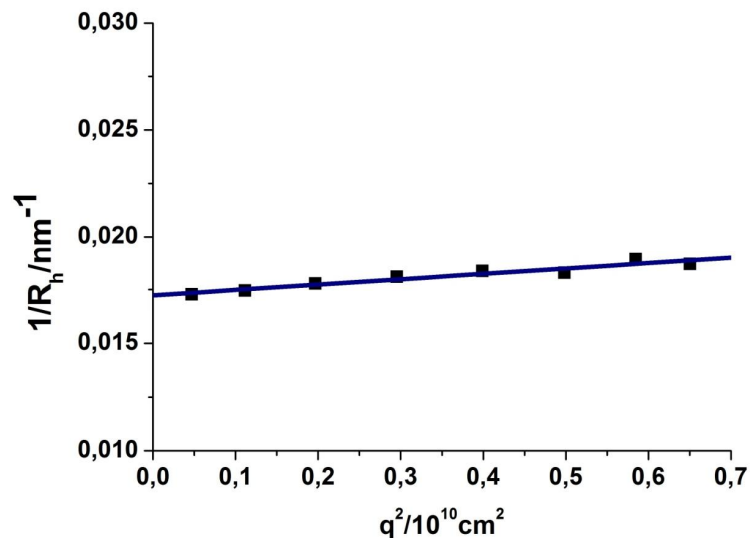


Abbildung 32: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius von einer Liposomen Lösung (TF12) mit dem Gewichtsverhältnis: TF:DSPC:Chol = 1:1:1 in PBS, $c = 0.04 \text{ mg/ml}$, $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 58 \text{ nm}$, $T = 293,15 \text{ K}$.

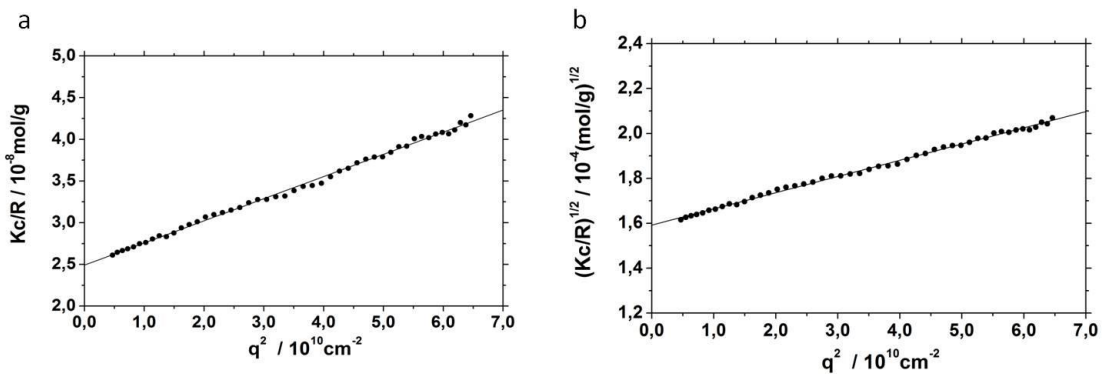


Abbildung 33: Statische Lichtstreuung an Liposomen Lösung in PBS Puffer (TF12) (a) Auswertung nach Zimm mit $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 52 \text{ nm}$, (b) Auswertung nach Berry $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 57 \text{ nm}$, $c = 0.04 \text{ mg/ml}$, $(dn/dc) = 0.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293.15 \text{ K}$.

Wie es für Vesikel erwartet wird, belegt das ρ -Verhältnis $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} / \langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ von $\rho = 0.98$ ($\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 58 \text{ nm}$, $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 57 \text{ nm}$) die Hohlkugel Struktur, was auch in CryoTEM-Aufnahmen bestätigt wird (Abbildung 34). Die leichte Abweichung dieses Wertes vom Richtwert für eine Hohlkugel ($\rho = 1$) ist durch das Verhältnis der Schalendicke zum Gesamtradius zu erklären. Mit zunehmender Schalendicke nähert sich das ρ -Verhältnis einer Hohlkugel dem einer harten Vollkugel an ($\rho = 0,775$). Es werden sowohl unilamellare als auch multilamellare Vesikel in allen untersuchten Lösungen gefunden. Es kann hierbei keine Favorisierung einer der Strukturen bewiesen werden, wobei häufiger Bilder mit einschaligen als mit mehrschaligen Liposomen erhalten werden.

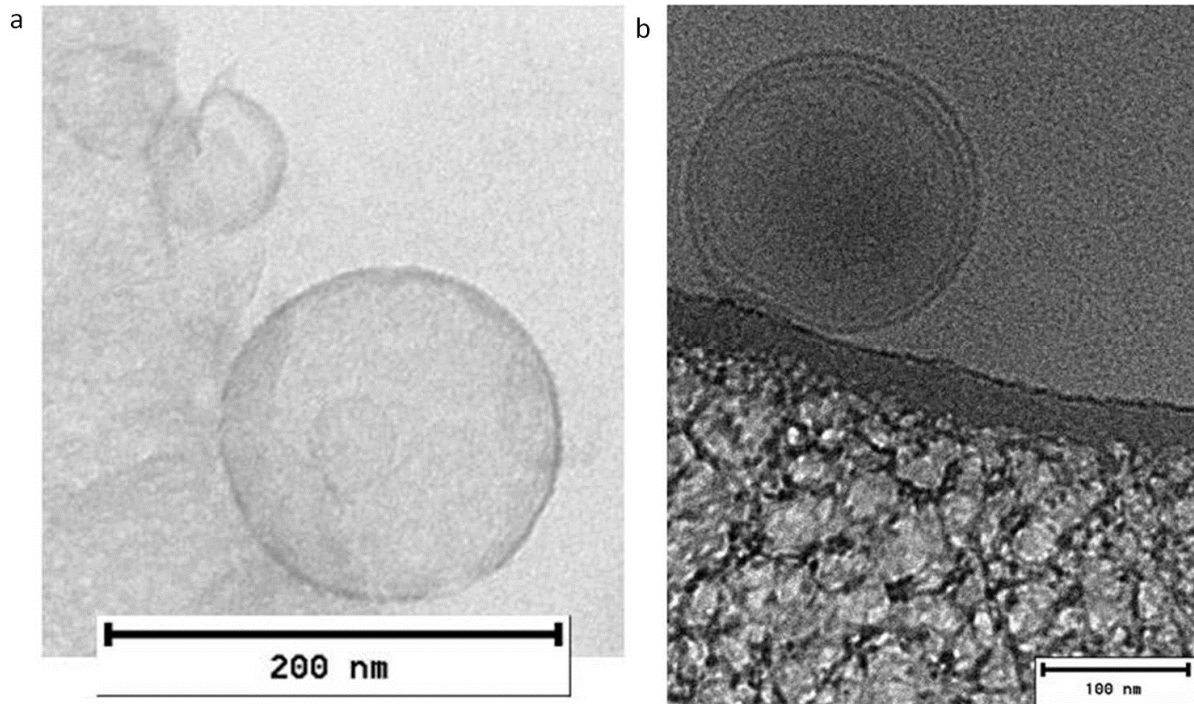


Abbildung 34: Cryo TEM-Aufnahme einer Liposomenlösung (a) Beispiel eines einschaligen und (b) eines mehrschaligen Liposoms.

Der Durchmesser in den Cryo TEM-Aufnahmen beträgt zwischen $d = 50 \text{ nm}$ bis $d = 200 \text{ nm}$ und passt somit gut zu den mittleren hydrodynamischen Radien aus der DLS. Die Schichtdicke der unilamellaren Liposomen liegt bei ca. 7.5 nm (Abbildung 35).

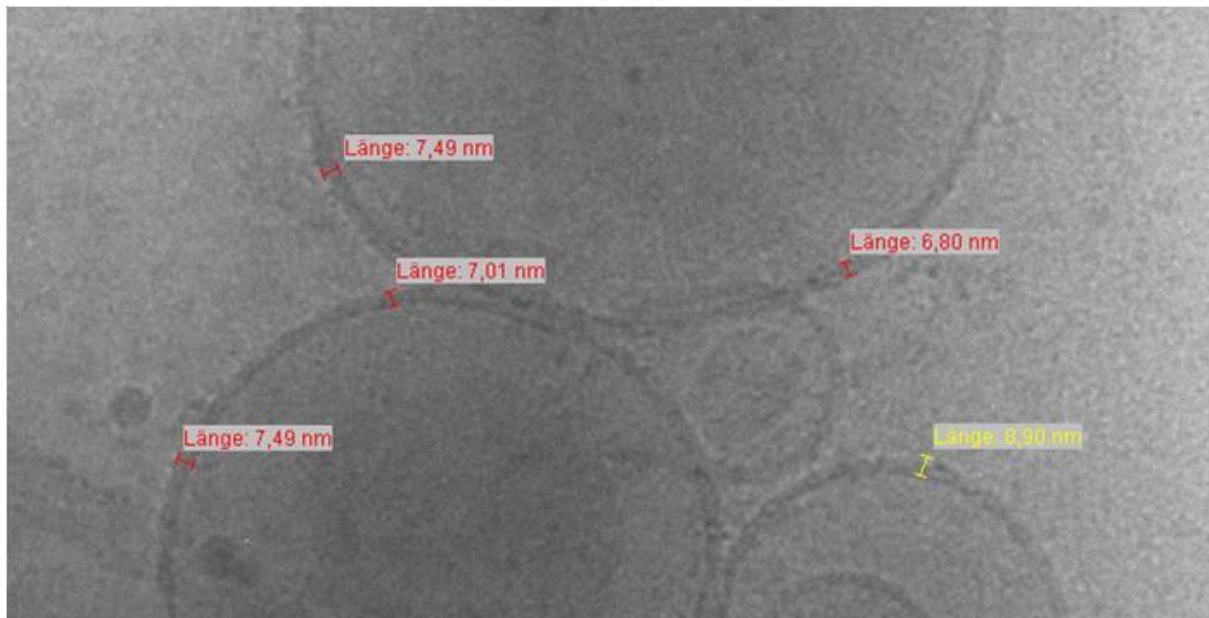


Abbildung 35: Vergrößerung einer Cryo TEM-Aufnahme einer Liposomenlösung zur Bestimmung der Schichtdicke.

Es muss zukünftigen Versuchen vorbehalten sein den Scherrateneinfluß des Extrusionsprozesses auf die Vesikelbildung und deren Membranaufbau zu untersuchen. Dies kann nur durch motorbetriebene, also maschinelle Führung des Extrusionsprozesses erfolgen. Da in den hier gezeigten Beispielen die Extrusion manuell erfolgte, war es nicht möglich immer die exakt gleichen Geschwindigkeits- und Druckparameter einzuhalten. Ein Hinweis auf den Einfluss der Scherrate auf die Liposomenstruktur konnte durch die Cryo TEM-Aufnahme einer Liposomenlösung vor Extrusion gegeben werden (Abbildung 36).

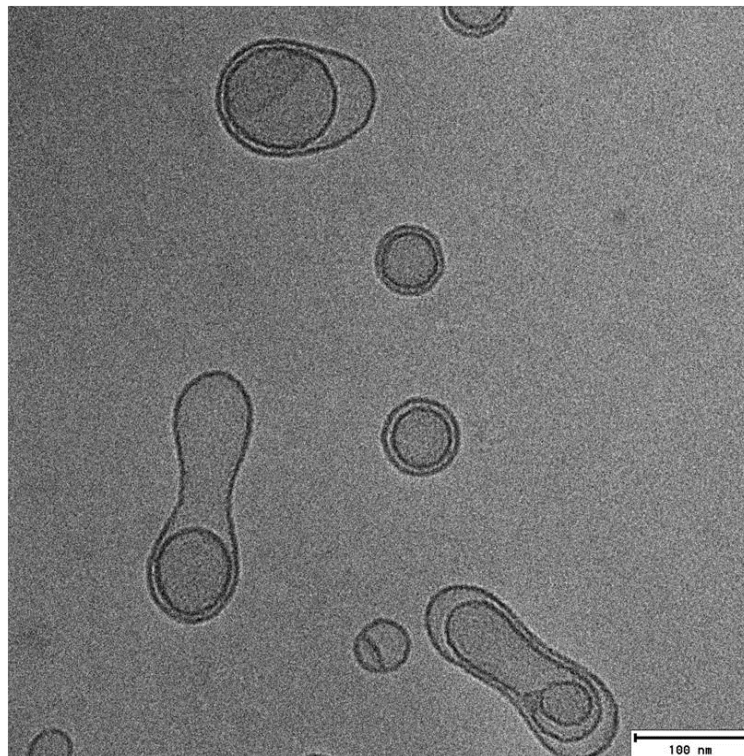


Abbildung 36: Cryo TEM-Aufnahme einer Liposomenlösung vor Extrusion.

Abbildung 36 weist daraufhin, dass sich zunächst mehrschalige Liposomen bilden, die sich dann während des Extrusionsprozesses zu einschaligen Strukturen stabilisieren. Da vor der Extrusion annähernd keine einschaligen Strukturen gefunden wurden, kann darauf geschlossen werden, dass diese erst während des Extrusionsprozesses und somit mit zunehmender Scherung entstehen.

Während der Extrusion werden die multilamellaren Liposomen bei dem Durchtritt durch die Membranporen deformiert, die Liposomenmembran bricht auf und die Liposomen lagern sich dann zu unilamellaren Strukturen zusammen. In der Literatur ist beschrieben, dass wiederholte Extrusionszyklen durch Membranen mit einem Porendurchmesser von 100 nm oder kleiner die Ausbildung unilamellarer Strukturen favorisieren [91-92].

Es werden Liposomen mit verschiedenen Gewichtsverhältnissen an DSPC, Cholesterin und TF sowie Strukturen nur aus den beiden Co-Lipiden DSPC und Cholesterin untersucht (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung und Eigenschaften der untersuchten Liposomen, mit Chol = Cholesterol, DSPC = Disteraoylphosphatidylcholin und TF = Spermin-Tensid F (vgl. Abbildung 29).

Zusammensetzung	Gewichts- verhältnis	Molares Verhältnis	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	Zeta Potential
DSPC : Chol	1 : 1	1 : 2	123 +/- 10 nm	+/- 0
DSPC : Chol : TF	1 : 1 : 1	1 : 2 : 1	60 +/- 3 nm	7.65 (+/-0.66)
DSPC : Chol : TF	1 : 1 : 6	1 : 2 : 6	77 +/- 3 nm	4.4 (+/- 1.3)
DSPC : Chol : TF	0.5 : 0.5 : 2	1 : 2 : 4	71 +/- 3 nm	
DSPC : Chol : TF	0.5 : 2 : 0.5	1 : 7 : 1	68 +/- 3 nm	

Die gemessenen Zetapotentiale entsprechen nicht dem erwarteten Ergebnis eines stark kationisch modifizierten Liposoms. Dieses Ergebnis kann möglicherweise auf einen Ladungsausgleich, hervorgerufen durch Adsorption von Gegenionen an die Liposomenoberfläche hervorgerufen werden. Der Effekt der Negativierung des Zetopotentials ist speziell für Liposomen schon häufiger in der Literatur diskutiert worden [93-95].

Je nach Zusammensetzung können Liposomen im Radienbereich von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 60-123$ nm hergestellt werden. Liposomen bestehend nur aus den Co-Lipiden Cholesterin und DSPC weisen einen größeren hydrodynamischen Radius, eine deutlich höhere Polydispersität sowie eine insgesamt schlecht definierte Struktur auf (Abbildung 37).

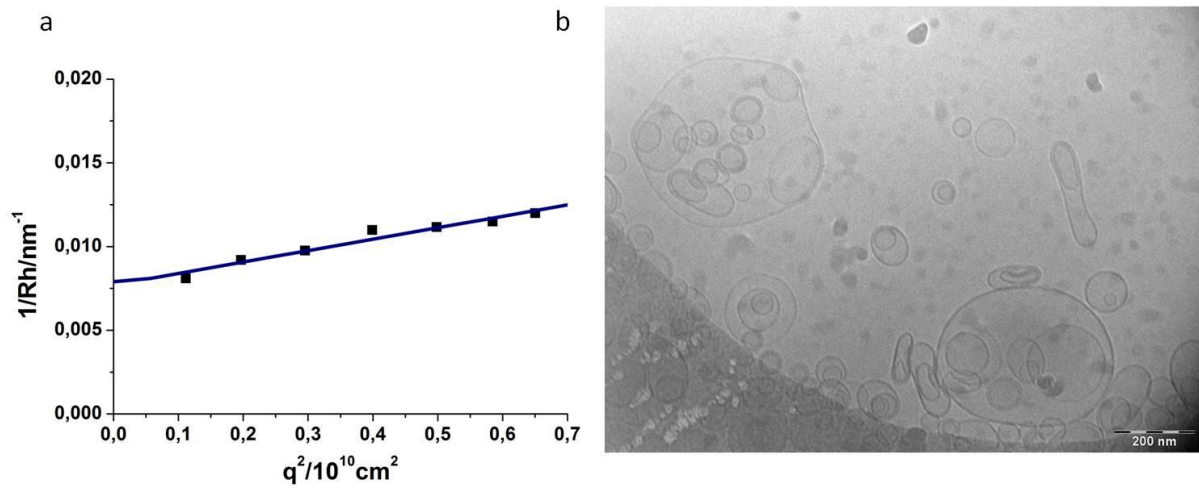


Abbildung 37: (a) Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius mit $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 123$ nm und (b) Cryo TEM Aufnahme einer Lösung von Liposomen bestehen aus Cholesterin und DSPC, Gewichtsverhältnis: DSPC : Chol = 1:1.

5.2.2. Beladung von Liposomen mit siRNA

Die Liposomen werden unter Verwendung von zwei verschiedenen Methoden mit siRNA beladen (vgl. 7.8.). Die Protokolle zur Präparation, sowie die betrachteten Mischungsverhältnisse (DSPC, Cholesterol, Spermin-Tensid, siRNA) werden in Anlehnung an die Literatur [60] modifiziert.

In Methode A wird die ethanolische Lipidmischung bestehend aus Cholesterol, DSPC und dem Spermin-Tensid F (TF, vgl. Abbildung 29) in eine DPBS-Pufferlösung, welche siRNA enthält, getropft. In der entstehenden Mischung bilden sich dann Vesikel aus. Anschließend wird Vesikelgröße sowie Monodispersität durch Extrusion eingestellt.

In Methode B werden zunächst leere Liposomen in Abwesenheit von siRNA hergestellt und erst daran anschließend wird in einem zweiten Schritt die siRNA von außen zu den bereits fertigen unilamellaren Liposomen gegeben. Das Konzentrations- und Ladungsverhältnis ($N^+/N^- = 9$) zwischen siRNA und TF sowie den Co-Lipiden wird zwischen den beiden Methoden konstant gehalten.

Die Werte der aus der DLS erhaltenen z-gemittelten hydrodynamischen Radien weisen im Genauigkeitsbereich der Methode keine Unterschiede auf (Methode A: $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 65$ nm, Methode B: $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 59$ nm), der mittlere Trägheitsradius zeigt allerdings einen signifikanten Unterschied (Methode A: $\langle 1/R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 74$ nm, Methode B: $\langle 1/R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 57$ nm (Abbildung 38).

Dieser Unterschied liegt deutlich jenseits des Messfehlers, so dass sich auch die ρ -Verhältnisse deutlich unterscheiden mit Werten von $\rho_A = 1.14$ für Methode A und $\rho_B = 0.97$ für Methode B.

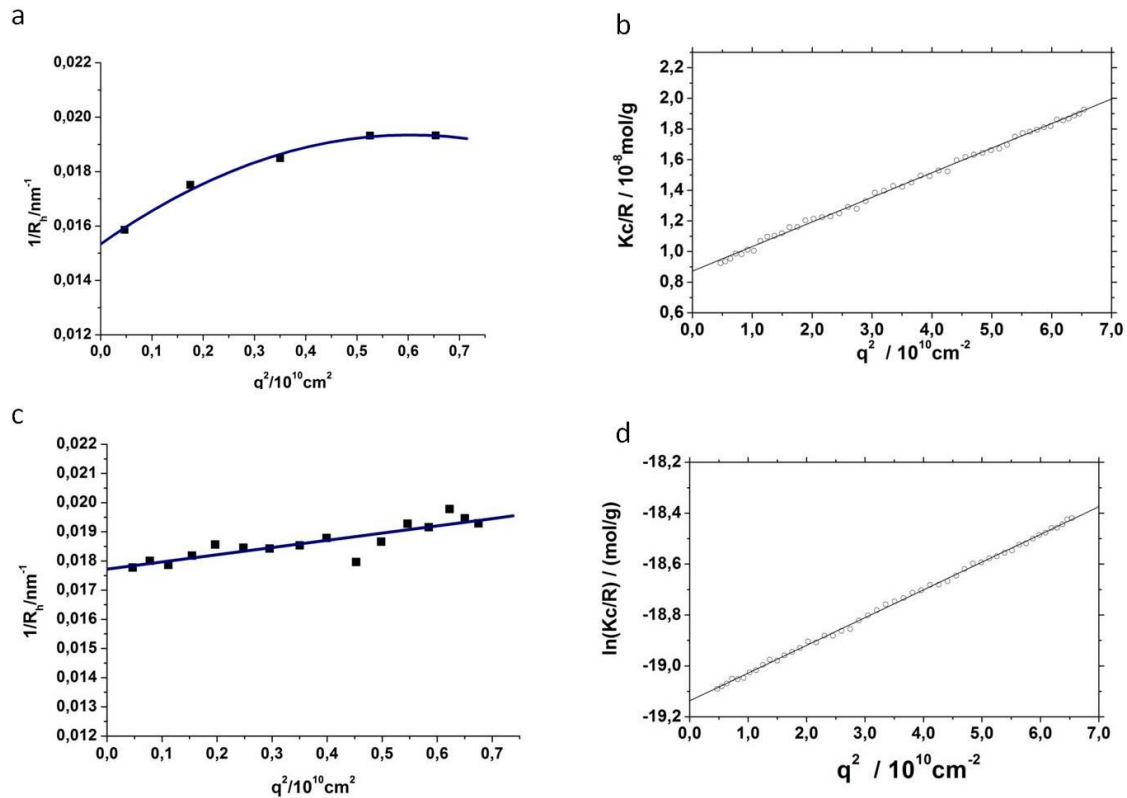


Abbildung 38: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius von Liposomen beladen mit siRNA (a) Methode A mit $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 65 \text{ nm}$ und (c) Methode B mit $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 59 \text{ nm}$; SLS Ergebnisse (b) Methode A mit $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 74 \text{ nm}$ (ZimmPlot) und (d) Methode B mit $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 57 \text{ nm}$ (Guinier Plot), $c=0.04 \text{ mg/ml}$, $(dn/dc)=0.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, $\lambda=632.8 \text{ nm}$, $T=293.15 \text{ K}$.

Methode A und B liefern zwar RNA komplexierte Liposomen im selben Größenbereich, allerdings sind die mit Methode B erhaltenen deutlich monodisperser. Diese Monodispersität findet Ausdruck darin, dass die Winkelabhängigkeit der DLS im Vergleich mit A deutlich geringer ausfällt (ca. 10% gegenüber 25% bei etwa gleicher Größe), auch kann die Winkelabhängigkeit der Liposomen nach Methode A nicht durch eine lineare Funktion beschrieben werden, es wird ein polynominaler Fit benötigt. Die nach Methode B erhaltenen Liposomen weisen auch in der Zimmauftragung einen nach oben deutlich konkaven Kurvenverlauf auf, welcher durch den Einfluss des sphärischen Formfaktors hervorgerufen wird. Dieser Verlauf kann auch in der Auftragung nach Berry nur abgeschwächt werden, so dass lediglich die halblogarithmische Auftragung nach Guinier zu einem linearen Verlauf führt und damit den exakten Trägheitsradius liefert (Abbildung 39). Methode B liefert dann auch ein ρ -Verhältnis ($\rho_B = 0.97$) das dem theoretisch erwarteten Wert einer monodispersen Probe mit Hohlkugelstruktur entspricht.

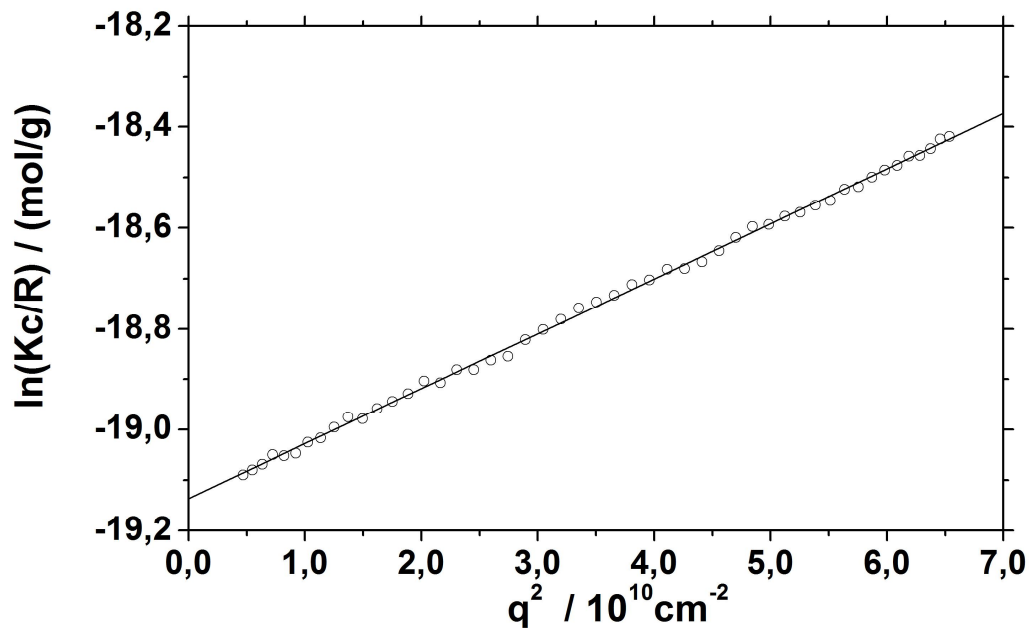


Abbildung 39: Statische Lichtstreuung an Liposomen beladen mit siRNA nach Methode B; Guinier Plot $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 57 \text{ nm}$, $c=0.04 \text{ mg/ml}$, $(dn/dc)=0.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293.15 \text{ K}$.

Das Aufbrechen der Liposomenmembran während des Extrusionsprozesses [91-92] kann in Gegenwart von siRNA zu Wechselwirkungen zwischen den negativen siRNA Molekülen und den positiven Kopfgruppen des Spermin-Tensides führen.

Entstehende Komplexe beeinflussen dann die Polydispersität des Systems. Um diese Wechselwirkungen besser einschätzen zu können müsste das Komplexierungsverhalten der Spermin-Tenside mit der siRNA isoliert untersucht werden.

Problematisch ist hierbei das unterschiedliche Lösungsverhalten der beiden Substanzen. Das Spermin-Tensid ist nur in alkoholischen Lösemitteln (EtOH, MeOH) gut löslich und bildet in wässriger Lösung undefinierte Aggregatstrukturen aus [Doktorarbeit, Chai WY, 2012]. Die siRNA hingegen ist nur in wässriger Lösung stabil.

Betrachtet man Cryo TEM Aufnahmen der mit siRNA beladenen Liposomen, werden die Ergebnisse der DLS bestätigt (Abbildung 40). Liposomen die nach Methode A mit siRNA beladen wurden weisen auch hier eine größere Polydispersität auf. Die Membraneigenschaften sind nach beiden Präparationsmethoden unverändert. Wie in

Abbildung 40a und b zu erkennen ist existieren neben den Liposomen auch weniger definierte Strukturen, die möglicherweise auf entstandene, nicht tensidisch solvatisierte Komplexe zwischen siRNA und dem Spermin-Tensid zurückgeführt werden können.

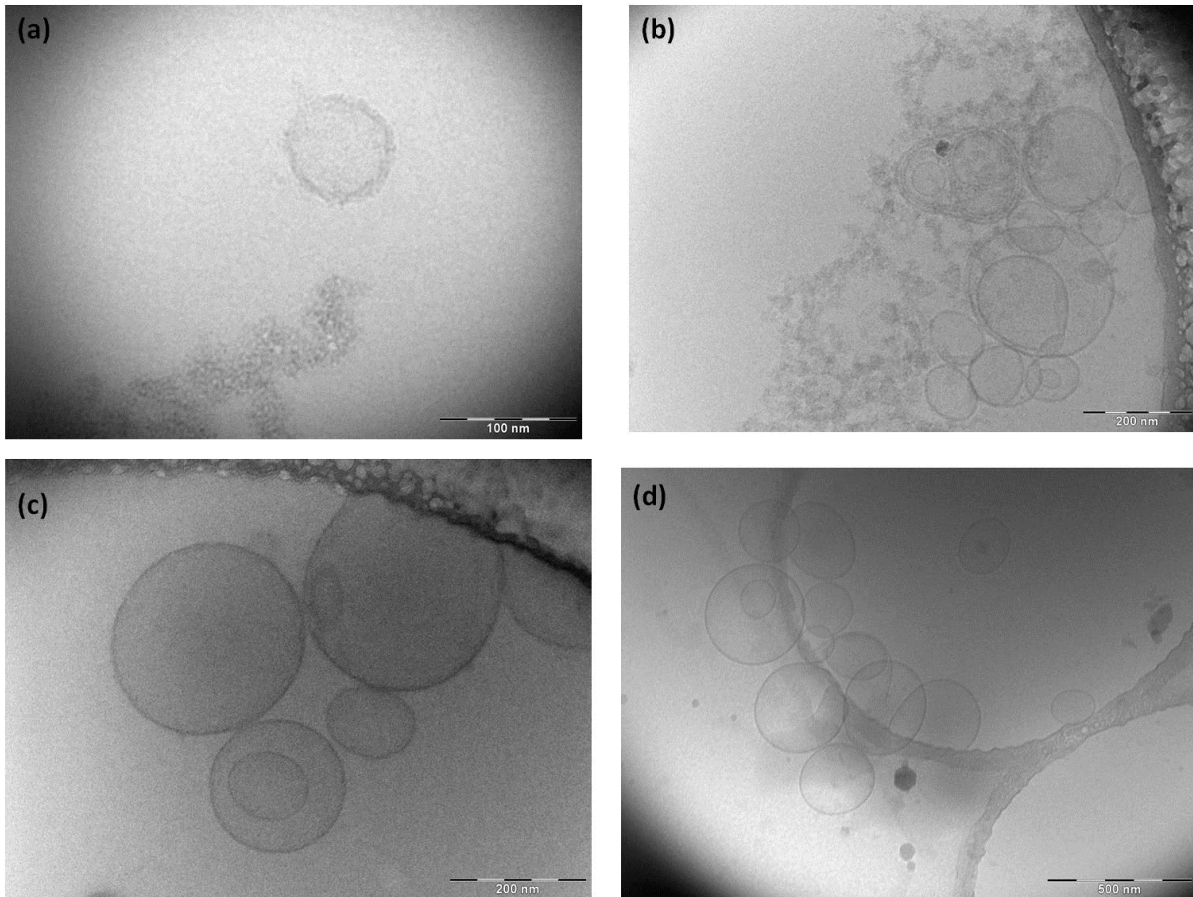


Abbildung 40: Cryo TEM Aufnahmen von Liposomen beladen mit siRNA nach (a), (b) Methode A, (c), (d) Methode B.

5.2.3. Bestimmung des Gehaltes an siRNA der Liposomenlösungen

Mittels des unter 7.9. beschriebenen Ribogreen Assays kann der Gehalt an siRNA in den Liposomenlösungen über Fluoreszenz bestimmt werden. Die für die Auswertung benötigte Kalibrierung wurde mit Lösungen verschiedener Konzentration der verwendeten siRNA erstellt.

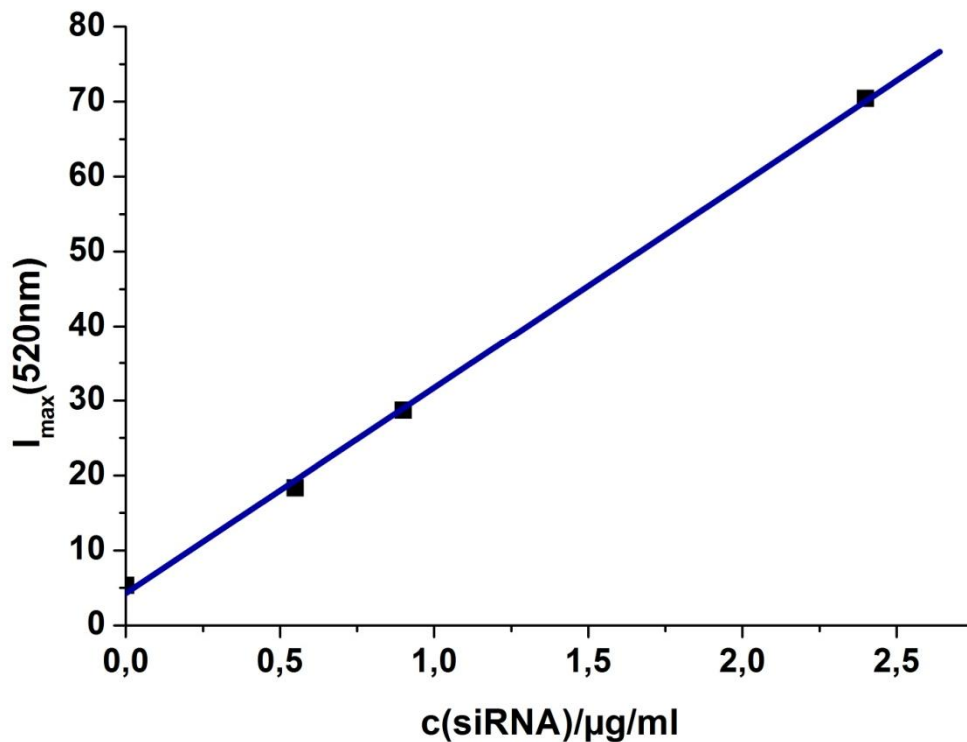


Abbildung 41: Kalibriergerade der Ribogreen Assays mit $y = 27,4 x + 4,3$ zur Bestimmung von siRNA mittels Fluoreszenzmessung

Mit Methode A können Liposomen mit einer siRNA Einkapselung von um die 70 gew. % der eingesetzten siRNA Menge hergestellt werden.

Betrachtet man die Einkapselung an siRNA von Liposomen mit Methode B bei gleicher Ausgangskonzentration an siRNA wie bei Methode A erhält man eine wesentlich geringere Komplexierung von ca. 44%.

Es wird angenommen, dass die siRNA in Methode A favorisiert im Liposomeninnenraum lokalisiert ist, wohingegen bei Methode B ein Adsorption der siRNA auf der teilweise positiven Liposomenoberfläche zu vermuten ist.

Es ist nun zu diskutieren ob es zu einer Sättigung der Liposomenoberfläche mit siRNA kommt, oder ob sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen freier und gebundener siRNA einstellt. Die höchste angesetzte Konzentration an siRNA in Methode B beträgt $c_{\text{siRNA}} = 4.8 \mu\text{g/ml}$. Geht man von dieser Konzentration aus wird eine Komplexierung von 44% erhalten. Somit beträgt die Konzentration an siRNA die frei in der Liposomenlösung vorliegt $c_{\text{siRNA, frei}} = 2.7 \mu\text{g/ml}$ und die Konzentration an gebundener siRNA bei $c_{\text{siRNA, gebunden}} = 2.1 \mu\text{g/ml}$. Geht man davon aus, dass es sich um eine Sättigung der Liposomen mit siRNA handelt ist zu erwarten, dass bei einer Anfangskonzentration von $2.1 \mu\text{g/ml}$ und konstanter Liposomenkonzentration keine bzw. zu mindestens weniger freie siRNA in der Liposomenlösung zu finden ist. Wie in

Tabelle 8 gezeigt erhält man bei einer Anfangskonzentration von $c_{\text{siRNA}} = 2.1 \mu\text{g/ml}$ ein Einkapselungseffizienz von 43% ($c_{\text{siRNA, frei}} = 1.2 \mu\text{g/ml}$; $c_{\text{siRNA, gebunden}} = 0.9 \mu\text{g/ml}$). Bei einer weiteren Erniedrigung der siRNA Startkonzentration auf $c_{\text{siRNA}} = 1.1 \mu\text{g/ml}$ wird eine erhöhte Bindung von siRNA von 60% erreicht ($c_{\text{siRNA, frei}} = 0.44 \mu\text{g/ml}$, $c_{\text{siRNA, gebunden}} = 0.66 \mu\text{g/ml}$). Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass sich ein Gleichgewicht zwischen freier siRNA und gebundener siRNA bei Beladung der Liposomen nach Methode B einstellt.

Tabelle 8: Gebundene Menge an siRNA in verschiedenen präparierten Liposomenlösungen.

Liposomen Präparation	c(siRNA)max	c(siRNA) gemessene freie siRNA in Liposomenlösung	Eingekapselter Anteil an siRNA
MethodA	4.8 $\mu\text{g/ml}$	1.4 $\mu\text{g/ml}$	71 %
MethodB	4.8 $\mu\text{g/ml}$	2.7 $\mu\text{g/ml}$	44 %
MethodB	2.1 $\mu\text{g/ml}$	1.2 $\mu\text{g/ml}$	43 %
MethodB	1.1 $\mu\text{g/ml}$	0,44 $\mu\text{g/ml}$	60 %

5.2.4. Toxizität der Liposomen in T3T-Fibroblasten

Die nach beiden Präparationsmethoden hergestellten Liposomen zeigen keine Toxizität in T3T-Fibroblasten ³. Das Ergebnis der Toxizitätsmessung wurde in drei Wiederholungsversuchen bestätigt.

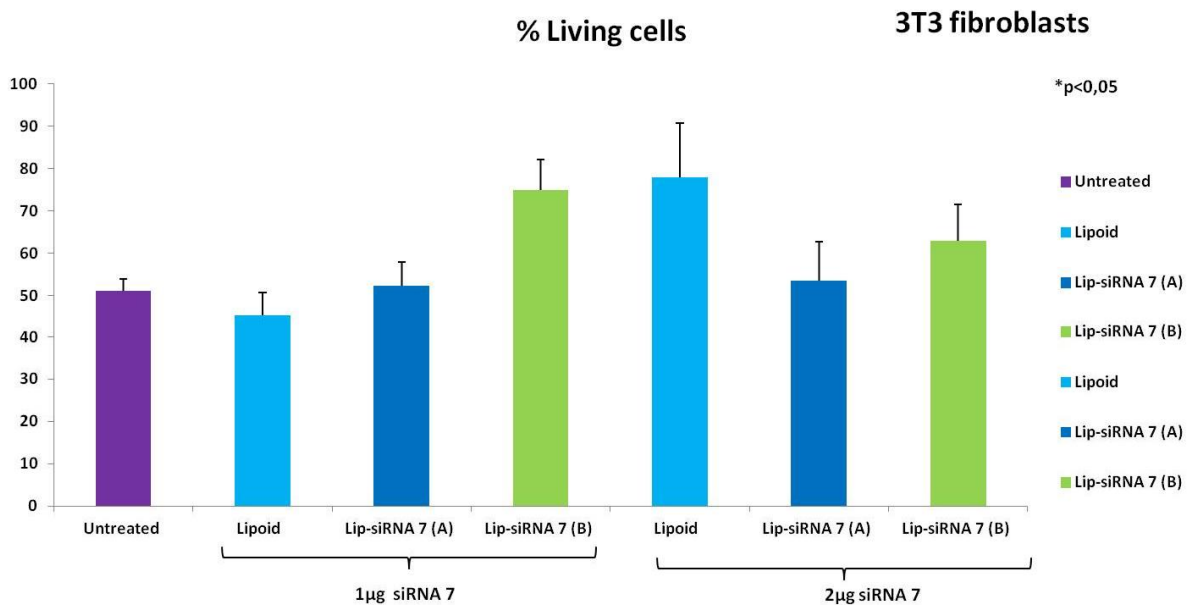


Abbildung 42: Toxizitätstest der Liposomenlösung in 3T3-Fibroblasten

³ Toxizitätstests durchgeführt von Carolina Jilmenez Calvente, AG Schuppan, Universitätsklinik Mainz

5.2.5. Physikochemische Charakterisierung von Lipidpartikeln der Firma Alnylam

In einer Kooperation der Arbeitsgruppe Schuppan mit der Firma Alnylam, Boston konnte gezeigt werden, dass Lipidpartikel (C12-200) [60] mit spezifischer siRNA nach i.v. Injektion in Mäusen mit Leberfibrose das Myofibroblasten-spezifische Prokollagen $\alpha 1(I)$ und das Makrophagen/Neutrophilen-spezifische Integrin αM Gen um 70-80 % supprimieren [Calvente C et al., Doktorandin im GRK 1043, Mainz, unveröffentlicht].

Diese Lipidpartikel werden mittels DLS, SLS und Gryo TEM charakterisiert. Die Ergebnisse der DLS der Partikel sind im Folgenden gezeigt. Es ergibt sich ein hydrodynamischer Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 97$ nm. Aus der statischen Lichtstreuung wird ein Trägheitsradius von $\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 87$ nm erhalten. Der gemessene hydrodynamische Radius weicht damit von dem in der Literatur angegebenen Durchmesser von 140 nm ab [60].

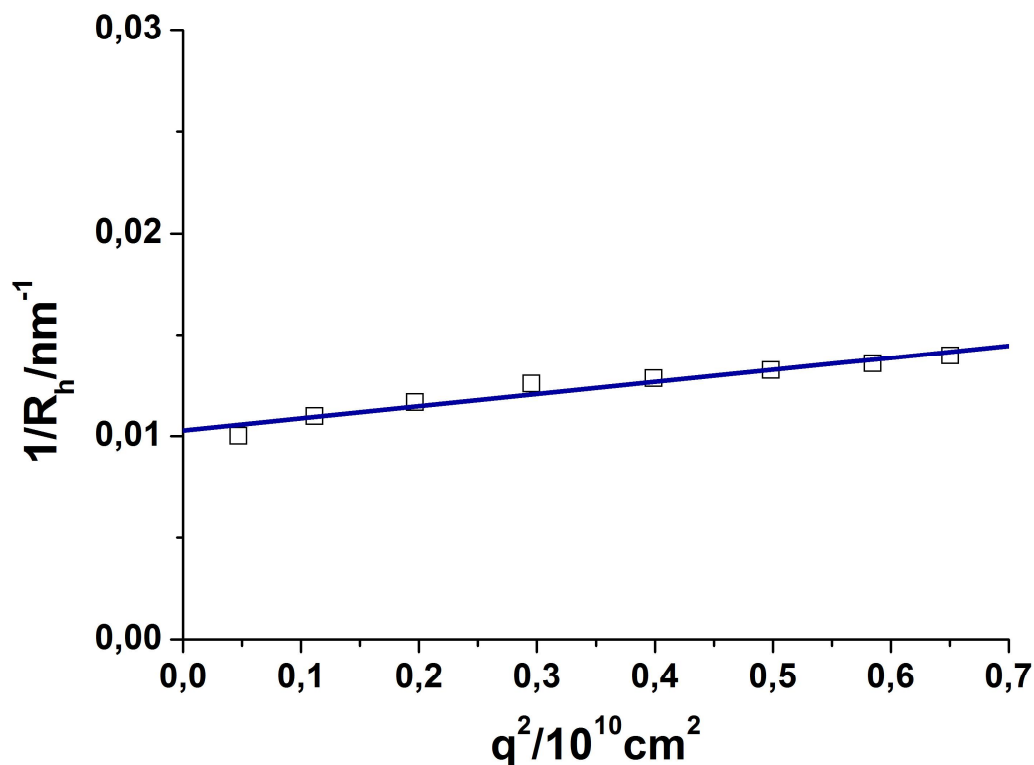


Abbildung 43: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius von Lipidpartikeln der Firma Alnylam, Boston, $c = 0.01$ mg/ml in DPBS, $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293.15$ K.

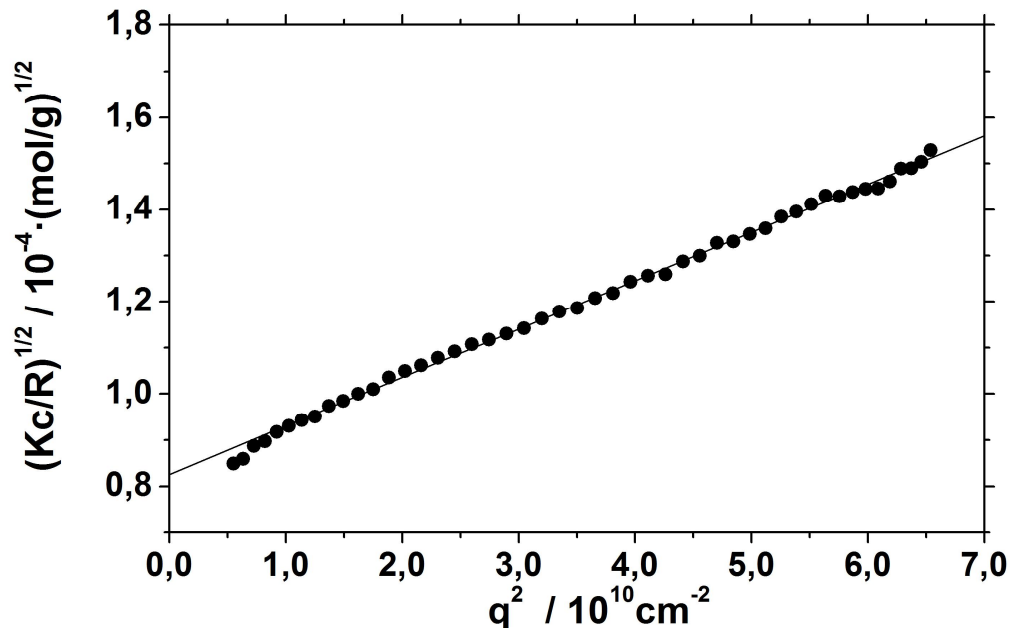


Abbildung 44: Statische Lichtstreuung an Liposomen Berry Plot $\langle Rg^2 \rangle_z^{1/2} = 87 \text{ nm}$, $c = 0.01 \text{ mg/ml}$, $(dn/dc) = 0.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293.15 \text{ K}$.

Somit ergibt sich ein ρ -Verhältnis von $\rho_{\text{CP12-200}} = 0,89$, was leicht von dem zu erwartenden Wert für eine monodisperse harte Kugel ($\rho = 0.775$) oder einer monodispersen Hohlkugel, Vesikel ($\rho = 1$) abweicht. Die leichte Abweichung dieses Wertes vom Richtwert für eine Hohlkugel ($\rho = 1$) ist durch das Verhältnis der Schalendicke zum Gesamtradius zu erklären. Mit zunehmender Schalendicke nähert sich das ρ -Verhältnis einer Hohlkugel dem einer harten Vollkugel ($\rho = 0,775$) an. In CryoTEM Aufnahmen der Lipidpartikel (CP12-200) zeigt sich eine hohe Polydispersität (Abbildung 45). Es werden keine multilamellaren Strukturen gefunden. Es ist unklar ob es sich bei den dunkleren Flecken um Einfrierartefakte oder lokal akkumulierte Partikel handelt.

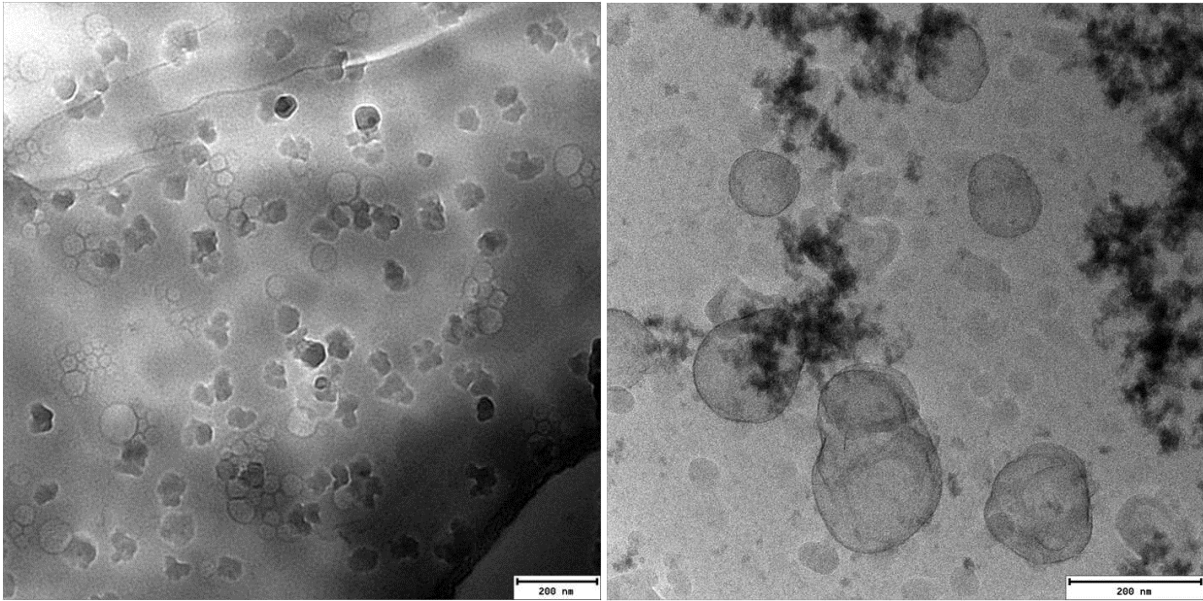


Abbildung 45: Cryo TEM Aufnahme der Lipidpartikel CP12-200 der Firma Alnylam, Boston.

5.2.5. Zusammenfassung

Es können monodisperse Liposomen im Radienbereich von $R_h = 50$ bis 140 nm über Extrusion hergestellt werden. Das ρ -Verhältnis der entstehenden Strukturen von $\rho = 1$ bestätigt die auch im Cryo-TEM sichtbare vesikuläre Struktur.

Es werden sowohl einwandige als auch doppelwandige Liposomen gebildet. Die Wanddicke einer einwandigen Vesikelmembran beträgt ca. 7 nm.

Die Liposomen können mit siRNA beladen werden, wobei die prozentuale siRNA Aufnahme je nach Präparation zwischen 40 und 75% liegt. Bei Zugabe der siRNA zu fertigen Liposomen scheint sich ein Gleichgewicht zwischen freier und komplexierter siRNA einzustellen, es handelt sich damit nicht um eine Sättigungsreaktion.

Die Liposomen sind unbeladen sowie nach Beladung mit siRNA nicht zelltoxisch.

Die hergestellten Liposomen zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu Lipidpartikel (C12-200) der Firma Alnylam, Boston. Die physikochemische Charakterisierung dieser Partikel (C12-200) liefert einen hydrodynamischen Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 97$ nm und einen Trägheitsradius von $\langle 1/R_g^2 \rangle_z^{1/2} = 114$ nm. Sowohl in der Lichtstreuung als auch im Cryo TEM zeigen die Lipidpartikel eine relativ hohe Polydispersität.

Das Aggregationsverhalten der hergestellten Liposomen in humanem Blutserum wird unter 5.3.2.1. diskutiert. Es kann gezeigt werden, dass leere Liposomen und Liposomen die nach

Methode A mit siRNA beladen werden keine Aggregation in humanem Serum zeigen, wohingegen Liposomen präpariert nach Methode B stark aggregieren ($R_{h,Agg} = 1\mu\text{m}$) (Abbildung 54, Abbildung 55). Liposomen die nach Methode A mit siRNA beladen werden zeigen gegenüber B in der DLS sowie in Cryo TEM-Aufnahmen eine größere Polydispersität.

In zukünftigen Experimenten werden die hergestellten Liposomen bezüglich ihrer Knockdown Effizienz auf Prokollagen Typ I (hepatische Sternzellen, Myofibroblasten) und Faktor VII (Hepatozyten) in *in vitro* sowie in *in vivo* Experimenten untersucht. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Leberzirrhose.

Die aus zukünftigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse können dann mit den in dieser Arbeit dargestellten strukturellen Vorversuchen korreliert werden und der Herstellungsprozess kann dann bezogen auf die finale Applikation abgestimmt werden. Eine mögliche zusätzliche Funktionalisierung der Liposomenoberfläche, beispielsweise mit Mannose-6-Phosphat kann dann ein Targeting zu speziellen Leberzellen bewirken. Hierdurch wird es möglich gezielt die Leberzellen zu adressieren, welche die stark ausgeprägte Akkumulation der extrazellulären Matrix verursachen.

5.3. Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Makromolekülen und Nanopartikeln in humanem Serum

Verschiedene Beispiele einiger Hauptklassen polymerer Wirkstoffsysteme werden hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum untersucht:

=> polystyrolbasierte Nanokapseln unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung

=> hydroxypropylmethacrylamid (HPMA) basierte amphiphile Copolymere

=> kationische Nanohydrogele aus vernetzten Polymethacrylamiden als siRNA Transporter

=> verschiedene liposomale Formulierungen

=> Eisenoxidpartikel

=> Dextranpartikel

=> Polybetaine als zwitterionische Polyampholyte

=> kationische zylindrische Polymerbürsten zur DNA Transfektion

Die Ergebnisse der DLS Analyse der untersuchten Systeme werden präsentiert, es wird auf die Korrelation zwischen Aggregationsverhalten und *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften eingegangen. Diskutiert wird ferner die Beziehung zwischen Protein und Polymer/Nanopartikel Interaktion in Abhängigkeit deren chemischer, konstitutiver und topologischer Struktureigenschaften.

5.3.1. Untersuchung des Aggregationsverhaltens oberflächenmodifizierter Polystyrolpartikel in humanem Serum

Es werden die in der folgenden Tabelle angeführten Polystyrolpartikel (PS-Partikel) mittels DLS charakterisiert und bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum untersucht. Alle Partikel werden bezüglich ihrer Organverteilung in der Maus untersucht und es werden Ergebnisse von LC-MS Studien zur Proteinadsorption durchgeführt. Zunächst werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen separiert vorgestellt und im Anschluss vergleichend diskutiert.

Die Polystyrolpartikel wurden mittels der direkten Miniemulsionstechnik wie in der Literatur [96] beschrieben synthetisiert. Die Synthese, sowie die über die DLS hinausgehende Charakterisierung wurde von Grit Baier⁴ durchgeführt. Die Strukturformeln der verwendeten Tenside sind in Abbildung 46 dargestellt.



Abbildung 46: Strukturformeln der verwendeten Tenside (von links: sodium dodecyl sulfate (SDS), rechts: Lutensol AT50 (LAT50)).

Tabelle 9: Klassifizierung und Bezeichnung der untersuchten PS-Partikel^x.

Probe	Funktio- nelle Gruppe	Gruppen pro nm ²	Tensid	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ /nm	μ_2	Zetapotential, mV (pH 7.4)
PS-LUT	-	-	LAT 50	96	0.058	-9
PS-LUT- COOH	COOH	0.6	LAT 50	81	0.057	-29
PS-LUT- NH ₂	NH ₃ ⁺	0.1	LAT 50	89	0.049	4
PS-SDS	SO ₃ ⁻	-	SDS	170	0.14	-37

x mit: PS = Polystyrol, SDS = sodium dodecyl sulfate, LAT 50 = Lutensol 50 AT

⁴ Grit Baier, Arbeitskreis Prof. Dr. Landfester, Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz

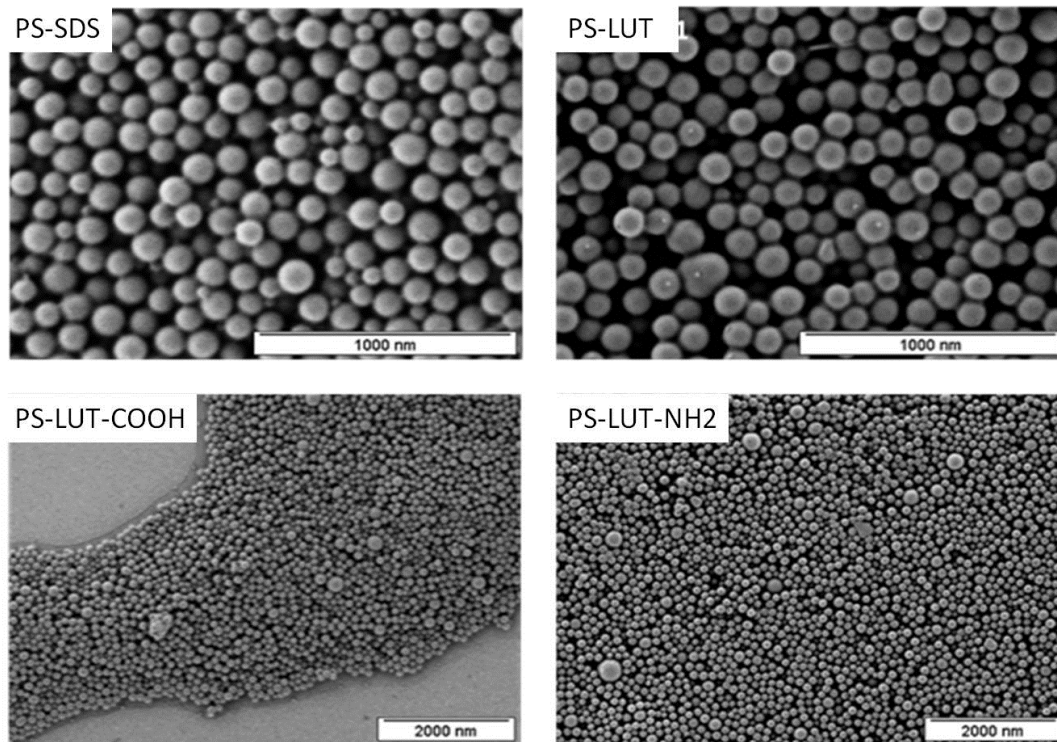


Abbildung 47: TEM Bilder der untersuchten Polystyrolnanopartikel.

Die gemessenen Zetapotentiale werden hauptsächlich durch die funktionellen Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche bestimmt, da für die Synthese der NP (PS-LUT, PS-LUT-COOH und PS-LUT-NH₂) immer ein nicht-ionisches Tensid verwendet wurde. Der Partikel PS-LUT besitzt ein leicht negatives Zetapotential, was auf eine Adsorption von Hydroxylionen an der Wasser-Partikel Grenzfläche zurückgeführt werden kann. Das mit dem anionischen Tensid modifizierte PS-SDS weist wie erwartet ein deutlich negatives Zetapotential auf (-37 mV).

5.3.1.1. Analyse der Polystyrolnanopartikel in humanem Serum

Die Korrelationsfunktion der NP kann perfekt durch eine biexponentielle Fitfunktion beschrieben werden

$$g_{1, NP}(t) = a_{1, np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1, np}}\right) + a_{2, np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2, np}}\right) \quad (\text{Gl. 5-1})$$

a_i and $\tau_i = (q^2 D_i)^{-1}$ entsprechen den jeweiligen Amplituden und Abklingzeiten. Der normalisierte 2. Kumulant (erhalten aus dem biexponentiellen Fit der entsprechenden Partikelkorrelationsfunktionen) ist für alle betrachtete Beispiele sehr klein, nicht aber für den Partikel PS-SDS. Somit sind die Partikel als relativ monodispers anzusehen, mit Ausnahme des Partikels PS-SDS welcher außerdem auch einen deutlich größeren

hydrodynamischen Radius besitzt (Tabelle 9). Die Autokorrelationsfunktion (AKF) des Serums kann gut mit einer triexponentiellen Anpassungsfunktion beschrieben werden.

$$g_{1,s}(t) = a_{1,s} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,s}}\right) + a_{2,s} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,s}}\right) + a_{3,s} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{3,s}}\right) \quad (\text{Gl. 5-2})$$

Wenn aggregatbildende Wechselwirkungen zwischen dem Partikel und Komponenten des humanen Serums vernachlässigbar sind, kann die Autokorrelationsfunktion der Mischung perfekt durch die Summe der Korrelationsfunktionen jeder Einzelkomponente beschrieben werden ($g_1(t)_m$).

$$g_1(t)_m = f_s g_{1,s}(t) + f_{np} g_{1,np}(t) \quad (\text{Gl. 5-3})$$

hierbei sind die Amplitudenanteile f_s und f_{np} die einzigen Variablen. Dies bedeutet, dass die bekannten Parameter a_i and τ_i der Korrelationsfunktionen von Serum und Partikel jeweils konstant gehalten werden. Findet Aggregation im Serum statt kann die Autokorrelationsfunktion im Gemisch nicht hinreichend durch $g_1(t)_m$ (Gl. 5-3) beschrieben werden. Die Gleichung muss mit einer zusätzlichen, additiven Anpassungsfunktion erweitert werden, um eine befriedigende Beschreibung der Serum/Partikel Mischung zu erzielen.

$$g_1(t)_{m+agg} = f_s g_{1,s}(t) + f_{np} g_{1,np}(t) + f_{agg} g_{1,agg}(t) \quad (\text{Gl. 5-4})$$

Dabei ist f_{agg} der Anteil der Streuintensität der Mischung der entstehenden Aggregate und

$$g_{1,agg} = a_{1,agg} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,agg}}\right) \quad (\text{Gl. 5-5})$$

die Autokorrelationsfunktion der Aggregate mit frei anpassbaren Parametern $a_{1,agg}$ und $\tau_{1,agg}$. Falls Aggregate größerer Polydispersität entstehen muss zudem auch eine biexponentielle Fitfunktion zur Beschreibung der Aggregate selbst verwendet werden. Um die Messungen in humanem Serum mit späterer *in vivo* Applikation in Bezug setzen zu können, wird das Verhältnis zwischen Anzahl Partikel/mg Serumprotein zwischen Mausversuch und den DLS Messungen konstant gehalten. Auf Grund der starken Streuintensität der Partikel müssen sowohl Partikellösung als auch das Serum ($c_{iv} = 6$ mg/ml, vgl. Tabelle 10) verdünnt werden, wobei das Verhältnis zwischen Anzahl Partikel und mg Serumprotein konstant gehalten wird.

Zum Vergleich werden alle Partikel auch in geringerer Konzentration in konzentriertem humanem Serum ($c_{\text{conc}} = 60 \text{ mg/ml}$) untersucht (Verdünnungsfaktor: 1:10, vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Untersuchte Konzentrationsverhältnisse der Polystyrolpartikel in humanem Serum.

Partikel	Anzahl Partikel (AP) /ml	Serumkonzentration/ mg/ml		AP/mg Serumprotein in vivo	AP/mg Serumprotein DLS	
		C_{iv}	C_{conc}		C_{iv}	C_{conc}
PS-LUT	1,02E+14	6	60	8.5E+10	8.5E+10	8.5E+9
PS-LUT-COOH	2,5E+15	6	60	2E+12	2E+12	1.7E+11
PS-LUT-NH ₂	1,02E+14	6	60	8,5E+10	8,5E+10	8,5E+9
PS-SDS	4,8E+13	6	60	4 E+10	4E+10	3.3E+8

Der Partikel PS-LUT-NH₂ zeigt keine Aggregation in humanem Serum (Abbildung 48).

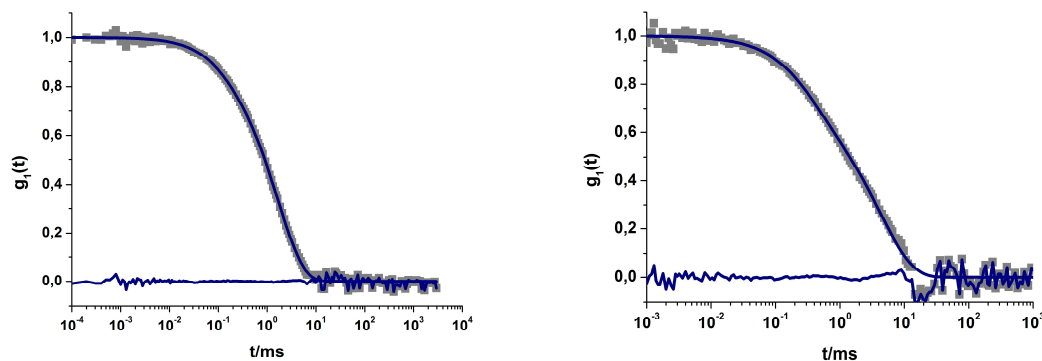


Abbildung 48: PS-LUT-NH₂ in humanem Serum: (links) Konzentration analog dem *in vivo* Experiment mit $c_s = 6 \text{ mg/ml}$ als Serumkonzentration und $8.5E+10$ Partikel pro mg Serumprotein, (rechts) in konzentriertem Serum $c_s = 60 \text{ mg/ml}$ und $8.5E+9$ Partikel pro mg Serumprotein; \blacksquare AKF der Mischung aus Partikel und Serum, – fit mit $g_1(t)_m$ (vgl. Gl. 5-3) und Residuum, Streuwinkel 90° , $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$.

Die Partikel PS-LUT und PS-SDS aggregieren hingegen in humanem Serum. Die Auswertung der Autokorrelationsfunktionen der Serum/Partikel-Gemische zeigt, dass PS-SDS Aggregate in der Größenordnung von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}, \text{Agg} = 2,5 \mu\text{m}$ und PS-LUT Aggregate mit einer Größe von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}, \text{Agg} = 207 \text{ nm}$ in der den *in vivo* Experimenten entsprechenden Konzentration bildet (Abbildung 50). Die Winkelabhängigkeiten der reziproken hydrodynamischen Radien der entstehenden Aggregate sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Abweichung des Graphen der PS-SDS Probe vom linearen Verlauf ist auf die Größe von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}, \text{Agg} = 2,5 \mu\text{m}$

und die hohe Polydispersität dieser Probe zurückzuführen. Auch beeinflussen hier Sedimentationseffekte das Ergebnis.

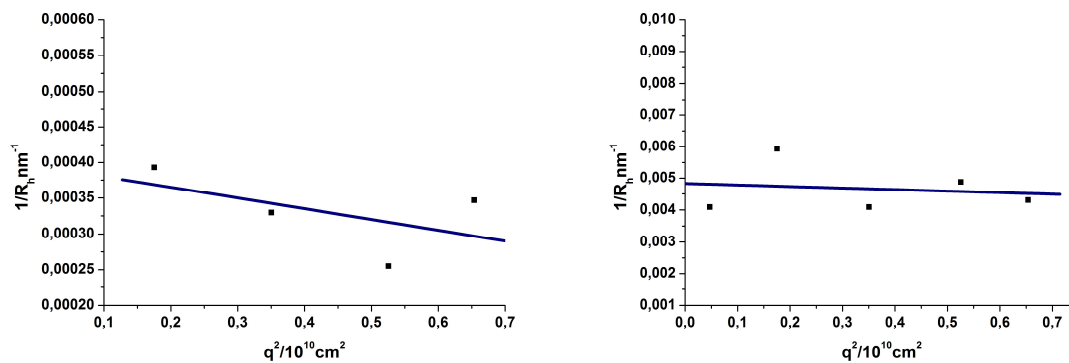


Abbildung 49: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius der Aggregate von: PS-SDS in humanem Serum mit $\langle 1/R_h \rangle_{z^{-1}} = 2.5 \mu\text{m}$ (links), PS-LUT in humanem Serum mit $\langle 1/R_h \rangle_{z^{-1}} = 207 \text{ nm}$ (rechts), Konzentration analog dem *in vivo* Experiment mit $c_s = 6 \text{ mg/ml}$ als Serumkonzentration und PS-LUT: $8.5\text{E}+10$ Partikel pro mg Serumprotein und PS-SDS: $4\text{E}+10$ Partikel pro mg Serumprotein, $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$.

Die Kontrollmessungen in konzentriertem Serum ($c_{\text{conc}} = 60 \text{ mg/ml}$) liefern für den Partikel PS-LUT das gleiche Ergebnis. Der Partikel PS-SDS aggregiert in konzentriertem Serum zu makroskopischen Strukturen. Diese Mischung ist mittels DLS auf Grund von zu starker Streuung nicht mehr charakterisierbar.

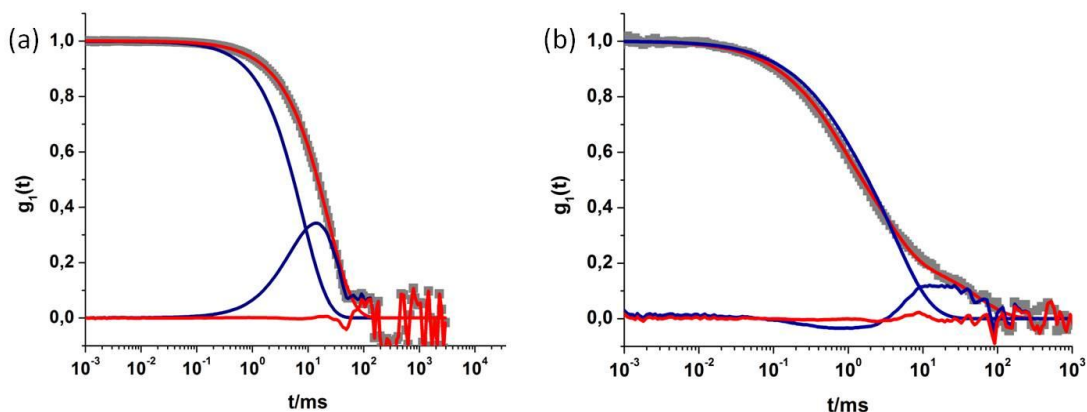


Abbildung 50: (a) PS-LUT in humanem Serum, (b) PS-SDS in humanem Serum; Konzentration analog dem *in vivo* Experiment mit $c_s = 6 \text{ mg/ml}$ als Serumkonzentration und (a) PS-LUT: $8.5\text{E}+10$ Partikel pro mg Serumprotein und (b) PS-SDS: $4\text{E}+10$ Partikel pro mg Serumprotein; \blacksquare AKF der Mischung aus Partikel und Serum, $-$ fit mit $g_1(t)_m$ (vgl. Gl. 5-3) und Residuum, $-$ fit mit $g_1(t)_{m+a}$ (vgl. Gl. 5-4) und Residuum, Streuwinkel 90° , $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$.

Der Partikel PS-LUT-COOH bildet in konzentriertem Serum Aggregate in der Größenordnung von $\langle 1/R_h \rangle_{z^{-1}, \text{Agg}} = 292 \text{ nm}$, aggregiert aber nicht in der *in vivo* analogen Konzentration (Abbildung 51).

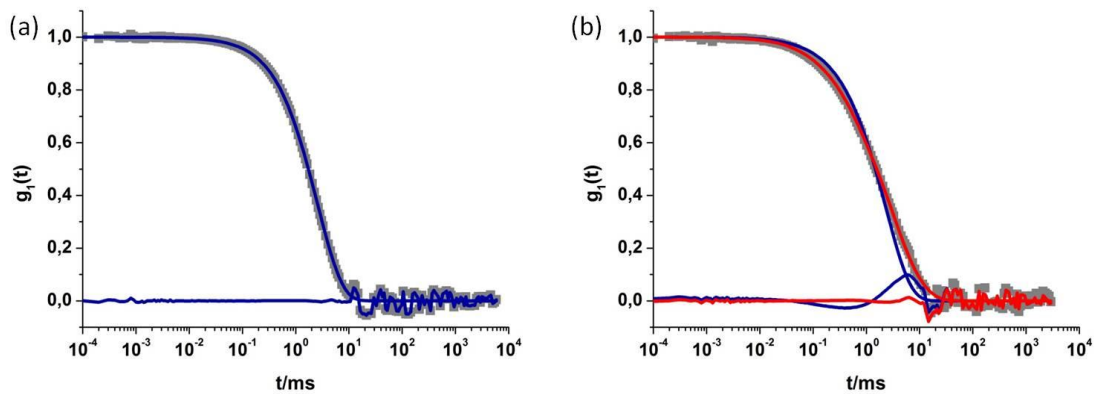


Abbildung 51: PS-LUT-COOH in humanem Serum: (a) Konzentration analog dem *in vivo* Experiment mit $c_S = 6$ mg/ml als Serumkonzentration und $2E+12$ Partikel pro mg Serumprotein, (b) in konzentriertem Serum $c_S = 60$ mg/ml und $1.7E+11$ Partikel pro mg Serumprotein; \blacksquare AKF der Mischung aus Partikel und Serum, $-$ fit mit $g_1(t)_m$ (vgl. Gl. 5-3) und Residuum, $-$ fit mit $g_1(t)_{m+a}$ (vgl. Gl. 5-4) und Residuum, Streuwinkel 90° , $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

Die Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius der entstehenden Aggregate von PS-LUT-COOH in konzentriertem Serum ist im Folgenden gezeigt.

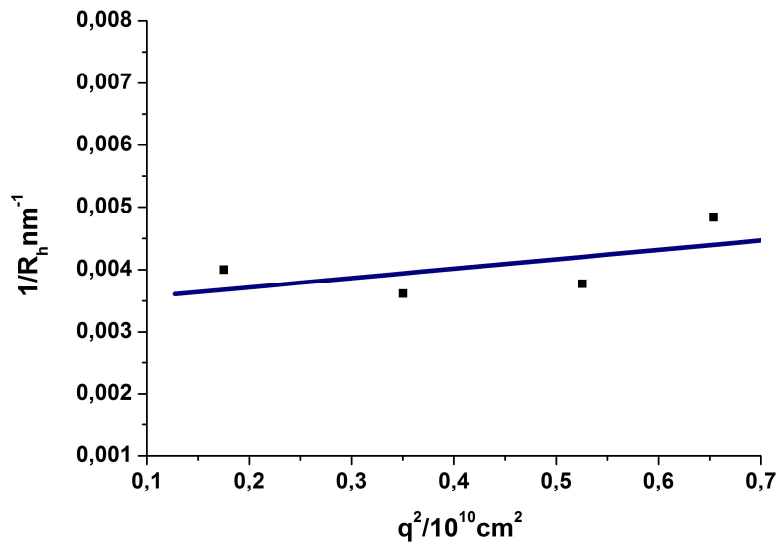


Abbildung 52: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius der entstehenden Aggregate ($\langle 1/R_h \rangle_{z=1} = 292$ nm) in einer Mischung von konzentriertem humanem Serum ($c_S = 60$ mg/ml) und PS-LUT-COOH ($1.7E+11$ Partikel pro mg Serumprotein), $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

In Tabelle 11 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 11: Aggregationsverhalten der Polystyrolpartikel in humanem Serum. Die Verhältnisse zwischen Protein und Polymer entsprechen den in Tabelle 10 dargestellten Konzentrationsverhältnissen. Außer Partikel PS-LUT-COOH, der nur Aggregation im konzentrierten Serum zeigt, ist die Aggregation konzentrationsunabhängig.

Partikel	Protein/Polym er Verhältnis	Aggregatgröße $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	Protein/Polym er Verhältnis	Aggregatgröße $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$
PS-LUT	In vivo	207 nm	Konzentriertes Serum	207 nm
PS-LUT-COOH	In vivo	-	Konzentriertes Serum	292 nm
PS-LUT-NH ₂	In vivo	-	Konzentriertes Serum	-
PS-SDS	In vivo	2,5 μ m	Konzentriertes Serum	Makroskopische Fällung

5.3.1.2. Körperverteilung von Polystyrolpartikeln in der Maus

In einer Kooperation mit der Universitätsmedizin Mainz werden alle Polystyrolpartikel von Maria Sommer bezüglich ihrer Organverteilung in NSG-Mäusen untersucht [68]. Es werden je $37 \mu\text{g}$ Partikel pro ml Mausblut in die Schwanzvene injiziert. Nach verschiedenen Zeiträumen wird die Maus in Narkose versetzt und es wird das Fluoreszenzsignal gemessen (Abbildung 53). Das sich hieraus ergebende Verhältnis zwischen Anzahl an Nanopartikeln und mg Serumproteinen ist in Tabelle 10 dargestellt. Wie bereits zuvor diskutiert wird dieses Verhältnis auch in den DLS Experimenten beibehalten.

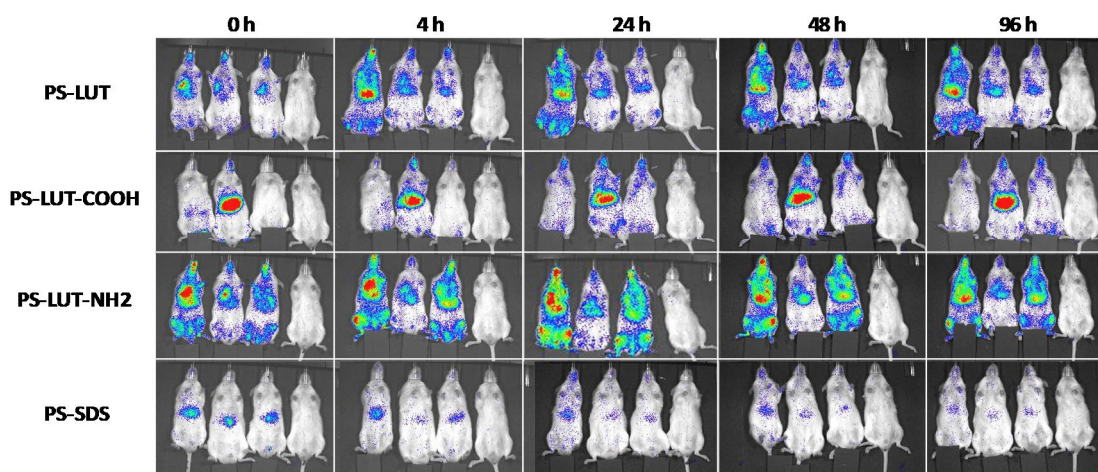


Abbildung 53: Körperverteilung von Polystyrolnanopartikeln in NSG Mäusen. Es wurden jeweils $37 \mu\text{g}/\text{ml}$ Partikellösung über die Schwanzvene der Maus injiziert. Die jeweils rechts abgebildete Maus ist eine Kontrolle. Alle Versuche sind Triplikate.

PS-SDS kann nur in der Leber der untersuchten Mäuse gefunden werden und zeigt, entsprechend einer niedrigen Konzentration eine nur geringe Fluoreszenzintensität.

Partikel PS-LUT-NH₂ zeigt die beste Körperverteilung. Er wird neben der Leber auch in der Region der Lunge und der Bauchspeicheldrüse detektiert.

PS-LUT zeigt eine ähnliche Verteilung allerdings bei geringerer Fluoreszenz.

Auch der negativ geladene Partikel PS-LUT-COOH scheint vorwiegend in der Leber zu akkumulieren.

Nach einem Zeitraum von 96 h, nach Injektion, werden die Mäuse getötet und folgende Organe detaillierter hinsichtlich der Partikelaufnahme untersucht: Blut, Lunge, Leber, Milz, Haut und Gehirn. Außer im Gehirn können alle Partikel nach 96 h in allen Organen gefunden

werden. Die stärkste Anreicherung aller Partikel kann immer in der Leber detektiert werden. Alle Partikel können in der Rückenhaut der Mäuse lokalisiert werden, was eventuell auch durch die gewählte Injektionsposition bedingt sein kann. Alle Partikel werden über die Schwanzvene injiziert, hierbei könnte es vorkommen, dass sich Partikel um die Injektionsstelle und somit im Bereich der Rückenhaut verteilen. Auch im Blut sowie in der Milz können für alle Partikel schwache Fluoreszenzsignal detektiert werden. Alle Ergebnisse wurden in zwei weiteren Versuchen reproduziert.

5.3.1.3. Zusammenfassung und Diskussion

Es werden Polystyrolpartikel mit verschiedenen Oberflächenmodifizierungen (chemische Struktur und Ladungszustand) bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum sowie der Körperverteilung in der Maus untersucht.

Der elektrisch neutrale Partikel PS-LUT zeigt nach Analyse mittels DLS die Bildung von Aggregaten in der Größenordnung von 200 nm. Die Organverteilung in der Maus ist gut, der Partikel kann in allen untersuchten Organen gefunden werden, wenn auch mit einer etwas geringeren Intensität im Vergleich zu dem formal kationischen Partikel PS-LUT-NH₂. Auf Grund des leicht negativen Zetapotentials ist eine Wechselwirkung dieses Partikels mit den Scavenger Rezeptoren von Makrophagen möglich, welche eine besondere Affinität zu anionischen Liganden zeigen [41-42].

PS-LUT-NH₂ zeigt die vielversprechendste Körperverteilung und zeigt zudem keine mittels DLS detektierbare Aggregation in humanem Serum. Die gute Organverteilung des Partikels PS-LUT-NH₂ könnte auf die Bindung von Dysopsoninen zurückgeführt werden, welche die Ausscheidung über das phagozytotische System verringern. Hierfür spricht, dass der Partikel im Vergleich zu den anderen Partikeln nicht vorrangig in der Leber gefunden wird. Eines der höchst konzentrierten Dysopsonine ist das humane Albumin. Der isoelektrische Punkt des Albumins liegt bei $pH_i = 5.67$ (Expacy), somit besitzt es bei physiologischem pH-Wert eine negative Nettoladung und zeigt eine erhöhte Affinität zu positiven Oberflächen. Eine Monoschicht aus Albumin auf der Partikeloberfläche kann mittels dynamischer Lichtstreuung nicht detektiert werden. Die hieraus entstehende Radienzunahme von maximal ± 3 nm befindet sich im Fehlerbereich der Messmethode. Betrachtet man den leicht positiven Wert des Zetapotentials dieses Partikels von + 4 mV (pH = 7.4) im Vergleich zum leicht negativen Zetapotential von - 9 mV (pH = 7.4) des Partikels PS-LUT, ist hier eine geringere Affinität zu den negativen Phospholipidkopfgruppen der Lipoproteine zu erwarten. Dies spiegelt auch das Ergebnis der *in vivo* Experiment wieder, in denen nur ein gewisser Anteil des Partikels PS-LUT-NH₂ in der Leber gefunden wird. Eine starke Adsorption von Lipoproteinen auf der Partikeloberfläche würde zu einer vermehrten Erkennung des Partikels durch die Scavenger Rezeptoren der Makrophagen und damit zu einer vermehrten Akkumulation in der Leber führen.

Der Partikel PS-LUT-COOH aggregiert nur in konzentriertem humanem Serum, dies lässt Wechselwirkungen mit Proteinklassen die nur in geringer Konzentration vorliegen vermuten. PS-LUT-COOH wird im *in vivo* Experiment vorwiegend in der Leber gefunden, was dafür spricht, dass er schnell vom phagozytotischen System als Fremdkörper erkannt wird. Auf Grund der anionischen Modifizierung der Partikel Oberfläche wäre es möglich, dass dieser Partikel über die auf der Makrophagenoberfläche exprimierten Scavenger Rezeptoren erkannt wird. Diese Rezeptoren haben eine erhöhte Affinität zu anionischen Liganden [41-42].

Der formal negativ geladene Partikel PS-SDS wird nur in der Leber gefunden und neigt zudem zu starker Aggregation in humanem Serum mit Aggregaten einer Größe von mehr als 2 µm in unverdünntem Serum. Die starke Aggregation dieses Partikels könnte hierbei durch Verbrückung der Partikel untereinander erfolgen. Da SDS nicht kovalent an den Partikel angebunden ist, kann eine Desorption des Tensides zu einer Instabilisierung der Emulsion führen. Die gezielte und direkte Aufnahme des Partikels in die Leber spricht für eine schnelle Erkennung des Partikels vom phagozytotischen System, somit wird PS-SDS direkt als Fremdkörper erkannt und über Makrophagen aus der Zirkulation ausgeschleust. Da Makrophagen bevorzugt Partikel mit einem Durchmesser von 1-3 µm erkennen, kann der spezifische Transport des Partikels PS-SDS bzw. dessen höher molekularen Aggregate zur Leber erklärt werden [40-41]. Auch ist eine Erkennung des Partikels durch die Scavenger Rezeptoren der Makrophagen auf Grund seiner negativen Oberflächenladung möglich [41-42]. Zudem ist auf Grund der negativen Oberflächenladung des Partikels eine geringere Affinität zum humanen Albumin ($pH_i = 5.67$) zu erwarten. Es ist nicht davon auszugehen, dass sich eine Albuminschicht um den Partikel ausbildet. Der Partikel ist damit nicht durch Albumin vor Opsonisierung geschützt und kann mit verschiedenen Serumbestandteilen wechselwirken. Es wäre in zukünftigen Versuchen zu klären, ob auf dem Partikel eine vermehrte Adsorption von Opsoninen (z.B. IgG) stattfindet. Auch wäre es interessant mittels DLS aggregatbildende Wechselwirkungen der Partikel mit den, durch laufende LC-MS/MS-Messungen identifizierten, adsorbierenden Proteinfractionen zu untersuchen. Hierzu müssen die jeweiligen Serumkomponenten, welche nicht durch bekannte Fraktionierungstechniken separiert oder kommerziell erworben werden können, allerdings zuerst isoliert werden. Insgesamt führt die Korrelation der Ergebnisse aus DLS mit den an der Maus gewonnenen Daten zur ganz prinzipiellen Erkenntnis, dass das *in vivo* Verhalten von

Nanopartikeln hinsichtlich Organverteilung ganz wesentlich von der jeweiligen Partikel/Protein Wechselwirkung im Serum bestimmt wird, und diese weitgehend durch Variation der Oberflächenfunktionalisierung zu kontrollieren ist.

5.3.2. Aggregationsverhalten von liposomalen Systemen in humanem Serum

Liposomen werden auf Grund ihrer atoxischen Struktur immer häufiger als Kandidaten zum Wirkstofftransport im Körper diskutiert [97]. Die größten Nachteile herkömmlicher liposomaler Systeme bestehen in der schnellen Erkennung durch Makrophagen nach Adsorption von Oponinen auf der Liposomenoberfläche. Auch sind sie meist nur unzulänglich bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften charakterisiert [57, 98-99]. Im Folgenden werden zwei definierte liposomale Systeme hinsichtlich ihrer Stabilität in humanem Blutserum untersucht. Zunächst werden die unter 5.2. beschriebenen Liposomen vor, sowie nach Beladung mit siRNA in humanem Serum bezüglich ihres Aggregationsverhaltens diskutiert. Weiterhin wird ein neuartiges hyperverzweigtes Polyglycerol, welches kovalent an Cholesterol gebunden ist, in eine Liposomenmembran eingebaut und der „Stealth Effekt“ dieses Polymers diskutiert.⁵ Vorteil gegenüber konventionellen PEG-Derivaten ist die erhöhte Wasserlöslichkeit durch die vielen Hydroxygruppen des Polyglycerols. Darüber hinaus kann das multifunktionelle Amphiphil zur weiteren Funktionalisierung/Markierung verwendet werden, wobei auch Mehrfachfunktionalisierung möglich wird.

5.3.2.1. Untersuchung von liposomalen siRNA-Delivery Systemen in humanem Serum

Die unter 5.2. beschriebenen Liposomen werden in humanem Serum hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens untersucht. Tabelle 12 zeigt die in Humanserum untersuchten Systeme.

Tabelle 12: Darstellung der Eigenschaften ($\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$, Ladungsverhältnis, Zusammensetzung) der untersuchten liposomalen siRNA Delivery Systeme

Probennahme	Anteile	Gewichtsverhältnis	Ladungsverhältnis	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	Präparation
L-TF	Chol:DSPS:TF	1 : 1 : 1	-	60 nm	-
L-TF-A	Chol:DSPC:TF : siRNA	1: 1 : 1 : 0,2	9 ⁺ /1 ⁻	62 nm	Methode A (vgl. 7.8.)
L-TF-B	Chol:DSPC:TF : siRNA	1: 1 : 1 : 0,2	9 ⁺ /1 ⁻	57 nm	Methode B (vgl.7.8.)

⁵ Synthese des Cholesterol gebundenen hyperverzweigten Polyglycerols von Sophie Müller, AK Frey, Institut für organische Chemie, Universität Mainz.

Die Endkonzentration an siRNA in der Liposomenlösung liegt für alle Systeme bei $c_{\text{siRNA}} = 4.8 \mu\text{g/ml}$, die Lipidkonzentration setzt sich zusammen aus den Anteilen von Cholesterol, DSPC und dem Spermin Tensid, und liegt bei $c_{\text{lipid}} = 2.88 \text{ mg/ml}$. Unbeladene sowie beladene Liposomen werden in einer Endkonzentration von $c_{\text{Liposomen}} = 0.04 \text{ mg/ml}$ in humanem Serum ($c_{\text{Serum}} = 30 \text{ mg/ml}$) untersucht, die siRNA Konzentration (komplexiert und frei) beträgt damit $c_{\text{siRNA,Serum}} = 0.064 \mu\text{g/ml}$. Die Anteile der komplexierten siRNA liegen für Liposomen präpariert nach Methode A bei 77 gew.%, nach Methode B bei 44 gew.%. Der freie siRNA Anteil konnte nicht durch Dialyse von den beladenen Liposomen abgetrennt werden und liegt bei Methode A im Serum bei $c_{\text{siRNA,A,frei}} = 0.015 \mu\text{g/ml}$, bei Methode B in Serum bei $c_{\text{siRNA,B,frei}} = 0.036 \mu\text{g/ml}$.

Die Messung von unbeladenen Liposomen (L-TF) in humanem Serum zeigt keine Aggregatbildung (Abbildung 54 a). Auch Liposomen die nach Methode A mit siRNA (L-TF-A) beladen werden zeigen keine Aggregation (Abbildung 54).

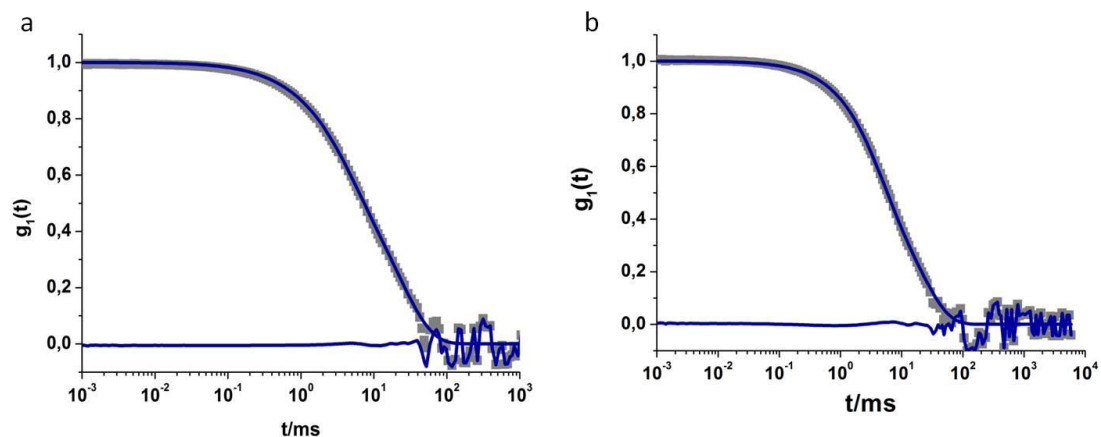


Abbildung 54: Liposomen ($c_{\text{Liposomen}}=0.04 \text{ mg/ml}$) in humanem Serum ($c_{\text{serum}}=30 \text{ mg/ml}$): ■ AKF der Mischung, — Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) der Mischung aus Liposomen und Serum und zugehöriges Residuum, (a)L-TF, (b) L-TF-A, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$

Im Gegensatz hierzu neigen Liposomen die nach Methode B (L-TF-B) hergestellt werden zu starker Aggregation in humanem Serum, die Größenordnung der entstehenden Aggregate beträgt bis zu $R_{h,Agg} = 1 \mu\text{m}$ (Abbildung 55).

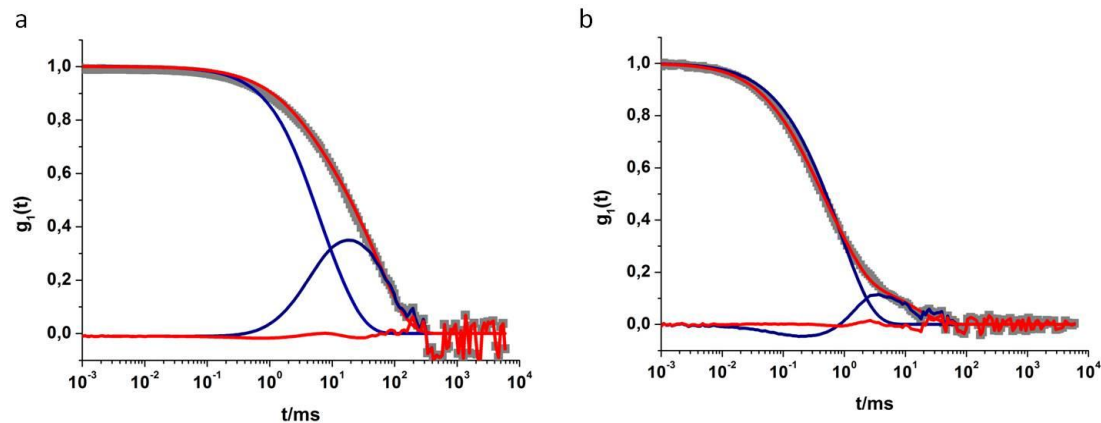


Abbildung 55: L-TF-B in humanem Serum: \blacksquare Datenpunkte der AKF; $-$ fit mit $g_1(t)_m$ (Gl. 5-3) und zugehöriges Residuum; $-$ fit mit $g_1(t)_{m+a}$ (Gl. 5-4) und zugehöriges Residuum, (a) Streuwinkel 30° ; (b) Streuwinkel 60° ; λ 0 632.8 nm, $T = 293$ K.

Wie bereits unter 5.2. diskutiert wird davon ausgegangen, dass sich bei der Präparation der Liposomen mit Methode B die negativ geladene siRNA an die positiven Aminogruppen des Tensides über elektrostatische Wechselwirkung anlagert. Hierdurch entsteht eine im Vergleich zu den unbeladenen Liposomen schwächer positiv geladene Oberfläche, die dann mit Komponenten des humanen Serums wechselwirken kann. Auf Grund des in der Liposomenlösungen frei vorliegenden siRNA Anteils sind theoretisch auch Wechselwirkungen zwischen siRNA und Serumproteinen in Betracht zu ziehen. Da sich allerdings der Anteil an freier siRNA im Falle der Methode B (56 gew.%) nur um einen Faktor 2 von dem der Methode A unterscheidet und die freie siRNA Konzentration ($c_{\text{siRNA,A, frei}} = 0.015 \mu\text{g/ml}$, $c_{\text{siRNA,B, frei}} = 0.036 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) bei beiden Methoden gegenüber der Serumproteinkonzentration ($c_{\text{Serum}} = 30 \text{ mg/ml}$) sehr gering ist, werden diese Wechselwirkungen hier nicht als relevant angesehen.

5.3.2.2. Aggregationsverhalten von Liposomen modifiziert mit hyperverzweigtem Polyglycerol in humanem Serum

Es werden Liposomen bestehend aus Cholesterol, EPC (engl. egg phosphatidylcholine) und einem hyperververzweigten Polyglycerols mit angebindenem Cholesterol (Ch-PEG₃₀-hbPG₂₃) bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum untersucht (Abbildung 56, Tabelle 13). Alle Liposomen werden durch Extrusion hergestellt.

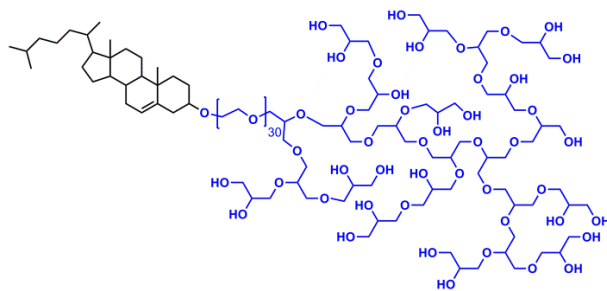


Abbildung 56: Struktur des Ch-PEG₃₀-hbPG₂₃ Blockcopolymer⁶

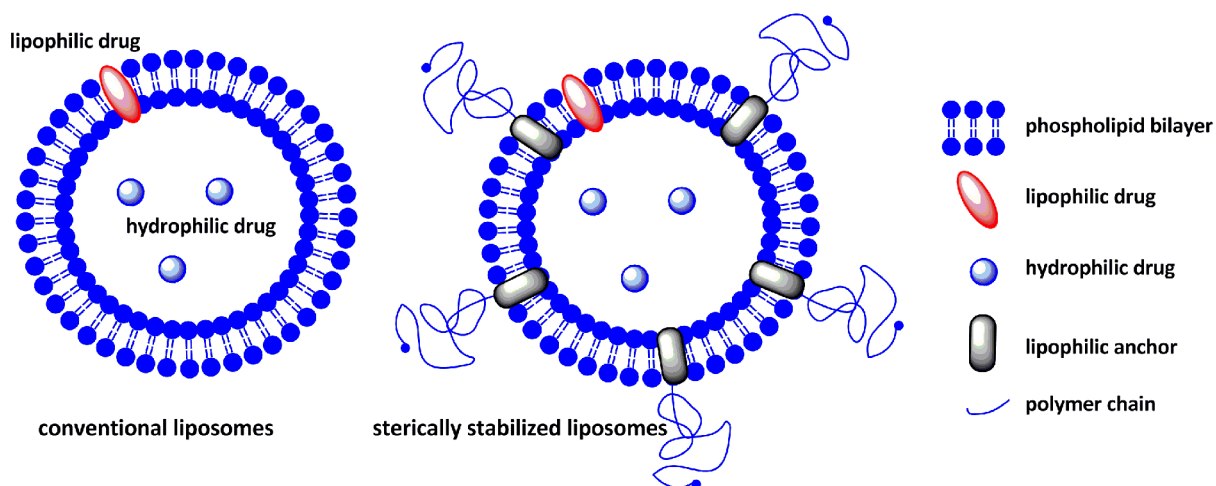


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der untersuchten sterisch stabilisierten Liposomen im Vergleich zu konventionellen Liposomen.⁶

Tabelle 13: Übersicht der Liposomenzusammensetzungen, Angaben in der Tabelle in Molprozent

	L1	L2	L3	L4	L5
Ch-PEG ₃₀ -hbPG ₂₃	0	5	10	15	20
EPC	55	55	55	55	55
Chol	45	40	35	30	25

⁶ Synthese des Cholesterol gebundenen hyperverzweigten Polyglycerols, Präparation der Liposomen und Abbildung 57 von Sophie Müller, AK Frey, Institut für organische Chemie, Universität Mainz

Die hydrodynamischen Radien der Liposomen sind in Tabelle 14 angeführt. Die Korrelationsfunktionen der nur mäßig polydispersen Liposomen können alle mittels einer biexponentiellen Fitfunktion beschrieben werden.

$$g_1(t) = a + b \times \exp\left(-\frac{c}{t}\right) + d \times \exp\left(-\frac{e}{t}\right) \quad (\text{Gl.5-6})$$

Es zeigt sich das die erzielte Größe der Liposomen mit steigendem Polymergehalt sehr deutlich abnimmt.

Tabelle 14: Hydrodynamische Radien der Liposomenlösungen.

	L1	L2	L3	L4	L5
Anteil Ch-PEG-hbPG /%	0	5	10	15	20
$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}/\text{nm}$	90	99	97	70	51

Alle in Tabelle 13 und Tabelle 14 beschriebenen Liposomen sowie das isolierte Polymer (Abbildung 56) werden bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum untersucht. Das Polymer zeigt keine aggregationsinduzierenden Wechselwirkungen in humanem Serum (Abbildung 58a).

Dagegen neigen Liposomen bestehend nur aus Cholesterol und EPC in humanem Serum zur Aggregation ($R_{h,Agg} = 900 \text{ nm}$, Abbildung 58b). Die Aggregate zeigen eine hohe Polydispersität, was an den Abweichungen des Residuums nach dem Fit mit $g_1(t)_{m+a}$ (Gl. 5-4) zu erkennen ist. Eine monoexponentielle Aggregatfunktion reicht somit hier zur Beschreibung nicht aus. Da das Fitprogramm keine weitere Funktion zulässt kann die Aggregatfunktion an dieser Stelle nicht näher charakterisiert werden. Größe und Amplitude sind also nur Anhaltswerte.

Liposomen beladen mit 5% Ch-PEG-hbPG bilden Aggregate im Größenbereich von $R_{h,Agg} = 600 \text{ nm}$ aus (Abbildung 58c). Bei 10% Einlagerung findet nur wenig Aggregation statt ($R_{h,Agg} = 200 \text{ nm}$). Ab einer Einlagerung von 15% des Ch-PEG-hbPG in die Liposomen ist eine Aggregation im humanen Serum mit DLS nicht mehr nachweisbar (Abbildung 58d).

Somit zeigt das untersuchte Polymersystem den erwünschten „stealth effect“. Die Gruppen des hyperverzweigten Polyglycerols stabilisieren sterisch die Liposomenoberfläche, so dass aggregationsinduzierende Protein-Liposomenwechselwirkungen abnehmen. Belegt wird diese These auch durch den experimentellen Befund der mit zunehmendem Gehalt an

Polyglycerol abnehmenden Partikelgröße, da Polyglycerol mit dem Cholesterolanteil im hydrophoben Bereich der Liposomenmembran verankert, der hydrophile hyperverzweigte Teil aber dem Medium Wasser zugewandt sein wird, führt dessen, im Vergleich zum Phospholipid vergrößertes Volumen zur stärkeren Krümmung der Liposomenmembran, und damit zu kleineren Radien des Liposoms.

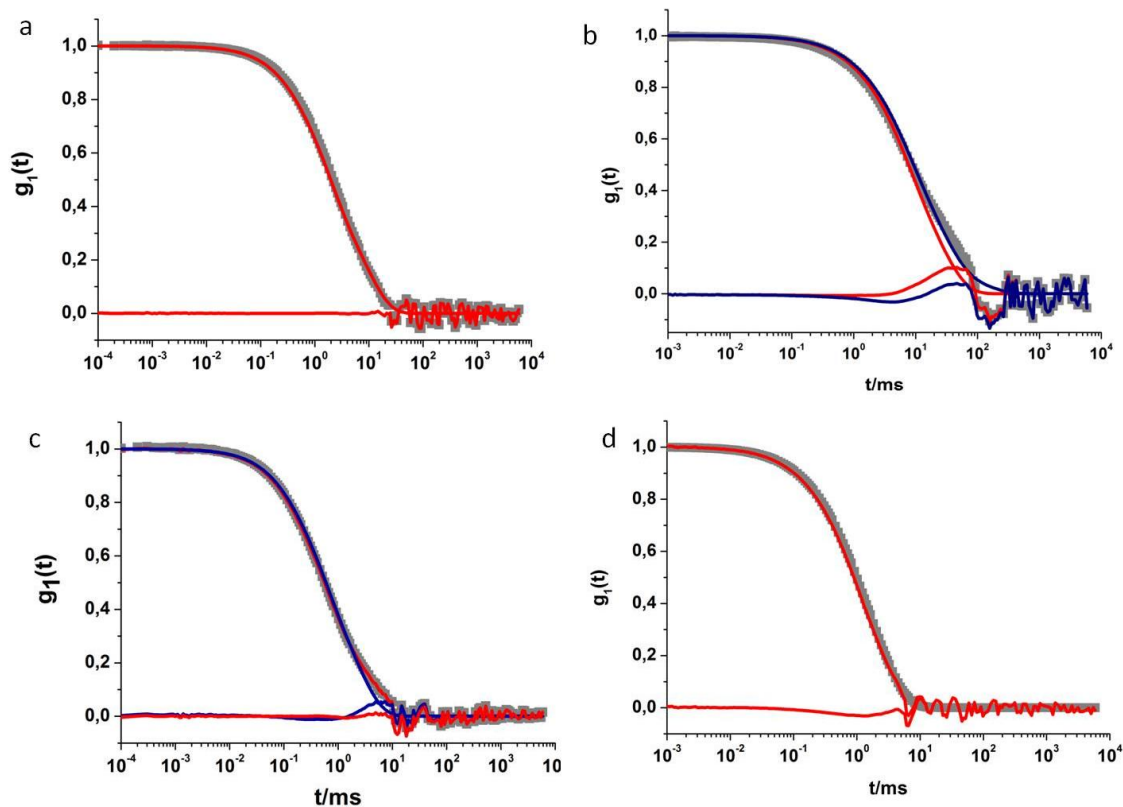


Abbildung 58: ■ Datenpunkte der AKF von (a) Polymer in Serum (b) L1 in Serum (0% Ch-PEG₃₀-hbPG₂₃) (c) L2 in Serum (5% Ch-PEG₃₀-hbPG₂₃) (d) L4 in Serum (15% Ch-PEG₃₀-hbPG₂₃); - Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl. 5-3) und zugehöriges Residuum; - Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ (Gl. 5-4) und zugehöriges Residuum; Streuwinkel 30°; $\lambda = 632.8$ nm, $T=293$ K.

5.3.2.3. Zusammenfassung

Liposomen sind auf Grund ihrer hoch biokompatiblen Bestandteile interessante Kandidaten für die Verkapselung von verschiedenen Wirkstoffen so auch z.B. von siRNA.

Liposomen, bestehend aus Co-lipiden wie DSPC, EPC und Cholesterol, neigen zur Bildung von eher polydispersen Strukturen, die durch Wechselwirkungen mit Komponenten des humanen Serums höhermolekulare Aggregate ausbilden.

Die Adsorption von Serumproteinen auf der Nanopartikeloberfläche kann durch die Einführung von hyperverzweigtem Polyglycerol mit kovalent gebundenem Cholesterol eingeschränkt werden. Da die meisten Plasmaproteine selbst glycosyliert sind [25], werden generell zuckerähnliche Oberflächen weniger stark als körperfremd identifiziert [100] und damit werden solche Systeme auch nicht sofort durch das phagozytotische System ausgeschleust. Hieraus resultieren erhöhte Blutzirkulationszeiten. Zudem wird die Adsorption von Plasmaproteinen durch Glykosyl- bzw. glykosylmimetische Reste verringert, was deren hohen lokalen Konzentrationen von Hydroxygruppen zugeschrieben wird. Ab einem prozentualen Anteil von 15% des Copolymers (Ch-PEG₃₀-pbPG₂₃) findet deshalb keine Aggregation in humanem Serum mehr statt. Die Ausrüstung der Liposomen mit Polyglycerol führt chemisch und strukturell zu einer großen Ähnlichkeit mit biologischen, glycosylierten Oberflächen und damit zu einer vergleichbaren Hydrophilie bei gleichzeitig sterischer Abschirmung der elektrischen Ladungen. In Anhang B2 ist die Charakterisierung von Dextran in humanem Serum dargestellt. Es entstehen wie erwartet keine höher molekularen Aggregate in der untersuchten Mischung. Dies lässt darauf schließen, dass zuckerähnliche Strukturen in humanem Serum nicht zu Aggregation neigen, wobei die Ausbildung einer Monolage aus Proteinen mit der hier verwendeten Methode nicht ausgeschlossen werden kann. Auch die Einführung von Ladungen in die Liposomenmembran scheint deren Aggregationsverhalten in humanem Serum zu beeinflussen. Liposomen bestehend aus dem Tensid F, sowie den Colipiden DSPC und Cholesterol zeigen keine Aggregation in humanem Serum. Belädt man diese Liposomen von außen mit siRNA und reduziert damit die positive Ladung der Liposomenoberfläche findet erneut Aggregation mit Komponenten des Humanserums statt.

Dies kann möglicherweise durch eine verstärkte Affinität zu humanem Albumin bei zunehmender positiver Ladung der Oberfläche zurückgeführt werden. Der isoelektrische

Punkt des Albumins liegt bei $pH_i = 5.67$ (Expacy) somit besitzt es bei physiologischem pH-Wert eine negative Nettoladung und zeigt eine erhöhte Affinität zu positiven Oberflächen. Eine Monoschicht aus Albumin auf der Partikeloberfläche kann mittels DLS nicht detektiert werden. Die hieraus entstehende Radienzunahme von maximal ± 3 nm befindet sich im Fehlerbereich der Messmethode. Diese Monoschicht kann allerdings die Liposomenoberfläche gegenüber anderen Serumkomponenten inert machen.

Auch handelt es sich bei Albumin um ein Dysopsonin, somit werden Albumin bedeckte Oberflächen nicht vom phagozytotischen System über Fc Rezeptoren erkannt und ausgeschleust. Dies resultiert in einer längeren Blutzirkulationszeit (vgl.3.2.2.).

Für zukünftige Experimente wäre es interessant das hyperverzweigten Polyglycerol zusammen mit dem Spermin Tensid in Liposomen einzubauen und die strukturellen sowie funktionellen Eigenschaften dieser multikomponenten Liposomen zu untersuchen.

5.3.3. Aggregationsverhalten von kationisch geladenen Nanohydrogelpartikeln in humanem Serum vor und nach Beladung mit siRNA

Kationische Nanohydrogelpartikel⁷ basierend auf amphiphilen Reaktivester Blockcopolymeren, welche über aminofunktionalisierte Vernetzer kovalent stabilisiert werden, können zum Transport von siRNA verwendet werden [101]. Diese kationischen Nanohydrogele (LN247) werden vor sowie nach Beladung mit siRNA in humanem Serum hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens untersucht. Die Autokorrelationsfunktion (AKF) der Nanohydrogele kann mittels einer biexponentiellen Fitfunktion beschrieben werden:

$$g_1(t) = a + b \times \exp\left(-\frac{c}{t}\right) + d \times \exp\left(-\frac{e}{t}\right)$$

Es wird ein z-gemittelter hydrodynamischer Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 24.37$ nm erhalten (Abbildung 59). In humanem Serum entstehen mit den positiv geladenen Nanohydrogelpartikeln Aggregate in der Größenordnung von $R_{h,Agg} = 300$ nm (Abbildung 60). Damit ist das Aggregat deutlich grösser als die beiden Einzelkomponenten ($\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$: (Serum=18 nm, Partikel= 24.37 nm). Betrachtet man die Amplitudenanteile der drei Komponenten (Serum, Aggregat, Partikel) wird deutlich, dass in der Serumlösung noch Partikel frei vorliegen und somit nicht alle Partikel vollständig aggregiert sind. Die Amplitudenanteile bei einem Streuwinkel von 30° liegen bei 70% für das Serum, 17% für den Partikel und 14% für das gebildete Aggregat.

⁷ Synthetisiert von Lutz Nuhn, AK Zentel, Institut für Organische Chemie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

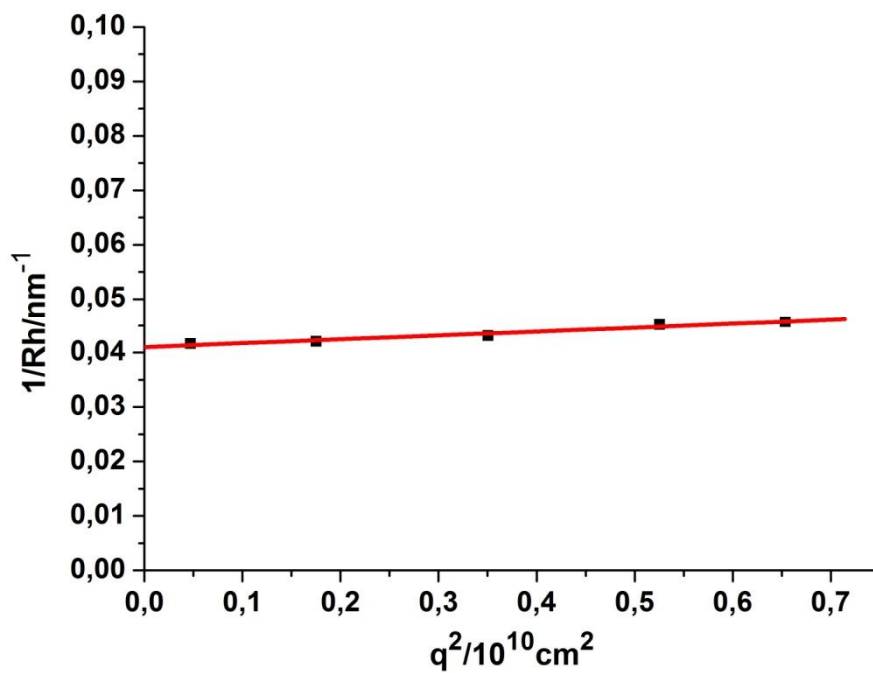


Abbildung 59: ■ Winkelabhängigkeit des inversen hydrodynamischen Radius der kationischen Nanohydrogelpartikel in PBS-Puffer ($c = 0.05 \text{ mg/ml}$), - linearer Fit, $T = 293 \text{ K}$.

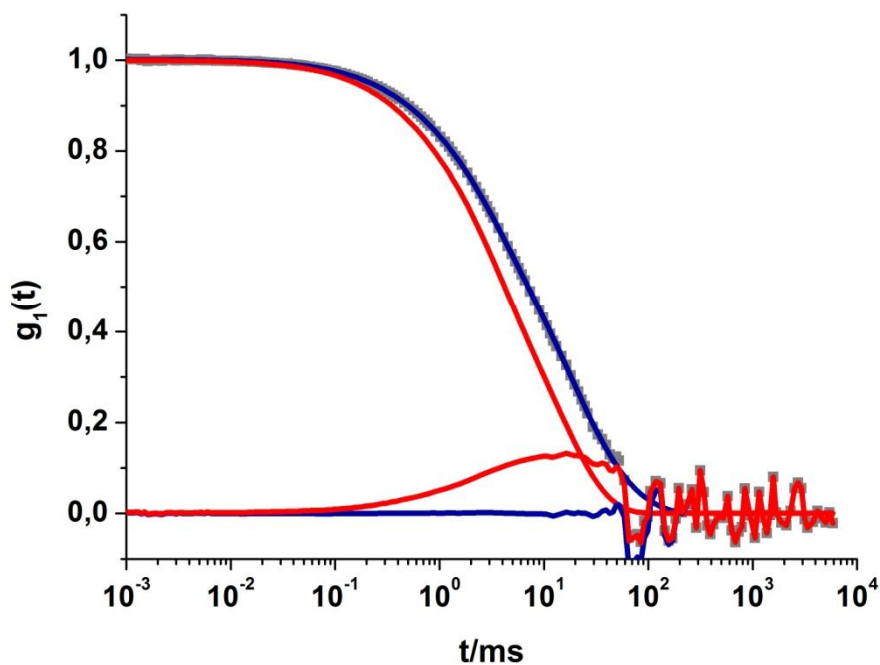


Abbildung 60: ■ Datenpunkte der AKF der Nanohydrogelpartikel in humanem Serum, - Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl. 5-3) und zugehöriges Residuum, - Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ (Gl. 5-4) und zugehöriges Residuum, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$

5.3.3.1. Identifikation der aggregationsinduzierenden Serumkomponenten

Es wird davon ausgegangen, dass die Aggregation durch elektrostatische Wechselwirkungen der positiv geladenen Partikel mit negativen Komponenten des humanen Serums ausgelöst wird. Um dies zu überprüfen wird humanes Serum mittels der unter 4.3. beschriebenen Kombination aus Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie fraktioniert. Eine überwiegend anionische Proteinfraction kann aus dem Durchfluss der DEAE Säule erhalten werden. Ebenso wie im humanen Serum ergeben sich Aggregate im Größenbereich von $R_{h,Agg} = 200$ nm (Abbildung 61).

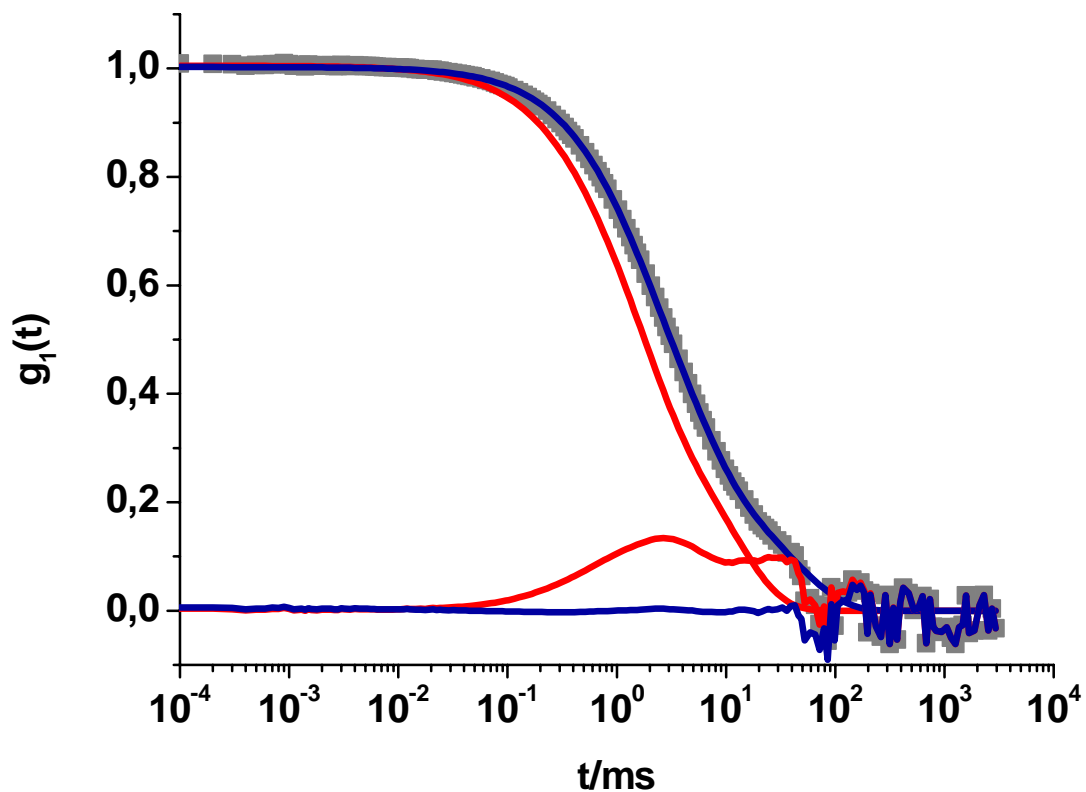


Abbildung 61: ■ Datenpunkte der AKF der Mischung aus Nanohydrogelpartikeln und der anionischen Proteinfraction des humanen Serums, - Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) und Residuum, - Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ (Gl.5-4) und Residuum, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K

5.3.3.2. Beladung der Nanohydrogelpartikel mit siRNA

Eine mögliche Anwendung der diskutierten kationischen Nanohydrogelpartikel (LN247) ist der Transport von siRNA. Die Beladungskapazität der Partikel wird durch Zugabe verschiedener Mengen an siRNA ermittelt. Hierzu werden die angesetzten Proben auf ein Agarose Gel aufgetragen (Abbildung 62). Da der Partikel auf dem Gel immobilisiert wird, kann die freie siRNA über die zugehörige Bande identifiziert werden. Ist siRNA nicht mehr nachweisbar, kann man davon ausgehen, dass die siRNA vollständig an die Partikel gebunden ist.

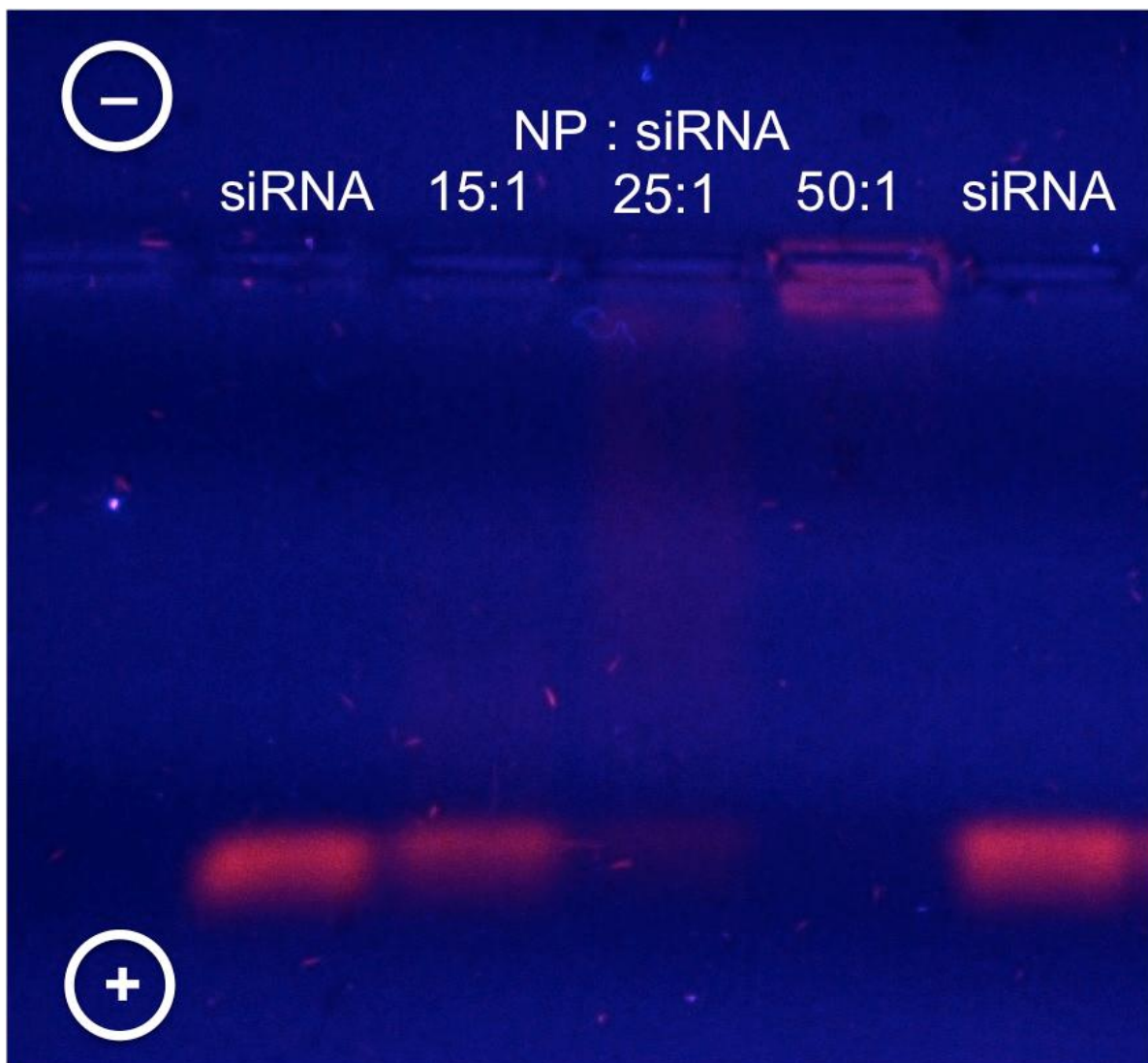


Abbildung 62: Agarosegel verschiedener untersuchten Partikel/siRNA Verhältnisse

Aus dem Gelbild ist zu erkennen, dass bei einem Verhältnis von LN247 : siRNA = 15 : 1 neben der komplexierten siRNA auch ein großer Anteil freier siRNA in der Partikellösung vorliegt. Bei einem Verhältnis von 25 : 1 erkennt man im Gel eine diffuse Bande (Gleichgewicht

zwischen freier siRNA und gebundener siRNA, die durch das elektrische Feld langsam herausdiffundiert wird), was für eine neutrale Absättigung des Partikels mit siRNA sprechen könnte. Erst bei einem Verhältnis von 50 : 1 ist durch den Überschuss an Partikel keine freie siRNA mehr detektierbar (sie befindet sich zusammen mit dem Partikel in der Probentasche). Es werden die Verhältnisse LN247 : siRNA = 15 : 1 und LN247 : siRNA = 25 : 1 in humanem Serum mittels DLS untersucht. Das Beladen des Partikels mit siRNA erfolgt in der Lichtstreuoküvette. Damit wird verhindert, dass durch den Filtrationsprozess bei der Beladung entstehende Aggregate entfernt werden. Da von elektrostatischen Wechselwirkungen der Partikel mit den Serumkomponenten ausgegangen wird, ist es wichtig den Ladungszustand der untersuchten siRNA-Partikel Mischungen abzuschätzen. Nach dem chemischen Ansatz ergibt sich ein theoretisches Verhältnis von sekundären Aminen im Nanopartikel (sek. Amin) zu dessen Masse (LN247) von 3.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ (vgl. Ansatz NP5 in [101]). Zudem sind je mg siRNA 3.1 μmol Phosphat vorhanden. Ausgehend von einer vollständigen Protonierung der sekundären Amine bzw. Deprotonierung der Phosphate ergibt sich so ein theoretisches Ladungsverhältnis von $\text{N}^+/\text{P}^- = 17 : 1$ für den Ansatz LN247 : siRNA = 15 : 1 und $\text{N}^+/\text{P}^- = 28 : 1$ für den Ansatz LN247 : siRNA = 25 : 1. Dieses Ladungsverhältnis ist allerdings nur theoretisch, da auf Grund des vorliegenden engen Maschennetzwerkes der untersuchten Strukturen nicht davon ausgegangen werden kann, dass alle Stickstoffe innerhalb des Hydrogels für die siRNA oberflächenpräsent sind. Zudem sind die pK_a -Werte nicht bekannt und es kann somit nicht genau festgelegt werden, wie viele der sekundären Amine protoniert vorliegen.

Das mit siRNA beladene Polymer wird für den Serumversuch unfiltriert durch eine vorgespülte Eppendorfpipettenspitze zum Serum gegeben. Die Partikelgröße bleibt bei Zugabe der siRNA konstant (LN247 : siRNA = 25:1 $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 24 \text{ nm}$, LN247 : siRNA = 15:1 $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 24.9 \text{ nm}$). Die Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius für beide Mischungsverhältnisse sind im Folgenden gezeigt.

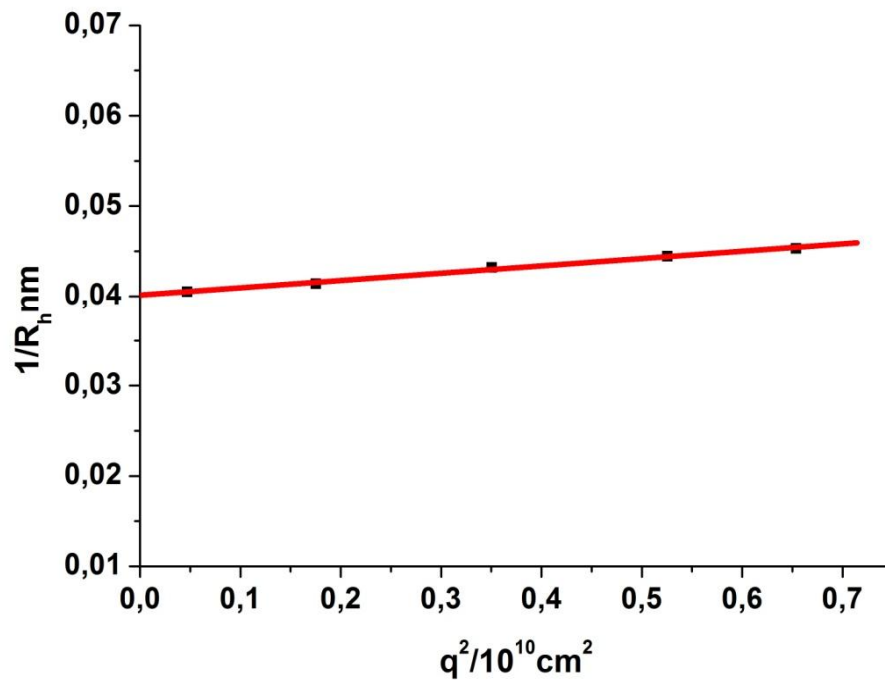


Abbildung 63: ■ Winkelabhängigkeit des inversen hydrodynamischen Radius der kationischen Nanohydrogelpartikel (LN247) mit siRNA (LN247 : siRNA = 25 : 1) in PBS-Puffer ($c= 0.05 \text{ mg/ml}$), -linearer Fit, $\langle 1/R_h \rangle_{z-1} = 24 \text{ nm}$, $T=293 \text{ K}$.

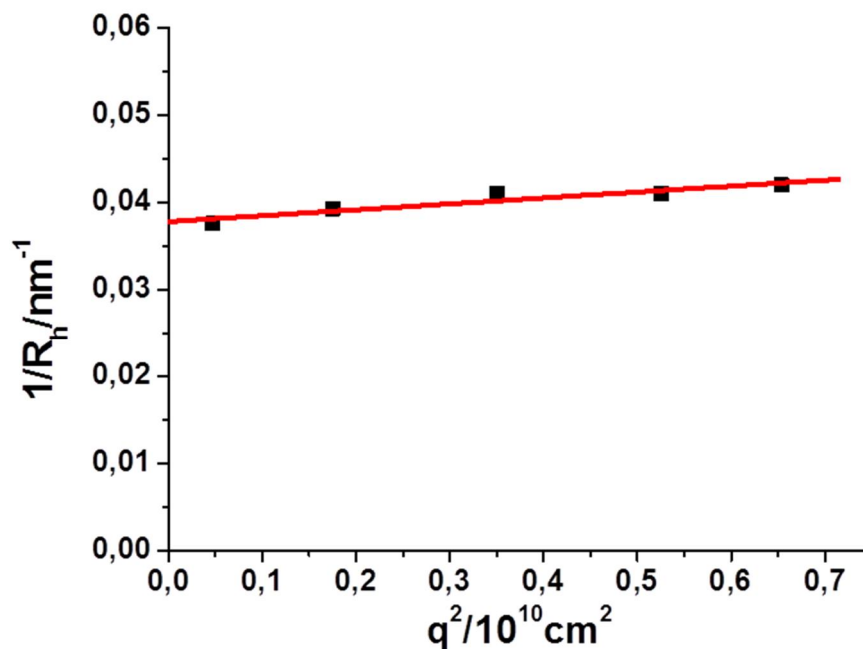


Abbildung 64: ■ Winkelabhängigkeit des inversen hydrodynamischen Radius der kationischen Nanohydrogelpartikel (LN247) mit siRNA (LN247 : siRNA = 15 : 1) in PBS-Puffer ($c=0.05 \text{ mg/ml}$), -linearer Fit, $\langle 1/R_h \rangle_{z-1} = 25 \text{ nm}$, $T=293 \text{ K}$.

Nach Beladung der Partikel mit siRNA im Verhältnis LN247 : siRNA = 25:1 ($N^+/P^- = 28 : 1$) ist Aggregation kaum nachweisbar. Im Gegensatz zum unbeladenen Polymer kann nach siRNA Beladung die Mischungsautokorrelationsfunktion durch Kombination der Autokorrelationsfunktionen der Einzelkomponenten ausreichend gut beschrieben werden (Abbildung 65). Die Fitfunktion nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) liegt perfekt auf den Datenpunkten, allerdings weist das Residuum eine kleine Abweichung auf. Der Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ (Gl.5-4) liefert eine zusätzliche Mode mit $R_{h,Agg} = 20$ nm. Da dieser Radius in etwa dem Radius des Nanohydrogels, bzw. der mittleren Größenfraktion des humanen Serums (vgl. Abbildung 20) entspricht, wird diese Abweichung als Fitartefakt interpretiert. Es entstehen hier keine Aggregate mehr die einen deutlich größeren Radius besitzen als die ursprünglichen Komponenten.

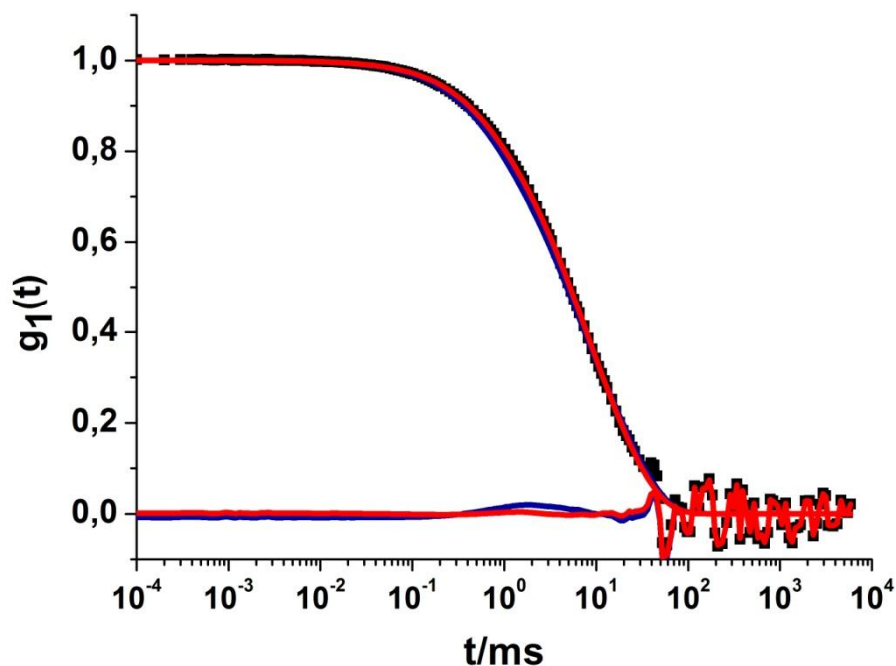


Abbildung 65: Multikomponentenanalyse von kationisch geladenen Partikel ($c = 0.05\text{g/L}$) beladen mit siRNA in humanem Serum ($c=30\text{g/L}$) (LN247:siRNA = 25:1): \blacksquare Daten der Mischungsautokorrelationsfunktion, $-$ Fit nach $g_1(t)_m$ und zugehöriges Residuum, $-$ Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ und zugehöriges Residuum, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8$ nm, $T=293$ K.

Im Gegensatz hierzu werden Aggregate in der Größenordnung von $R_{h,Agg} = 214$ nm bei Untersuchung der beladenen Partikel im Verhältnis LN247:siRNA = 15:1 ($N^+/P^- = 17:1$) gefunden (Abbildung 66).

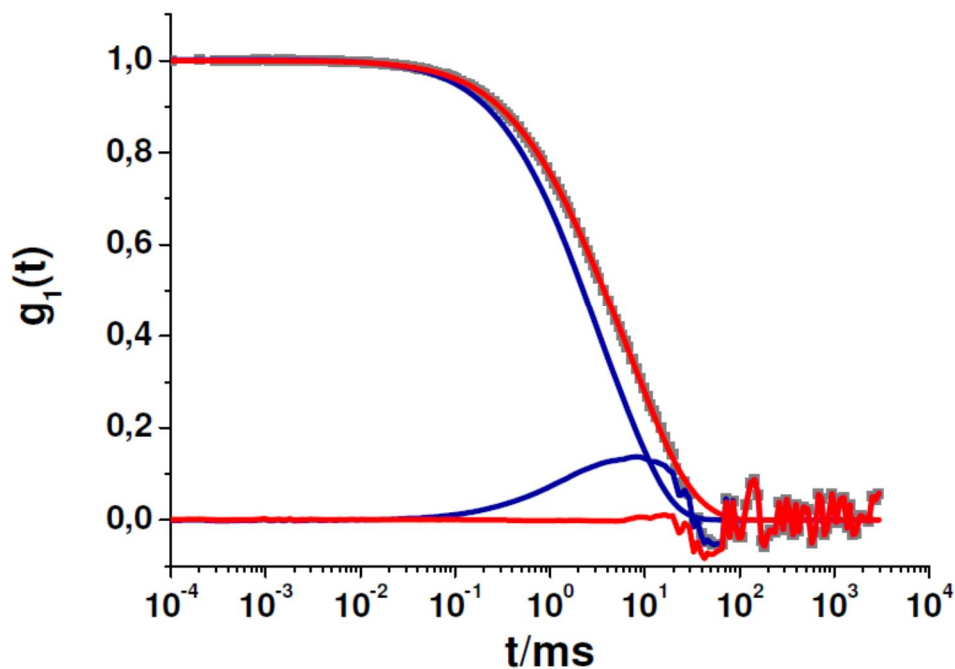


Abbildung 66: Multikomponentenanalyse von kationisch geladenen Partikel ($c = 0.05\text{g/L}$) beladen mit siRNA in humanem Serum ($c=30\text{g/L}$) (LN247:siRNA = 15:1): \blacksquare Daten der Mischungsautokorrelationsfunktion, $-$ Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) und zugehöriges Residuum, $-$ Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ (Gl.5-4) und zugehöriges Residuum, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8\text{ nm}$, $T=293\text{ K}$.

Da es sich bei dem letzteren Fall um Nanohydrogele handelt die mit mehr siRNA beladen sind als im vorherigen Beispiel, ist davon auszugehen, dass an der Oberfläche noch weitere siRNA Moleküle adsorbiert vorliegen, die den Partikel stärker negativ geladen vorliegen lassen. Wenn also nur Aggregation zwischen der kationischen Partikeloberfläche und anionischen Proteinen stattfinden würde, wäre im Verhältnis LN247:siRNA = 15:1 ($N^+/P^- = 17:1$) keine Aggregation zu erwarten, wie beim Verhältnis LN247:siRNA = 25:1 ($N^+/P^- = 28:1$).

Damit muss als Ursprung der Aggregation eher von zusätzlichen Wechselwirkungen ausgegangen werden, da durch Komplexierung Partikel/siRNA und Ladungskompensation eine formal neutral oder sogar negativere Bruttoladung im Falle 15:1 ($N^+/P^- = 17:1$) vorliegen könnte, die dann mit kationischen oder hydrophoben Serumbestandteilen interagieren würde.

5.3.3.3. Zusammenfassung und Diskussion

Relativ monodisperse kationische Nanohydrogelpartikel mit $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 24.4$ nm werden bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum, sowie in einer Lösung aus überwiegend anionischen Serumproteinen untersucht. In humanem Serum bilden die Partikel Aggregate in der Größenordnung von $R_{h,Agg} = 300$ nm, in der anionischen Proteinlösung Aggregate mit $R_{h,Agg} = 200$ nm.

Nach Beladung mit siRNA werden die Partikel erneut in humanem Serum mittels DLS untersucht. Im Verhältnis LN247 : siRNA = 25 : 1, bei welchem eine Absättigung der Partikel mit siRNA vorhanden zu sein scheint, findet keine Aggregation in humanem Serum statt, wohingegen in einem Beladungsverhältnis von LN247 : siRNA = 15 : 1 Aggregate mit $R_{h,Agg} = 214$ nm detektiert werden.

Somit ist davon auszugehen, dass sowohl der unbeladene Partikel mit positiv geladener Oberfläche, als auch der weniger positive bis negative Partikel-siRNA-Komplex (LN247 : siRNA=15 : 1) zur Aggregation im Serum neigt. Der neutrale Partikel, mit ausgeglichener Nettoladung, aggregiert nicht mit den Proteinen des Blutserums. Der mit siRNA übersättigte Partikel mit dem Mischungsverhältnis 15:1 im Serum wiederum führt zu einer deutlichen Aggregation. Da sich die Größe nach Beladung des Partikels mit siRNA nicht verändert (vgl. Abbildung 63, Abbildung 64), kann das letztere Aggregationsverhalten auf Unterschiede der Ladungen auf der Nanopartikeloberfläche oder der Hydrophobizität zurückgeführt werden. Bei übersättigter Komplexierung von Partikel mit siRNA erhöht sich zum einen die negative Bruttoladung auf dem Partikel, zum anderen kann auch der hydrophobe Charakter im Vergleich zu 25 : 1 steigen (vergleiche das Absinken im theoretischen N^+/P^- Verhältnis). Der reine Nanohydrogel Partikel scheint somit auf Grund von elektrostatisch induzierten Wechselwirkungen zu aggregieren. Dies kann durch Absättigung mit siRNA ungedrückt werden, wohingegen nach siRNA Überbeladung zusätzliche Effekte einen Einfluss auf die Wechselwirkungen mit dem Serum haben.

Um allerdings eine exakte Aussage über den Anteil von hydrophoben Effekten und Ladungszustand auf das Aggregationsverhalten des diskutierten Systems machen zu können, wären es notwendig die tatsächliche Oberflächenladung der Systeme zu bestimmen. Dies kann beispielsweise über Zetapotential Messungen erfolgen. Da im Moment das angenommene Ladungsverhältnis alle vorhandenen sekundären Amine mit einbezieht, es

aber völlig unklar ist, wie viele reale Ladungen oberflächenpräsent sind, ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen elektrostatischem und hydrophobem Einfluss nur bedingt möglich.

Vergleicht man die hier erhaltenen Ergebnisse mit einem Modellsystem von succinyliertem PLL⁸ kann ein ähnliches Verhalten beobachtet werden: Durch Succinylierung werden positive Aminogruppen des Polylysins teilweise durch negative Carboxylgruppen ersetzt, was zu einem zwitterionischem Charakter des Gesamtpolymers führt. Ab einem gewissen Grad wiederum überwiegt nach übermäßiger Succinylierung die negative Nettoladung des Gesamtpolymers. Die folgende Tabelle stellt die von Sabine Gietzen synthetisierten Succinylierungsgrade sowie die Größen der entstehenden Aggregate und deren jeweiligen Intensitätsbeitrag zur Gesamtintensität der Mischung aus Serum, Partikel und Aggregat dar.

Tabelle 15: Aggregation von succinyliertem PLL (sucPLL) in humanem Serum, R_h der verschiedenen Succinylierungsgrade sowie der entstehenden Aggregate und des Serums, Angabe der Anteile von Aggregat Serumproteinmischung und Polymer an der Gesamtintensität in %

30°	Rh/nm (Serum)	I % Rh (Serum)	Rh/nm (sucPLL)	I % Rh (P)	Rh/nm (Aggregat)	I % Rh (Aggregat)
PLL	34.7	0.46	2.5	0.01	595	0.53
37%-succ	39.0	0.67	2.6	0	729	0.33
49%-succ	35.2	0.91	2.4	0.01	288	0.08
60%-succ	35.4	0.83	2.1	0.01	300	0.16
70%-succ	35.4	0.76	2.1	0	298	0.24
100%-succ	34.7	0.70	2.9	0	238	0.30

Zunächst wird deutlich, dass mit zunehmender negativer Ladungszahl und abnehmender positiver Ladungszahl die Aggregatgröße deutlich abnimmt. Bei einem 50%igem Succinylierungsgrad, also einer scheinbaren Ladungsneutralisierung, liegt die Amplitudenintensität des Aggregates auch bei kaum detektierbaren 8%. Zwischen den Succinylierungsgraden von 60-100% ist dagegen erneut eine Zunahme des Intensitätsanteils der Aggregate bei gleichbleibender Aggregatgröße festzustellen.

⁸ Synthetisiert und charakterisiert von Sabine Gietzen, AK Schmidt, Institut für Physikalische Chemie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Somit zeigt dieses Modellsystem ein ähnliches Verhalten wie die zuvor diskutierten mit siRNA beladenen kationischen Nanohydrogelpartikel (übermäßige Aggregation mit den Serumproteinen bei sowohl negativem als auch positivem Ladungsüberschuss). Allerdings ist hier der Einfluss der Hydrophobizität zu vernachlässigen, da die Einführung einer Carboxylgruppe die Hydrophilie des Systems erhöhen wird und die Ladungsneutralisierung in dieser Struktur keinen Einfluss auf die Gesamthydrophobizität des Systems vermuten lässt. Dies lässt den Schluss zu, dass das Ladungsverhältnis einen deutlichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten eines Partikels hat. Auch können kationische sowie anionische Strukturen aggregatbildende Wechselwirkungen eingehen, wohingegen Strukturen mit ausgeglichener Ladung eher inert zu sein scheinen.

Dies bestätigen auch die unter Anhang B4 und B5 diskutierten Systeme. Sowohl das zwitterionische Poly- ϵ -methacryloyl-L-lysine (PMALys) (Anhang B5), als auch DNA Komplexe mit Polymerbürsten mit Polyvinylpyridinum Seitenketten (Anhang B4) aggregieren nicht in humanem Serum. Die entsprechenden Graphen sind in Anhang B4 und B5 gezeigt. Auch in der Literatur wird insbesondere die positive Eigenschaft von zwitterionischen Polybetainen auf die Stabilität in biologischen Systemen diskutiert [102-103].

Weitere Beispiele aus der Literatur bestätigen, dass sowohl positiv geladene Polystyrol Nanopartikel, als auch negativ geladene Silica Nanopartikel zu starker Proteinadsorption in humanem Serum neigen können [19, 104].

Die Identifikation der Proteinkomponenten welche die jeweiligen Aggregationsprozesse der Nanohydrogelpartikel vor und nach Beladung mit siRNA auslösen muss zukünftigen Versuchen vorbehalten bleiben. Ein erster Hinweis auf eine elektrostatische Wechselwirkung als Initiator der Aggregation wird durch das Verhalten der kationischen Nanohydrogelpartikel vor Beladung mit siRNA gegeben, da das unbeladene Nanohydrogel mit der anionischen Serumfraktion aggregiert. Es ist in weiteren Versuchen zu testen ob die anionische Proteinfraction ebenfalls zur Aggregation des beladenen Partikels führt (LN247:siRNA=15:1), da in der Literatur bereits die Adsorption von negativ geladenen Proteinen selbst auf negativen Silicaoberflächen diskutiert wurde [19]. Auch wäre eine Untersuchung des Aggregationsverhaltens in einer Mischung aus überwiegend kationischen Proteinen von Interesse.

Im Folgenden wird das hier diskutierte siRNA Delivery System mit dem unter 5.2. eingeführten und unter 5.3.2. bezüglich seiner Interaktion mit humanem Serum charakterisierten liposomalen siRNA-Delivery Systems verglichen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle nochmal als Übersicht dargestellt.

Tabelle 16: Übersicht und Darstellung der charakteristischen Eigenschaften verschiedener siRNA Delivery Systeme

Name	Eigenschaften	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	Ladungsverhältnisse	Aggregation in Serum
L-TF	Liposom aus DSPC, Cholesterol sowie dem kationischen Spermin Tensid	60 nm		Nein
L-TF-A	L-TF beladen im Inneren mit siRNA	62 nm	$9^+/1^-$	Nein
L-TF-B	L-TF beladen von außen mit siRNA	57 nm	$9^+/1^-$	Ja, 1 μm
LN427	Kationische Nanohydrogel Partikel, aminofunktionalierte Vernetzer	24 nm		Ja, $R_{h,Agg} = 300 \text{ nm}$
LN247 :siRNA = 15 : 1	LN247 im molaren Verhältnis 15:1 mit siRNA komplexiert	24.9 nm	$17^+/1^-$	Ja, $R_{h,Agg} = 214 \text{ nm}$

LN247 : siRNA = 25:1	LN247 molaren Verhältnis mit komplexiert	im 25:1 siRNA	24 nm	28 ⁺ /1 ⁻	Nein
-------------------------	--	---------------------	-------	---------------------------------	------

Die untersuchten Liposomen (TF) zeigen trotz Einbau des kationische Lipids eine nur leicht positive, nahezu neutrale Oberfläche (Zetapotential: $\xi = + 8$ mV; vgl. Tabelle 7). Neben den positiven Sperminköpfen besitzen die liposomalen Strukturen hydrophobe Gebiete gebildet durch das hydrophobe Cholesterol sowie das amphiphile DSPC, mit den hydrophilen formal negativ geladenen Phosphatkopfguppen sowie den hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänzen. Werden diese Liposomen im Inneren mit siRNA beladen (vgl. 5.2.2.) ist anzunehmen, dass sich die Oberflächenstruktur im Vergleich zum unbeladenen Liposom nur wenig verändert. Hingegen führt die Zugabe der negativ geladenen siRNA von außen auf vorgeformte Liposomen zu einer elektrostatischen Adsorption zwischen den negativen Phosphatkopfguppen der siRNA und den positiven Aminogruppen der Spermin-Tenside. Hierdurch kommt es zu einer Herabsetzung der Bruttoladung des Systems und damit zu einer gesteigerten Hydrophobizität der Liposomen. Man kann somit feststellen, dass mit gesteigerter Hydrophobizität des Systems eine gesteigerte Tendenz zur Aggregation auftritt.

Durch Herabsetzung der Bruttoladung induzierte Aggregation kann auch im zuvor diskutierten System beobachtet werden. LN247 : siRNA = 25 : 1 zeigt keine Aggregation in humanem Serum, LN247 : siRNA = 15 : 1 aggregiert hingegen.

Die Aggregation des unbeladenen Nanohydrogels scheint hingegen durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der anionischen Proteinfraction verursacht zu sein (vgl. 5.3.3.1). Es ist anzunehmen, dass die Nanohydrogelpartikel ein wesentlich stärker positives Zetapotential haben als die unbeladenen Liposomen (L-TF). Somit ist das Verhalten der unbeladenen Liposomen (L-TF) mit dem des abgesättigten Nanohydrogelpartikels (LN247 : siRNA = 25 : 1) zu vergleichen, beide Systeme zeigen keine Aggregation in humanem Serum.

5.3.4. Wechselwirkungen von p(HPMA)-co-p(LMA) mit humanem Serum

Es konnte gezeigt werden, dass amphiphile Strukturen aus p(HPMA)-co-p(LMA) (Abbildung 67) den Transport des hydrophoben Wirkstoffes Domperidon über die Bluthirnschranke ermöglichen [105].

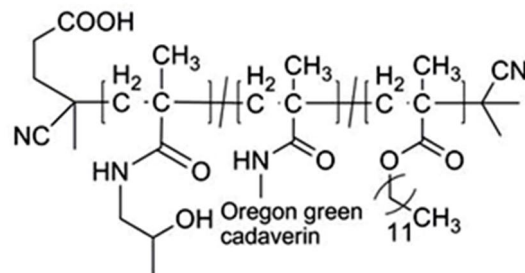


Abbildung 67: Strukturformel des p(HPMA)-co-p(LMA) Blockcopolymers

Charakteristische Eigenschaften des untersuchten Polymersystems sind in Tabelle 17 angeführt. In wässriger Lösung lagern sich die amphiphilen Copolymere zusammen und bilden Aggregate bestehend aus dem zur Modifikation eingetetzten hydrophoben Laurylmetacrylat und dem hydrophilen p(HPMA). Die hydrophoben Anteile dieser Polymeraggregate werden durch eine hydrophile Korona stabilisiert [106]. Im hydrophoben Kern der Strukturen können hydrophobe Wirkstoffe, wie beispielsweise Domperidon eingelagert werden, hierdurch wird der Wirkstoff in wässrige Lösung gebracht [107].

Es werden die Wechselwirkungen von p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymeren mit Humanserum, sowie die Veränderung der Interaktionen nach Einkapselung von Domperidon in die Polymerstruktur untersucht. Betrachtet werden hierbei zwei verschiedene Polymer-Wirkstoff Formulierungen mit 10 gew.% und 50 gew.% eingekapseltem Domperidon, wobei sich der prozentuale Anteil auf das Gewicht des Copolymers bezieht. Desweiteren werden das Copolymer, sowie die Copolymer-Domperidon Formulierungen in Lösungen verschiedener isolierter Serumkomponenten untersucht und die wechselwirkenden Proteinkomponenten identifiziert.

Tabelle 17: Charakterisierung der p(HPMA)-co-p(LMA) Co-polymere

HPMA:LMA Verhältnis	M_n (RE) (g/mol) ^b	M_w (RE) (g/mol) ^b	M_n (g/mol) ^c	PDI ^b
90:10	23000	27000	14000	1.18

a: Monomer Verhältnis erhalten durch ¹H NMR Spektroskopie b: Erhalten durch GPC in
c: Errechnet aus den Molekulargewichten des Reaktivester Precursor Polymers aus der GPC

5.3.4.1. Wechselwirkungen mit Humanserum

Die ACFs der p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymere, sowie die der Formulierungen des Copolymers mit 10gew% bzw. 50gew.% Domperidon können durch eine biexponentielle Fitfunktion beschrieben werden.

$$g_{1,np}(t) = a_{1,np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,np}}\right) + a_{2,np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,np}}\right)$$

In Tabelle 18 sind die z-gemittelten hydrodynamischen Radien der p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymere sowie die der Formulierungen mit Domperidon angeführt. Der gemittelte hydrodynamische Radius des reinen Copolymers setzt sich aus dem Fastmode der einzelnen Polymerketten ($R_h = 4$ nm) sowie einem langsameren Mode der Polymeraggregate ($R_h = 30$ nm) zusammen. Diese beiden Größen repräsentieren ein Gleichgewicht zwischen freien Copolymerketten und Copolymeraggregaten [108]. Der z-gemittelte hydrodynamische Radius der Copolymer-Domperidon Formulierungen liegt bei $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 49$ nm (50gew.% Domperidon), bzw. $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 39$ nm (10gew.% Domperidon). In diesen Formulierungen können keine isolierten Polymerketten mittels DLS detektiert werden. Das Gleichgewicht wurde vollständig in Richtung der Polymeraggregate verschoben, was auf eine Stabilisierung des hydrophoben Kerns durch das selbst hydrophobe, wasserunlösliche Domperidon zurückgeführt werden kann.

Tabelle 18: hydrodynamische Radien von p(HPMA)-co-p(LMA) sowie der Copolymer-Domperidon Formulierungen, $c(\text{Polymer}) = 0.1$ g/L für alle Formulierungen, $c(\text{Domperidon}) = 0.05$ g/L (50gew.%) und 0.01 g/L (10gew.%), in 0.152 M NaCl, $T = 293$ K

p(HPMA)-co-p(LMA)	5 ($R_{h1} = 4$; $R_{h2} = 30$)
p(HPMA)-co-p(LMA) 50 w% DOM	49
p(HPMA)-co-p(LMA) 10 w% DOM	39

Wie unter 4.1.4. beschrieben kann durch Kombination der Autokorrelationsfunktion von Serum und Copolymer, bzw. der Copolymer-Domperidon Formulierungen das Aggregationsverhalten in humanem Serum untersucht werden. Die Konzentration des Copolymers, sowie der Copolymer-Domperidon Formulierungen wurde entsprechend bereits publizierter *in vivo* Tests zu 0.1 mg Copolymer auf 1 ml Serum ($C_{\text{Serum}} = 59 \text{ mg/ml}$) gewählt [107].

Die Mischungskorrelationsfunktion des Copolymers in Serum zeigt eine zusätzliche Relaxation bei längeren Korrelationszeiten mit $R_{n,\text{Agg}} = 160 \text{ nm}$ (Abbildung 68). Somit kann auf eine aggregationsbildende Wechselwirkung zwischen dem amphiphilen Copolymer und Komponenten des Humanserums geschlossen werden.

Im Gegensatz dazu können die Mischungskorrelationsfunktionen beider Copolymer-Domperidon Formulierungen durch den Forcefit beschrieben werden. Somit kommt es nach Beladung mit Domperidon zu keinen bzw. vernachlässigbaren Interaktionen mit Serumproteinen. Dies ist leicht verständlich, führt doch die Konzentrierung der hydrophoben Anteile im Partikelkern und die Lokalisation der hydrophileren Anteile in der äußeren Hülle zur sterischen Abschirmung und damit hydrophil sterischen Stabilisierung, verursacht auch hier durch die hohe lokale Konzentration an Hydroxygruppen aus dem Comonomer HPMA. Auch nach 24h entstehen keine Aggregate zwischen Domperidon und Serum (vgl. Anhang B6).

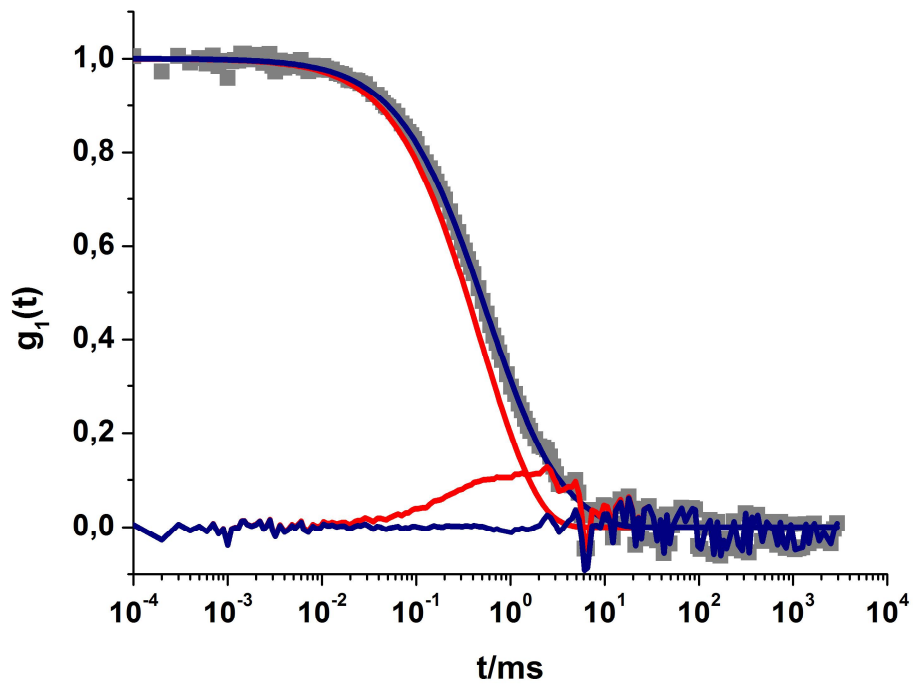


Abbildung 68: ■ Datenpunkte der AKF von p(HPMA)-co-p(LMA) in Humanserum; - Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) und zugehöriges Residuum; - Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ (Gl. 5-4) und zugehöriges Residuum; Streuwinkel 30° , $\lambda = 236 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$.

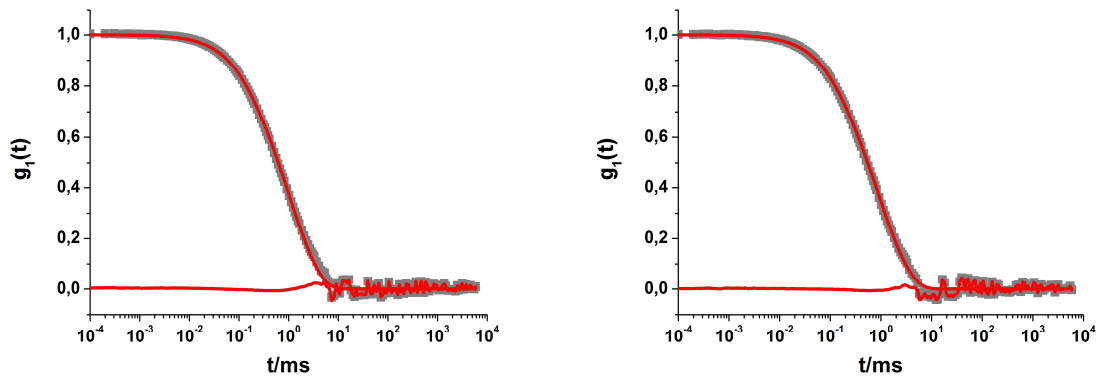


Abbildung 69: ■ AKF von p(HPMA)-co-p(LMA) beladen mit (links) 50 gew.% Domperidon, (rechts) 10 gew.% Domperidon in Humanserum, - fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) und zugehöriges Residuum, Streuwinkel 60° , $T=293 \text{ K}$

5.3.4.2. Identifikation der wechselwirkenden Serumkomponenten

Zur Identifikation der wechselwirkenden Komponenten des humanen Serums, werden das Copolymer sowie die beiden Copolymer-Domperidon Formulierungen in isolierten Lösungen von humanem Albumin, VLDL und LDL mittels DLS charakterisiert.

Auch wird Serum, aus dem VLDL entfernt wurde mit den Systemen untersucht. Die Copolymer-Domperidon Formulierungen zeigen in keiner der untersuchten Lösungen aggregatbildende Wechselwirkungen (Tabelle 19). Das reine Copolymer alleine wechselwirkt mit VLDL, wobei Aggregate in der Größenordnung von $R_{h,Agg} = 109$ nm gebildet werden. Es handelt sich hierbei um eine VLDL spezifische Interaktion, da das Copolymer in humanem Serum, aus dem VLDL entfernt wurde keine aggregatbildenden Wechselwirkungen zeigt. Auch in einer Mischung des Copolymers mit LDL entstehen keine Aggregate (vgl. Anhang B6).

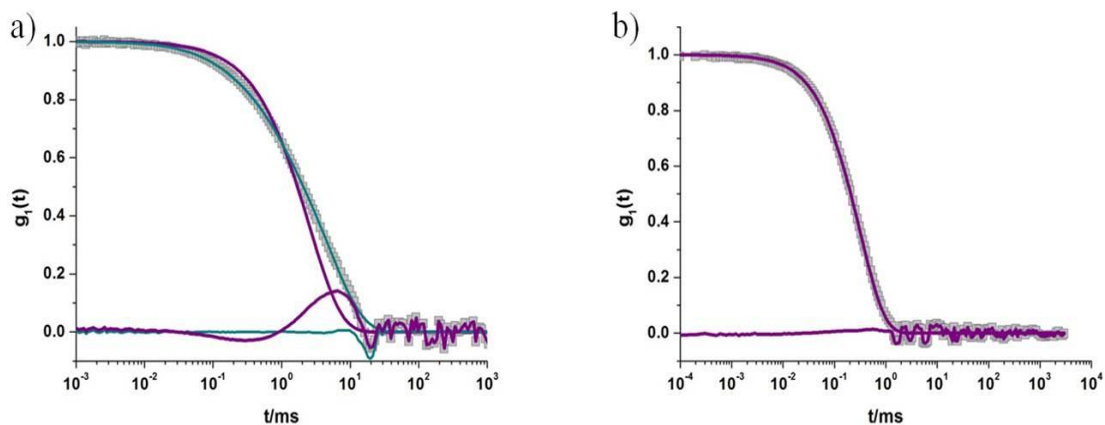


Abbildung 70: ■ Datenpunkte der AKF von p(HPMA)-co-p(LMA) (links) in konzentrierter VLDL Lösung, (rechts) in humanem Serum ohne VLDL, - Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl. 5-3) und zugehöriges Residuum, - Fit nach $g_1(t)_{m+a}$ (Gl.5-4) und zugehöriges Residuum, Streuwinkel 60° , $\lambda = 236$ nm, $T = 293$ K.

Ebenso mit Albumin ist keinerlei aggregatbildende Wechselwirkung mit DLS nachweisbar (vgl. Anhang B6). Die Wechselwirkung mit VLDL bzw. Serum fehlt dann im Gemisch der Copolymer mit Domperidon völlig, was ebenfalls auf einen eher hydrophoberen Charakter der Wechselwirkung des reinen Copolymers mit VLDL hinweist.

Tabelle 19: Übersicht der Wechselwirkungen von p(HPMA)-co-p(LMA) vor und nach Beladung mit Domperidon mit Humanserum, sowie Komponenten des Humanserums, $c_{\text{Serum}}=28\text{g/L}$, $c_{\text{Polymer}}=0.1\text{g/l}$ und $c_{\text{Domperidon}}=0.05\text{g/L}$ (50gew.%) bzw. 0.01g/L (10gew.%).

Polymer Formulierung	Aggregat Serum ^a	Aggregat VLDL ^b	Aggregat LDL ^b	Aggregat Serum ohne VLDL.	Aggregat Albumin ^b
HPMA-co-LMA	Ja (160nm)	Ja (109nm)	Nein	Nein	Nein
HPMA-co-LMA 50 w% DOM	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
HPMA-co-LMA 10 w% DOM	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

5.3.4.4. Wechselwirkungen von höher molekularen HPMA-co-LMA Copolymeren mit humanem Serum

Neben dem zuvor diskutierten HPMA-co-LMA Copolymer mit einem Molekulargewicht von 13500 g/mol wurde auch ein höher molekulares HPMA-co-LMA⁹ in humanem Serum charakterisiert. Das Molekulargewicht dieses statistischen Copolymers beträgt $M_n = 39000$ g/mol. Es wurde mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) gezeigt, dass dieses Copolymer in wässriger Lösung Aggregate in der Größenordnung von 40 nm bildet [109].

Im Gegensatz zu dem zuvor diskutierten System ist hier somit das Gleichgewicht zu den hydrophoben Aggregaten hin verschoben, die Lichtstreuung liefert hier keinen Hinweis auf die Präsenz von Unimeren. Dieses Verhalten kann auch mittels DLS bestätigt werden. Man erhält einen hydrodynamischen Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 41$ nm (Abbildung 71).

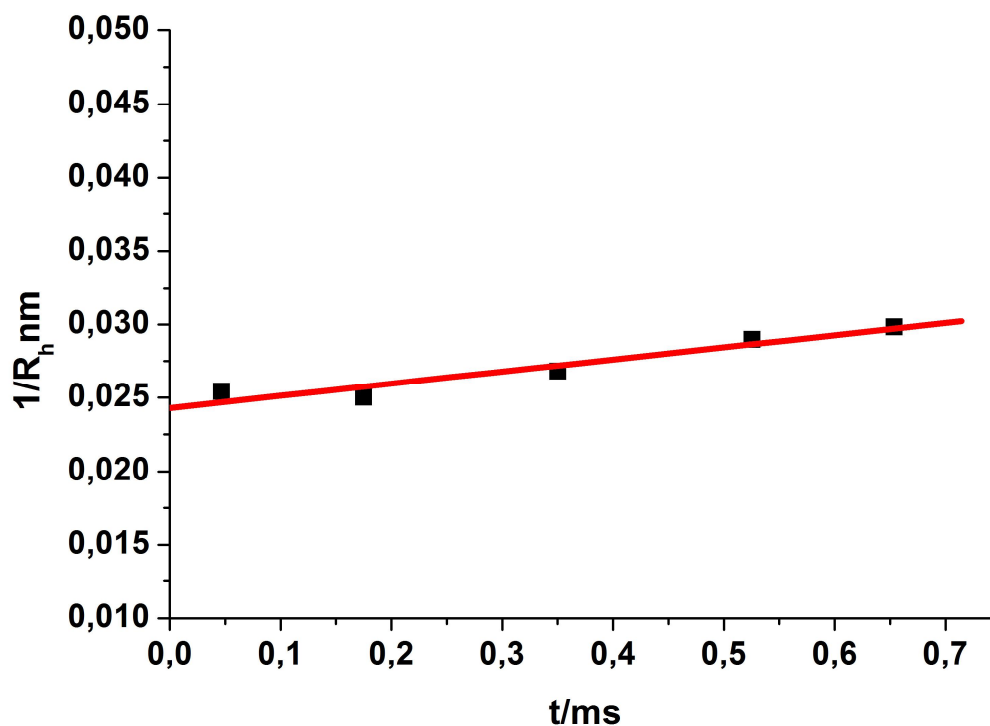


Abbildung 71: ■ Winkelabhängigkeit des inversen hydrodynamischen Radius von HPMA-co-LMA ($M_n = 39000$ g/mol) in 0.152 M NaCl, $c = 0.0625$ mg/ml, -linearer Fit, $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

Das untersuchte statistisch verteilte Copolymer wurde bezüglich seiner Blutzirkulationszeit und Körperverteilung in *in vivo* Experimenten untersucht. Es zeigt gegenüber dem Homopolymer eine relativ lange Zirkulationszeit im Blutkreislauf. Nach ca. 2 Stunden können

⁹ Copolymer synthetisiert von Mareli Allmeroth, AK Zentel, Johannes-Gutenberg Universität Mainz

noch 60% des Copolymers im Blutkreislauf detektiert werden. Auch ist die Anreicherung dieses Partikels in der Leber sehr gering [109]. Mittels DLS können keine Aggregate in humanem Serum in der *in vivo* respektiven Konzentration über einen Zeitraum von 24 Stunden detektiert werden (Abbildung 72). Auch in einer Albuminlösung entstehen keine Aggregate. Dieses Ergebnis schließt allerdings nicht aus, dass eine Adsorption von Albumin auf der Polymeraggregat Oberfläche stattgefunden hat. Eine Monoschicht von Albumin kann mittels DLS nicht detektiert werden. Da Albumin zur Klasse der Dysopsonine gehört würde es zu einer verminderten Aufnahme der Strukturen in Makrophagen und damit zu einer verminderten Anreicherung in der Leber führen. Diese These muss allerdings in zukünftigen Versuchen genauer untersucht werden.

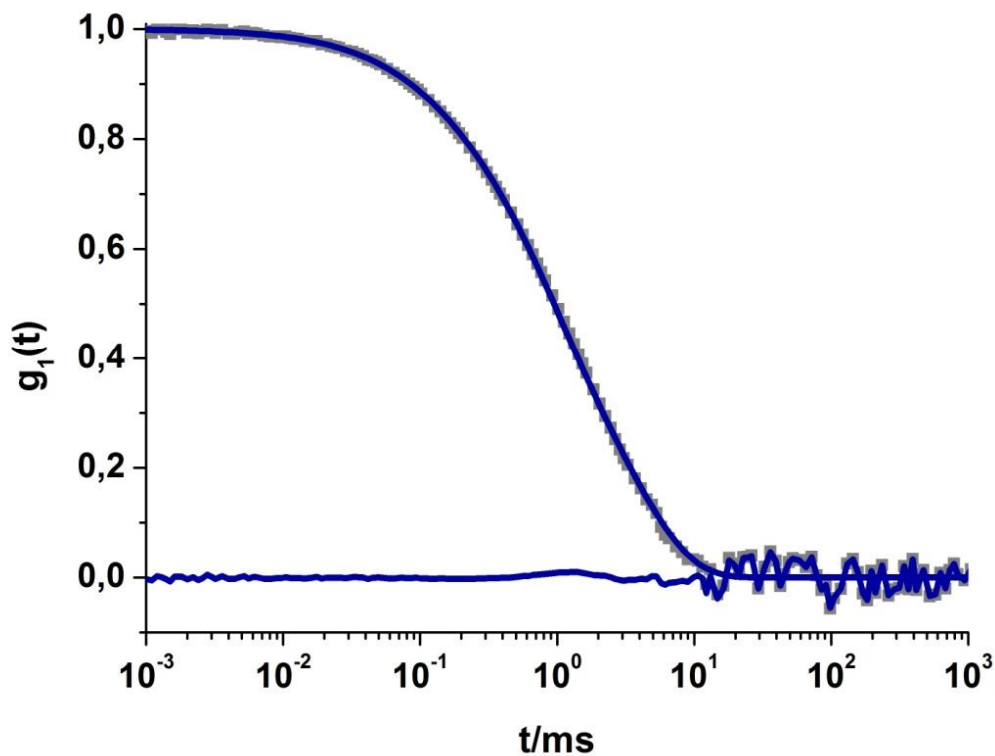


Abbildung 72: HPMA-co-LMA ($M_n = 39000$ g/mol) in humanem Serum ($c_{\text{Serum}} = 30$ mg/ml, $c_{\text{HPMA-co-LMA}} = 0.0625$ mg/ml): \blacksquare AKF der Mischung, $-$ Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) der Mischung aus Liposomen und Serum und zugehöriges Residuum, Streuwinkel 60° , $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

5.3.4.5. Zusammenfassung und Diskussion

Es kann gezeigt werden, dass p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymere mit einem Molekulargewicht von 13500 g/mol in humanem Serum Aggregate in der Größenordnung von $R_{h,Agg} = 160\text{nm}$ bildet.

Das Lipoprotein VLDL kann als Aggregation induzierende Serumkomponente identifiziert werden. Nach Beladung des Copolymers mit dem hydrophoben Wirkstoff Domperidon findet keine Aggregation mehr statt.

Alle Systeme werden über einen Zeitraum von 24h beobachtet und es treten keine Veränderungen im beschriebenen Zeitraum hinsichtlich des Aggregationsverhaltens auf. Die Wechselwirkungen des Copolymers mit VLDL, welche das Apolipoprotein ApoE auf der Oberfläche gebunden hat sind von besonderem Interesse, da ein Zusammenhang zwischen ApoE Interaktion und Bluthirnschrankentransport in der Literatur diskutiert wird [110-111].

VLDL und Lipoproteine im Allgemeinen können auf Grund ihrer amphiphilen Struktur mit hydrophoben Wirkstoffen und amphiphilen Polymeren assoziieren. Die Funktion von Lipoproteinen im Körper besteht im Transport von hydrophoben Lipiden, Fettsäuren und Cholesterol durch den Körper [33].

In neuerer Literatur wurde diskutiert, dass die Proteinkomponenten der Lipoproteine, insbesondere die Apolipoproteine ApoE und ApoA an Poly(n-butylcyanoacrylat) (PBCA) Nanopartikel binden und über Wechselwirkung mit dem ApoE Rezeptor deren Transport über die Bluthirnschranke fördern [111]. Das hier diskutierte System unterscheidet sich strukturell von den in der Literatur diskutierten PBCA Nanopartikeln. Es handelt sich bei den p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymeren um wasserlösliche Polymere mit hydrophober Modifikation. Diese Strukturen lagern sich zusammen und formen hierbei hydrophobe Gebiete die von aufgequollenen Schleifen der hydrophilen pHPMA Ketten umgeben sind. Diese Struktur neigt zur Assoziation von einer oder mehreren Polymerketten mit den amphiphilen Lipoproteinen. VLDL besteht überwiegend aus Triacylglycerol sowie den Apolipoproteinen ApoB und ApoE. Durch einen enzymgesteuerten Prozess wird das VLDL in LDL umgewandelt. Hierbei wird Triacylglycerol als freie Fettsäure freigesetzt, es reichern sich die Cholesterolester an und ApoE wird abgespalten [33].

Auf Grund der Tatsache, dass keine aggregatbildenden Wechselwirkungen mit LDL stattfinden aber eine spezifische Interaktion zwischen dem Copolymer und VLDL festgestellt werden kann, ist anzunehmen, dass die Wechselwirkung zwischen hydrophobem ApoE und den hydrophoben Laurylketten des Copolymers stattfinden. Da gezeigt werden konnte, dass p(HPMA)-co-p(LMA) den Transport des hydrophoben Wirkstoffes Domperidon über die Bluthirnschranke vermittelt und ApoE als Vermittler des Bluthirnschrankentransportes von PBCA Nanopartikeln identifiziert werden konnte [107, 111], kann auf einen möglichen Zusammenhang der Wechselwirkungen mit VLDL und Bluthirnschrankentransport geschlossen werden. Eine Assoziation von p(HPMA)-co-p(LMA) welches einen Großteil des gebundenen Domperidon freigesetzt hat und VLDL könnte somit ein Teil des Mechanismus des Bluthirnschrankentransportes dieses Systems sein.

Auch kann eine Assoziation an VLDL zu einer Verlängerung der Plasmazirkulationszeit führen, da 70% des VLDL im Blutkreislauf verbleiben und dabei langsam in LDL umgewandelt werden (vgl.3.1.2.).

Ein höher molekulares statistisches HPMA-co-LMA Copolymer ($M_n = 39000 \text{ g/mol}$) bildet in wässriger Lösung stabile hydrophobe Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 41 \text{ nm}$ aus. Im Gegensatz zum niedermolekularen System sind hier die hydrophoben Laurylketten im Inneren des polymeren Aggregates versteckt, die Struktur weist damit eine dem zuvor diskutierten HPMA-co-LMA Domperidon Komplex ähnliche Oberfläche auf. Das höher molekulare HPMA-co-LMA Copolymer bildet keine Aggregate mit Komponenten des humanen Serums aus, zudem zeigt es eine lange Plasmazirkulationszeit und wird nicht bevorzugt in der Leber angereichert [109]. Das Verhalten dieses Copolymers in humanem Serum korreliert somit mit den Ergebnissen der *in vivo* Versuche.

Auch werden Polystyrol –und Polylactidnanopartikel mit p(HPMA)-co-p(LMA) als Tensid mittels Miniemulsionstechnik hergestellt¹⁰ und bezüglich ihrer Aggregation in humanem Serum untersucht. Informationen zu diesem System sowie die Diagramme zum Verhalten in humanem Serum sind in der entsprechenden Publikation [112] zu finden. Hier ist nur der hydrophile HPMA Anteil der wässrigen Lösung, also dem Serum zugewandt, die Systeme zeigen keine Aggregation in humanem Serum.

¹⁰ Synthese durchgeführt von Annette Kelsch, AK Zentel, Institut für organische Chemie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass genaue Untersuchungen der Serumsinteraktionen helfen das Verhalten von polymeren Systemen bei *in vivo* Applikation abzuschätzen, chemisch strukturell zu interpretieren und dann auch zu prognostizieren.

5.3.5. Korrelation des Aggregationsverhaltens in humanem Serum mit den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Systeme

Die untersuchten nanopartikulären Wirkstoffsysteme werden nun bezüglich Größe, Nettoladung sowie Hydrophobizität in Gruppen eingeteilt und diskutiert, da diese Parameter den größten Einfluss auf die Biokompatibilität sowie Toxizität der Nanopartikel zu haben scheinen [113].

5.3.5.1. Einteilung der Nanopartikel nach Größe

Es werden in dieser Arbeit polymere Systeme im Größenbereich von minimal $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 5$ nm (p(HPMA)-co-p(LMA)) bis maximal $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 170$ nm (PS-SDS) untersucht und es können in allen Größenbereichen aggregierende sowie nicht aggregierende Strukturen beobachtet werden. Betrachtet man beispielsweise die in der nächsten Tabelle angeführten Partikel, die im Größenbereich zwischen $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 81$ und 123 nm liegen, fällt auf, dass alleine über die Größe keine definitive Aussage über das Aggregationsverhalten eines Partikels getroffen werden kann.

Tabelle 20: Hydrodynamischer Radius und Aggregationsverhalten in humanem Serum für verschiedene Partikel

Partikel	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	Aggregation in Serum
PS-LUT*	96 nm	Ja, $R_{h,Agg} = 200$ nm
PS-LUT-NH ₂ *	89 nm	Nein
PS-LUT-COOH*	81 nm	Ja, $R_{h,Agg} = 250$ nm
L1# (EPC, Cholesterol)	90 nm	Ja, $R_{h,Agg} = 900$ nm
L2# (EPC, Cholesterol, 5% hyperverzweigtes Polyglycerol)	99 nm	Ja, $R_{h,Agg} = 600$ nm
L3# (EPC, Cholesterol, 10% hyperverzweigtes Polyglycerol)	97 nm	Ja, $R_{h,Agg} = 200$ nm
PVP-DNA°	123 nm	Nein

*vgl. 5.3.1., # vgl. 5.3.2.2., ° vgl. Anhang B3

Dies wird auch bei Betrachtung des unter 5.3.3. diskutierten Systems deutlich. Die kationischen Nanohydrogele besitzen vor, sowie nach Beladung mit siRNA eine Größe von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 24$ nm \pm 10%. Allerdings zeigen diese Systeme, je nach Beladungszustand mit siRNA bei nahezu identischer Größe ein unterschiedliches Aggregationsverhalten in humanem Serum.

Tabelle 21: Hydrodynamischer Radius und Aggregationsverhalten in humanem Serum für LN247 mit und ohne siRNA (vgl. 5.3.3.)

Partikel	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	Aggregation in Serum
LN247	24.4 nm	Ja, $R_{h,Agg} = 300\text{nm}$
LN247 :siRNA = 25 :1	24 nm	Nein
LN247 : siRNA = 15 : 1	24.9 nm	Ja, $R_{h,Agg} = 214\text{ nm}$

5.3.5.2. Einteilung der Nanopartikel nach Oberflächennettoladung

Die Beurteilung der Nanopartikel nach ihrer Oberflächenladung ist schwierig, da für die meisten Strukturen der exakte Ladungszustand der Partikeloberfläche in Gegenwart des humanen Serums nicht bekannt ist. In der Literatur wird insbesondere der Einfluss der Oberflächenladung auf die Proteinkorona als wichtiger Parameter diskutiert [17, 51, 114-115]. Vergleicht man die Partikel für welche das Zetapotential bekannt ist fällt auf, dass insbesondere die Partikel mit stark negativem Zetapotential zu starker Aggregation in Serum neigen, wohingegen Partikel mit nur leicht negativem und leicht positivem Zetapotential zur Ausbildung von kleineren Aggregaten bzw. keiner Aggregation führen.

Tabelle 22: Zetapotentiale sowie Aggregationsverhalten von ausgewählten Partikeln in humanem Serum.

Partikel	Zetapotential	Aggregation in Serum
PS-LUT*	-9	Ja, 200 nm
PS-LUT-NH2*	4	Nein
PS-LUT-COOH*	-29	Ja, 250nm
PS-SDS*	-37	Ja, 2 μm
L-TF*	-8	Nein

* vgl. 5.3.1., vgl. 5.3.2.

Interessanterweise zeigen ladungsausgeglichene Strukturen keine Aggregation in humanem Serum (DNA-PVP-Komplexe, Poly- ϵ -methacryloyl-L-lysine (PMALys)). Auch in der Literatur wird insbesondere die positive Eigenschaft von Polybetainen auf die Stabilität in biologischen Systemen diskutiert [102-103]. Diese erhöhte Stabilität wird auch bei Betrachtung des Modellsystems von succinyliertem PLL deutlich (Tabelle 15). Die geringste Aggregation zeigen hier Partikel, in welchen etwa die Hälfte der positiven Ladungen durch negative Carboxylgruppen ersetzt wurde. Im Gegensatz dazu verhält sich das in früherer Arbeit synthetisierte Modellsystem aus PEGyliertem PLL linear. Dies bedeutet, dass mit zunehmender PEGylierung die Aggregation in humanem Serum abnimmt [21]. Es scheinen somit leicht positive, sowie leicht negative und zwitterionische Strukturen besonders stabil

gegenüber Aggregation in humanem Serum zu sein. Im Gegensatz dazu neigen Oberflächen mit einer größeren positiven, oder negativen Nettoladung zu verstärkter Aggregation.

5.3.5.3. Einteilung der Partikel nach Hydrophobizität

Hinsichtlich der Hydrophobizität der untersuchten Partikel ergibt sich ein klarer Trend. Je hydrophiler die Oberfläche ist umso geringer ist die Tendenz zur Aggregation. Zeigt ein polymerer Nanopartikel hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche neigt er zur Aggregation mit hydrophoben Serumbestandteilen, wie zum Beispiel den Lipoproteinen.

Auch viele andere Serumproteine besitzen hydrophobe Gebiete über welche sie dann mit den hydrophoben Bereichen auf der nanopartikulären Oberfläche wechselwirken können. Bei Betrachtung der unter 5.3.2. diskutierten amphiphilen p(HPMA)-co-p(LMA) Systeme wird dieses Verhalten besonders deutlich. Befinden sich die hydrophoben Lauryl-Seitenketten favorisiert im Inneren des Polymer Aggregates, bzw. des Domperidon-Polymer-Aggregates kommt es zu keiner Aggregation in humanem Serum. Liegt das amphiphile Copolymer allerdings isoliert vor, und präsentiert damit die hydrophoben Bereiche auf der Oberfläche, kommt es zur Aggregation mit Lipoproteinen, welche große hydrophobe Bereiche auf ihrer Oberfläche besitzen.

Auch die Modifizierung von Liposomen mit hydrophilen zuckerähnlichen Strukturen zeigt abnehmende Aggregation mit steigender Hydrophilie der Liposomenoberfläche (vgl. 5.3.2.2.).

6. Zusammenfassung und Ausblick

Dynamische Lichtstreuung an humanem Serum liefert drei diskrete Größenfraktionen. Der mittlere hydrodynamische Radius liegt bei $\langle R_h \rangle_z^{-1} = 24 \pm 8$ nm und kann für eine individuelle Probe in einem Genauigkeitsbereich von 12% mittels DLS bestimmt werden, wie durch unabhängige Wiederholungsmessungen gezeigt werden konnte.

Die größte Radienfraktion kann durch Korrelation mit Triglycerid- und Cholesterinkonzentration als Lipoproteinkonzentration (VLDL, LDL) identifiziert werden.

Mittels sequentieller Ultrazentrifugation wurden LDL und VLDL präparativ isoliert und VLDL und LDL freies Plasma wurde hergestellt.

Durch Anwendung von GPC, Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie konnten Serumproteine wie Albumin und IgG präparativ isoliert werden und verschiedene Proteinmischungen hergestellt werden. Diese, bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften, verschiedenen Serumfraktionen und Gemische können dann bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit Nanopartikeln untersucht werden.

Es konnten größeneinheitliche Liposomen, bestehend aus DSPC, Cholesterol und einem kationischen Tensid, im Radienbereich von $R_h = 50$ bis 140 nm über Extrusion, bei Variation von Zusammensetzung und Methodik, hergestellt und charakterisiert werden. Größe und Polydispersität hängen dabei von der gewählten Präparationsmethode ab.

Diese Liposomen wurden mit siRNA beladen, wobei die prozentuale siRNA Aufnahme je nach Präparation zwischen 40 und 75% liegt. Die Liposomen sind unbeladen sowie nach Beladung mit siRNA nicht zelltoxisch.

In zukünftigen Experimenten werden die hergestellten Liposomen bezüglich ihrer Knockdown Effizienz auf Prokollagen Typ I (hepatische Sternzellen, Myofibroblasten) und Faktor VII (Hepatozyten) in *in vitro* sowie *in vivo* Experimenten untersucht. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Leberzirrhose. Eine mögliche zusätzliche Funktionalisierung der Liposomenoberfläche, beispielsweise mit Mannose-6-Phosphat kann dann ein Targeting zu speziellen Leberzellen bewirken. Hierdurch wird es möglich gezielt die

Leberzellen zu adressieren, welche die stark ausgeprägte Akkumulation der extrazellulären Matrix verursachen.

Weiterhin wurden dann verschiedene, von diversen Kooperationspartnern hergestellte, nanopartikuläre Wirkstoffsysteme bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum untersucht.

Polystyrolpartikel mit verschiedenen Oberflächenmodifizierungen (chemische Struktur und Ladungszustand) wurden bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum sowie der Körperverteilung in der Maus untersucht. Die Korrelation der Ergebnisse aus der DLS mit den an der Maus gewonnenen Daten zeigt, dass das *in vivo* Verhalten von Nanopartikeln hinsichtlich Organverteilung ganz wesentlich von der jeweiligen Partikel/Protein Wechselwirkung im Serum bestimmt wird, und diese weitgehend durch Variation der Oberflächenfunktionalisierung zu kontrollieren ist.

Das Aggregationsverhalten von Liposomen in humanem Serum wurde an zwei verschiedenen Systemen untersucht. Liposomen bestehend nur aus Co-lipiden wie DSPC, EPC und Cholesterol neigen zur Bildung von eher polydispersen Strukturen, die durch Wechselwirkungen mit Komponenten des humanen Serums höhermolekulare Aggregate ausbilden. Die Adsorption von Serumproteinen auf der Nanopartikeloberfläche kann durch die Einführung von hyperverzweigtem Polyglycerol mit kovalent gebundenem Cholesterol eingeschränkt werden. Die Ausrüstung der Liposomen mit Polyglycerol führt chemisch und strukturell zu einer großen Ähnlichkeit mit biologischen, glykosylierten Oberflächen und damit zu einer vergleichbaren Hydrophilie bei gleichzeitig sterischer Abschirmung der elektrischen Ladungen. Liposomen bestehend aus einem kationischen Spermin-Tensid sowie den Colipiden DSPC und Cholesterol zeigen keine Aggregation in humanem Serum. Belädt man diese Liposomen von außen mit siRNA und reduziert damit die positive Ladung der Liposomenoberfläche findet erneut Aggregation mit Komponenten des Humanserums statt.

Es kann gezeigt werden, dass p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymere mit einem Molekulargewicht von 13500 g/mol in humanem Serum Aggregate in der Größenordnung von $R_{h,Agg} = 160$ nm bilden. Das Lipoprotein VLDL kann als Aggregation induzierende Serumkomponente identifiziert werden. Nach Beladung des Copolymers mit dem hydrophoben Wirkstoff Domperidon findet keine Aggregation mehr statt. Die Wechselwirkungen des Copolymers mit VLDL, welches das Apolipoprotein ApoE auf der Oberfläche gebunden hat sind von

besonderem Interesse, da ein Zusammenhang zwischen ApoE Interaktion und Bluthirnschrankentransport in der Literatur diskutiert wird [110-111].

Ein höher molekulares statistisches HPMA-co-LMA Copolymer ($M_n = 39000$ g/mol) bildet in wässriger Lösung stabile hydrophobe Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 41$ nm aus. Im Gegensatz zum niedermolekularen System sind hier die hydrophoben Laurylketten im Inneren des polymeren Aggregates versteckt, die Struktur weist damit eine dem HPMA-co-LMA Domperidon Komplex ähnliche Oberfläche auf. Das höher molekulare HPMA-co-LMA Copolymer bildet keine Aggregate mit Komponenten des humanen Serums aus, zudem zeigt es eine lange Plasmazirkulationszeit und wird nicht bevorzugt in der Leber angereichert [109]. Das Verhalten dieses Copolymers in humanem Serum korreliert somit mit den Ergebnissen der *in vivo* Versuche.

Auch wurden Polystyrol –und Polylactidnanopartikel mit p(HPMA)-co-p(LMA) als Tensid mittels Miniemulsionstechnik hergestellt¹¹ und bezüglich ihrer Aggregation in humanem Serum untersucht. Hier ist nur der hydrophile HPMA Anteil der wässrigen Lösung, also dem Serum zugewandt, die Systeme zeigen keine serumvermittelte Aggregation.

Relativ monodisperse kationische Nanohydrogelpartikel mit $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 24.4$ nm wurden bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum, sowie in einer Lösung aus überwiegend anionischen Serumproteinen untersucht. In humanem Serum bilden die Partikel Aggregate in der Größenordnung von $R_{h,Agg} = 300$ nm, in der anionischen Proteinlösung Aggregate mit $R_{h,Agg} = 200$ nm. Nach Beladung mit siRNA werden die Partikel erneut in humanem Serum mittels DLS untersucht. Im Verhältnis LN247:siRNA = 25:1 findet keine Aggregation in humanem Serum statt, wohingegen in einem Beladungsverhältnis von LN247:siRNA = 15:1 Aggregate mit $R_{h,Agg} = 214$ nm detektiert werden.

Es ist in weiteren Versuchen zu testen ob die anionische Proteinfraction ebenfalls zur Aggregation des beladenen Partikels führt (LN247:siRNA=15:1), da in der Literatur bereits die Adsorption von negativ geladenen Proteinen selbst auf negativen Silicaoberflächen diskutiert wurde [19].

¹¹ Synthese durchgeführt von Annette Kelsch, AK Zentel, Institut für organische Chemie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Interessanterweise zeigen ladungsausgeglichene Strukturen keine Aggregation in humanem Serum (DNA-PVP-Komplexe, Poly- ϵ -N-methacryloyl-L-lysine (PMALys)). Diese erhöhte Stabilität wird auch bei Betrachtung des Modellsystems von succinyliertem PLL deutlich. Die geringste Aggregation zeigen hier Partikel, in welchen etwa die Hälfte der positiven Ladungen durch negative Carboxylgruppen ersetzt wurde. Im Gegensatz dazu verhält sich das in früherer Arbeit synthetisierte Modellsystem aus PEGyliertem PLL linear. Dies bedeutet, dass mit zunehmender PEGylierung die Aggregation in humanem Serum abnimmt [21]. Es scheinen somit leicht positive, sowie leicht negative und zwitterionische Strukturen besonders stabil.

Hinsichtlich der Hydrophobizität der untersuchten Partikel ergibt sich ein klarer Trend. Je hydrophiler die Oberfläche ist umso geringer ist die Tendenz zur Aggregation.

Sterische Stabilisierung und lediglich geringe Nettoladungsdichte der Oberfläche sowie deren ausgeprägte Hydrophilie sind effektive strukturelle Komponenten von Nanopartikeln, die unterstützend deren serumvermittelte Aggregation vermeiden helfen. Inwieweit etwa spezifische Protein-Adsorptionen an maßgeschneiderte Nanopartikeloberflächen erlauben noch aktives Targeting zu betreiben, muss späteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

7. Experimenteller Teil

7.1. Serumfraktionierung

Unter Anwendung verschiedener chromatographischer Methoden kann humanes Blutserum/Blutplasma fraktioniert werden.

7.1.1. Serumfraktionierung über Gelpermeationschromatographie

Zur Fraktionierung des humanen Serums mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) werden SHODEX Säulen der Firma Tosoh Haas verwendet. Es werden drei Säulen mit Vorsäule verwendet: OH-Pak SB802.5 HQ (6 μm), 803 (6 μm), 804 (10 μm). Das jeweilige Säulenmaß beträgt 8 x 300 mm. Das Säulenmaterial ist Polyhydroxymethacrylat. Der Fluß beträgt 0.5 ml/min. Als Laufpuffer wird 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7.04) verwendet. Die Wellenlänge beträgt $\lambda=260\text{nm}$ und die Messung wird bei Raumtemperatur durchgeführt ($T=293\text{K}$). Die verschiedenen Fraktionen werden direkt mittels einer Lichtstreuöküvette für nachfolgende Versuche aufgefangen. Das Serum/Plasma wird für die GPC Messungen unverdünnt aufgetragen.

7.1.2. Präparative Isolierung von IgG über Protein-A Affinitätschromatographie¹²

Für die präparative Isolierung von IgG wird eine Protein-A Chromatographiesäule der Firma Tosoh Haas verwendet. Die Bedienung der Säule kann manuell oder über den Einbau in eine Flüssigchromatographie (LC, engl.: liquid chromatography) erfolgen. Es ist in jedem Fall zu empfehlen die Auftragung des Serums/Plasmas manuell durchzuführen um eine zu starke Verdünnung mit dem Laufpuffer zu verhindern.

Als Laufpuffer wird 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.4 verwendet. Bei Verwendung der LC-Apparatur wird ein Fluß von 0.5 ml/min eingestellt. Vor jedem Gebrauch wird die Protein-A Säule zunächst gereinigt. Hierzu wird diese in die LC-Apparatur eingebaut und mit ca. 10ml Laufpuffer gewaschen. Anschließend werden über die Probenschleife zunächst 2 ml 0.1 M NaOH und danach 2 ml 0.2 M Zironensäure auf die Säule gegeben. Zur Regeneration des pH-Wertes wird mit 2 ml 0.2 M Tris (pH = 7.4) gespült. Anschließend wird ca. 10 min mit dem Laufpuffer gewaschen. Der pH-Wert wird vor Auftragung der Probe kontrolliert und sollte bei pH = 7.4 liegen. Der Fluß bleibt während des gesamten Waschvorgangs bei 0.5 ml/min.

¹² Das Protokoll wurde in Kooperation mit Prof. D. Josic, Alpert Medical School, Brown University, RI, USA erarbeitet und entsprechend der Applikation verifiziert

Die Serum-/Plasmaprobe wird nach dem Auftauen im Verhältnis 1:5 mit dem Laufpuffer (10 mM Tris, pH = 7.4) verdünnt und anschließend bei 4°C und 4000rpm für 5min abzentrifugiert.

Es werden 600µl des verdünnten Serums/Plasmas manuell auf die Protein-A Säule aufgetragen. Der Durchfluss wird dabei in einem Eppendorf Gefäß aufgefangen und erneut aufgetragen. Durch diese Rezirkulation wird die Bindungseffizienz erhöht.

Nach der Auftragung wird die Säule erneut in die LC-Apparatur eingebaut. Durch die Säule wird nun der Laufpuffer geleitet, wobei das Eluat aufgefangen wird. Es wird für vier Minuten mit dem Laufpuffer gespült und der Durchfluss wird in 1 ml Fraktionen gesammelt. Anschließend werden über die Probenschleife 2 ml 0.2 M Zitronensäure aufgegeben. Der Fluß beträgt 0.5 ml/min. Das Eluat wird direkt aufgefangen. Sobald ein Anstieg der Basislinie im Elutionsdiagramm erkennbar ist, ist das Auffanggefäß zu wechseln. Es werden 2 ml Lösung aufgefangen.

Diese Fraktion enthält die Hauptmenge an IgG. In der erhaltenen IgG Elution wird der pH Wert durch Zugabe von Tris-Base (pH = 11) auf pH = 7.4 eingestellt. Es werden außerdem noch zwei weitere 2 ml Fraktionen gesammelt um später eluiertes IgG aufzufangen. Vor Injektion einer zweiten Probe muss die Säule mit mindestens 2 ml 0.2 M Tris (pH = 7.4) gespült werden. Die Säule kann in 20%igem Ethanol bei 4°C gelagert werden.

7.1.3. Präparative Isolierung von Albumin über AffiBlue Affinitätschromatographie⁷

Zur Isolierung von Albumin wird eine AffiBlue Säule der Firma Tosoh Haas verwendet. Die Säule kann per Hand oder mittels einer LC-Apparatur bedient werden. Als Laufpuffer wird 10 mM Tris (pH = 7.4) verwendet. Die Pumpgeschwindigkeit beträgt 0.5 ml/min.

Vor Gebrauch wird die Säule mit 10 ml destilliertem Wasser, 10 ml 2 M Guanidin in 10 mM Tris HCL und 10 ml 10 mM Tris HCl gewaschen. Anschließend wird die Probe manuell auf die Säule aufgetragen und einmal rezirkuliert. Es kann entweder reines Serum/Plasma aufgetragen werden, oder der Durchfluss der IgG-Säule. Im Falle des reinen Serums/Plasmas wird die Probe nach dem Auftauen im Verhältnis 1:10 mit dem Laufpuffer verdünnt. Anschließend wird die Probe bei 4°C und 4000UpM für 10 Minuten zentrifugiert.

Das Eluat der Säule nach der Rezirkulation wird als Eluat 1 bezeichnet und in einem Eppendorf Gefäß aufgefangen. Anschließend wird mit 10 mM Tris HCL gespült und es

werden zunächst zweimal 500µl des Durchflusses, dann 1ml des Durchflusses in Eppendorf Gefäßen gesammelt (Durchfluss 2-4), anschließend wird weitere drei Minuten mit dem Laufpuffer gewaschen. Es werden dann 2 ml 2M NaCl injiziert. Das Eluat wird die nächsten 4 Minuten gesammelt, wobei 2 Fraktionen in Eppendorf Gefäße aufgenommen werden (Elution 1-2). Danach werden 2 ml einer 2M Guanidin Lösung aufgegeben. Die Elution wird für weitere 2 Minuten gesammelt (Elution 3). Es wird für 10 Minuten mit dem Laufpuffer nachgespült. Die Säule kann dann in 20%igem EtOH, bei 4°C aufbewahrt werden.

7.1.4. DEAE Anionenaustauschchromatographie⁷

Für die Anionenaustauschchromatographie wird eine DEAE-(Diethylaminocellulose)-Säule der Firma Tosoh Haas verwendet. Die Säule wird zunächst mit 4 Milliliter destilliertem Wasser gespült. Es werden erneut 500 µl Wasser aufgegeben und dieses wird dann über eine Vakuumpumpe abgezogen. Anschließend werden 200 µl einer 0.5 M NaOH Lösung auf die Säule aufgegeben und die Säule wird damit 30 min inkubiert. Dann werden wieder 500 µl destilliertes Wasser aufgetragen und dieses wird über eine Vakuumpumpe entfernt. Anschließend werden 500 µl einer 0.2 M NaCitrat Lösung (pH = 5.0) auf die Säule aufgegeben. Dann wird die Säule für weitere 10 Minuten inkubiert und die Lösung wird über eine Vakuumpumpe abgezogen. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Anschließend wird die reine Serum/Plasma Probe im Verhältnis 1:10 mit 20 mM NaCitrat (pH = 5.0) verdünnt und für 5 Minuten bei 4°C und 4000 UpM zentrifugiert. Das Eluat der AffieBlue Säule kann ebenfalls auftragen werden. Hierbei wird allerdings in einer 1:2 Verdünnung mit der NaCitrat Lösung gearbeitet.

Es werden dann 500 µl der Probe auf die Säule aufgetragen und 10 min inkubiert, anschließend wird die Probe mittels Vakuum abgezogen und der erhaltene Durchfluss wird erneut aufgetragen. Der nach der Rezirkulation erhaltene Durchfluss wird aufbewahrt. Er enthält die kationische Proteinfraction. Die Säule wird dann mit 500 µl einer 20 mM NaCitrat Lösung (pH = 5.0) gewaschen. Dann erfolgt die Elution mit verschiedenen Salzlösungen. Es werden folgende Lösungen aufgetragen:

Elution 1: 200µl 0.155 M NaCl in 20 mM NaCitrat, pH = 5.0

Elution 2: 200µl 0.3 M NaCl in 20mM NaCitrato, pH = 5.0

Elution 3: 200µl 0.5 M NaCl in 20mM NaCitrato, pH = 5.0

Elution 4: 200µl 1 M NaCl in 20mM NaCitrate, pH = 5.0

Nach den Elutionsschritten wird die Säule mit 500 µl der 1 M NaCl in 20mM NaCitrate, pH = 5.0 nachgespült. Dann wird mit 1 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Säule kann dann in 20%igem Ethanol bei 4°C aufbewahrt werden.

7.2. Lipoproteinfraktionierung

Die Lipoproteinfraktionierung wurde nach den allgemeinen Richtlinien der Universitätsklinik Mainz durchgeführt. Die Gewinnung von isoliertem VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), VLDL-freiem Plasma und LDL-freiem Plasma ist im Folgenden beschrieben.

Die Lipoproteine wurden aus humanem Plasma über sequentielle Ultrazentrifugation gewonnen. Zur Gewinnung von VLDL (very low density lipoprotein) wird das Plasma über Nacht bei 45000 UpM und T=10°C ultrazentrifugiert (RotorType 70Ti). Das VLDL kann dann als trüber Überstand von dem restlichen Plasma entnommen werden. Zur Präparation des VLDL freien Plasmas wird der Zentrifugationsvorgang wiederholt und restliches VLDL entfernt.

Nach der VLDL Entfernung kann LDL präparativ isoliert werden. Hierzu wird ein Dichtegradient mit KBr Lösung eingestellt (Zusammensetzung der verwendeten KBr-Lösung: 2g KBr auf 1 Liter Wasser lösen, anschließend 20 ml der wässrigen KBr Lösung durch 20 ml 5% EDTA (pH = 7) Lösung ersetzen. Die Zugabe des EDTA inhibiert dabei die Oxidation des LDL. Zu dem Plasma wird anschließend KBr als Feststoff zugegeben, die benötigte KBr Menge errechnet sich hierbei über:

$$m(KBr) = V(Plasma) \times 0.3265 \quad (Gl.7-X)$$

Anschließend wird die Plasma-KBr Lösung mit der KBr Lösung im Volumenverhältnis Plasma-KBr : KBr = 1:2 (ml/ml) gemischt. Die erhaltene Mischung wird dann über Nacht bei 45000rpm und 10°C ultrazentrifugiert.

Um LDL freies Plasma zu erhalten kann die untere Schicht aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen werden, die erhaltene Lösung wird dann dialysiert, wobei der Dialysepuffer mindestens 3x gewechselt werden sollte. Der verwendete Dialysepuffer setzt sich zusammen aus: 5 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.23 mM EDTA x H₂O.

Zur LDL Präparation wird der leicht dunkelgelbe Überstand aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen. Die erhaltene LDL Fraktion wird dann noch zweimal über Nacht bei 45000rpm und $T=10^{\circ}\text{C}$ ultrazentrifugiert. An beiden Tagen wird der LDL Überstand entnommen und die Dichte der Lösung wurde mit KBr auf 1.15 g/ml eingestellt. Anschließend wird die erhaltene LDL Fraktion bei 4°C drei Tage dialysiert (Dialysepuffer: 5 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.23 mM EDTA \times H_2O). Nach der Dialyse wird die LDL Fraktion über einen GHP 450nm Filter Steril filtriert.

7.3. Gesamtproteinbestimmung in Serum und Plasma nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen (z.B. humanes Serum/Plasma) kann mittels des Bradford Reagenzes (SIGMA-ALDRICH) ermittelt werden. Das Assay wird nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt (SIGMA ALLDRICH, Product Information: Technical Bulletin, Katalognummer: B6916). Die Kalibration wird mit bovinem Serumalbumin (BSA) (SIGMA ALLDRICH) durchgeführt (Abbildung 73). Es ist zu empfehlen die Kalibrierung für jede Proteinbestimmung direkt am Tag der Messung durchzuführen. Mittels UV-Vis Spektroskopie wird die Absorption nach Inkubation der Proteinlösung mit dem Reagenz gemessen. Der im Reagenz enthaltene Farbstoff Brilliant Blue G bildet einen Komplex mit den Proteinen in Lösung. Dieser Komplex führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm. Die Absorption ist dabei proportional zur Proteinkonzentration.[116] Eine typische Kalibriergerade ist im Folgenden gezeigt.

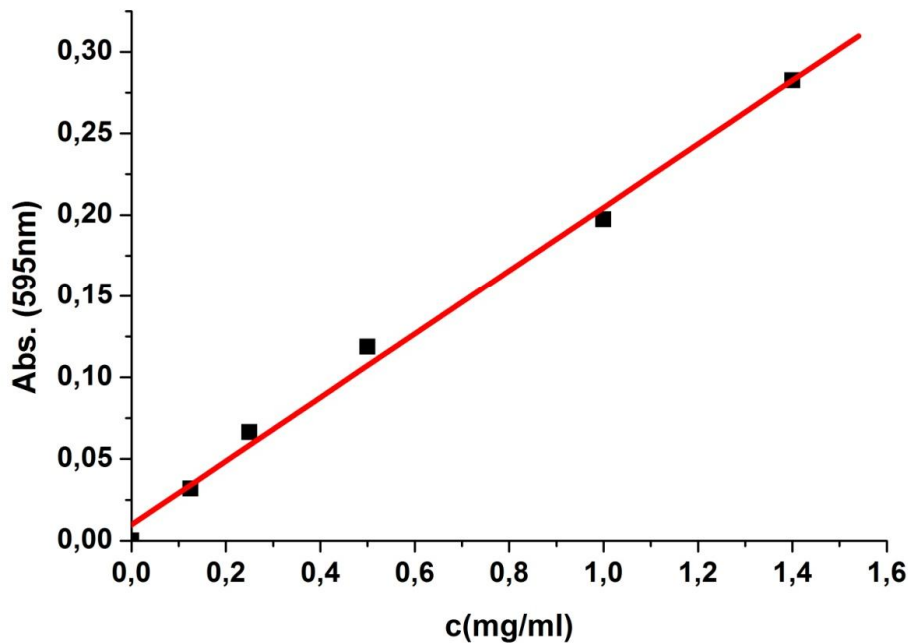


Abbildung 73: Kalibriergerade des Bradford Assays. Kalibrierung mit BSA. Geradengleichung: $y=0.195 + 0.01x$.

7.4. SDS-Gelelektrophorese von humanem Serum und Serumfraktionen

Für die SDS-PAGE wird eine XCell Surelock Mini-Zelle (Invitrogen) mit fertigen 4-12% Bis-Tris Gelen (1.0mm x 10well) (Invitrogen) verwendet.

Es werden Proben mit einem Gesamtvolumen von maximal 20µl hergestellt. Die aufgetragene Menge an Protein wird dabei zwischen den verschiedenen Proben konstant gehalten. Falls nötig, wird die Probe mit Wasser verdünnt. Zu jeder Probe werden 3 µl NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen) und 5 µl NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) gegeben. Die Proben werden kurz abzentrifugiert und anschließend für mindestens 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben nochmals kurz abzentrifugiert.

Das 4-12% Bis-Tris Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die innere Kammer wird mit dem Laufpuffer aufgefüllt (NuPAGE MES SDS running buffer, Invitrogen). Es werden zur Pufferlösung 350µl NuPAGE Antioxidant (Invitrogen) gegeben. In eine der Taschen werden 7 µl des Kalibrierungsprotein (All Blue, BIO RAD) aufgetragen.

Die Laufzeit des Gels liegt bei ca. 50 Minuten bei 180 Volt. Die Gele werden anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgt

Färbung mit Simply Blue™ (Invitrogen). Die Inkubationszeit in der Färbelösung sollte mindestens eine Stunde betragen. Anschließend wird das Gel über Nacht in destilliertem Wasser entfärbt, wobei innerhalb der ersten zwei Stunden zwei-, bis dreimal das Wasser gewechselt werden sollte.

7.5. Präparation der Serum- und Serumproteinproben für die DLS

Zur Durchführung der Experimente an humanem Serum und Plasma werden die bei -20°C tiefgefrorenen Proben jeweils in der für das Experiment benötigten Fraktion aufgetaut. Es ist zu beachten, dass alle Proben wenn möglich nur einmal dem Auftauprozess unterzogen werden sollten, da mehrfaches Auftauen und Einfrieren zu Veränderungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Probe führen kann [117] (vgl. Anhang A.1.). Die Proben werden bei RT über einen Zeitraum von einer Stunde langsam aufgetaut. Um eine gute Vermischung und ein gleichmäßiges Auftauen zu erreichen, werden die Proben sobald sich ein Flüssigkeitsfilm an der Gefäßwand gebildet hat, leicht geschüttelt wobei Schaumbildung zu vermeiden ist. Die während des Erwärmungsprozesses entstehenden Kryopräzipitate (hervorgerufen durch hydrophobe Wechselwirkungen) müssen wieder vollständig in Lösung gebracht werden.

Zu Lichtstreuungsmessungen werden sowohl Serum als auch Plasma durch einen GS220nm (modifizierte Cellulose, Millipore, Technical Support 2010) filtriert. Dieser Filter wurde wie in Anhang A beschrieben bezüglich seiner Eignung für diese Systeme untersucht. Die Lichtstreuküvetten werden jeweils 20 Minuten im Acetonbrunnen mit frisch destilliertem Aceton von Staub befreit. Aufgrund der starken Adhäsionseigenschaften der hochkonzentrierten Proteinmischung in Serum und Plasma ist es nötig, die verwendeten Küvetten regelmäßig mit einer Lösung aus konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=3:1$) zu reinigen. Die Küvetten sollten hierbei mindestens eine Stunde in der beschriebenen Lösung inkubieren und anschließend gründlich mit Milli-Q-Wasser ausgespült werden, bevor sie in die Acetonbrunnen gestellt werden können. Die gesamte Probenvorbereitung für die DLS wird in einer staubfreien „Flowbox“ durchgeführt.

7.6. DLS an Nanopartikeln in Serum und in Lösungen verschiedener Serumkomponenten

Die Serumproben werden wie unter 7.5 beschrieben vorbereitet. Die zu charakterisierenden Partikel werden über Filter, die zuvor für jedes System als geeignet identifiziert wurden in die Serumlösung filtriert. Die Polystyrolpartikel wurden unfiltriert zu humanem Serum gegeben. Wenn nicht anders beschrieben wurde für die Partikel ein LCR 450 nm Filter verwendet. Das Konzentrationsverhältnis wird dabei so gewählt, dass es vergleichbar zum Verhältnis zwischen Nanopartikel und Protein im in vivo Experiment ist. Wurde das System noch nicht in vivo getestet, wird das Konzentrationsverhältnis so gewählt, dass die Intensität des Partikels nicht viel mehr als 10% von der Streuintensität des Serums in der Mischung abweicht. Um Veränderungen der Einzelkomponenten (Serum/Partikel) in der Mischung bestimmen zu können, müssen sowohl Serum als auch Partikel vermessen werden. Die Konzentrationen werden dabei mittels Verdünnung mit DPBS-Puffer (Invitrogen) oder 0.152 M NaCl Lösung (physiologischer NaCl Gehalt) auf die der Mischung entsprechende Konzentration eingestellt.

7.7. Liposomen Präparation

Zur Herstellung der Liposomen, werden das kationische Tensid (Abbildung 29) und die beiden Colipide, DSPC (Distearoylphosphatidylcholin, Sigma Alldrich) und Cholesterol (Sigma Alldrich) in absolutem Ethanol über Nacht bei Raumtemperatur ($T = 293 \text{ K}$) getrennt gelöst. Die erhaltenen ethanolischen Lösungen werden anschließend im gewünschten Verhältnis gemischt. Zur Herstellung der Liposomen mit der Inject Print Technologie wird die ethanolische Lipidlösung in einen speziell präparierten Druckkopf eines herkömmlichen Tintenstrahldruckers filtriert. Als Filter wird hier ein LCR 450 nm Filter verwendet. Anschließend wird die Lipidlösung in die Pufferlösung „gedruckt“. Der Druck kann direkt in die Lichtreuküvette erfolgen, wobei dann die Herstellung einer staubfreien Lösung sehr schwierig ist. Ebenso ist es möglich die Lipidlösung in ein Probengefäß zu drucken und anschließend vor dem Lichtstreuexperiment durch einen LCR 450 Filter zu filtrieren. In beiden Fällen wird während des Druckvorganges gerührt. Nach Beendigung des Eintropfvorganges wird die wässrige Liposomenlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Alternativ kann die Liposomenlösung über eine Spritzenpumpe (5 ml Spritze, Geschwindigkeit: 0.15 ml/min) unter Rühren in die Pufferlösung eingetropfelt werden. Der Spritze wird dabei ein LCR 450 nm Filter vorgeschaltet. Nach Beendigung des Eintropfens wird die wässrige Liposomenlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung wird anschließend extrudiert. Es wird ein Mini-Extruder der Firma Avanti Polar Lipids verwendet und Polycarbonatmembranen mit verschiedenen Porendurchmessern eingebaut (200 nm, 100 nm, 50 nm, 10 nm). Das Füllvolumen der Spritzen beträgt 1 ml. Der Extrusionsvorgang wird für jede Spritzenfüllung 30-mal wiederholt, wobei mit minimalem Druck gearbeitet wird, um ein Reißen der Membran zu verhindern. Für spätere Lichtstreuexperimente werden die extrudierten Liposomen über einen LCR 450nm Filter in die Lichtstreu­küvette filtriert.

7.8. Beladung von Liposomen mit siRNA

Die Liposomen werden auf zwei verschiedene Methoden mit siRNA beladen (Abbildung 74). In Methode A wird die siRNA in einer Nuklease-freien DPBS Lösung gelöst. Dann wird die ethanolische Lipidlösung durch einen LCR 450 nm Filter in die wässrige siRNA Lösung getropft. Anschließend wird die Mischung für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird durch eine 50 nm Membran, wie unter 7.8 beschrieben, extrudiert. In Methode B werden die Liposomen, wie unter 7.8. beschrieben, hergestellt. Die siRNA wird nach der Extrusion von außen zu den fertigen Liposomen gegeben. Alle verwendeten Materialien werden vor Gebrauch sterilisiert damit die Proben später in *in vitro* und *in vivo* Experimenten verwendet werden können. Hierzu wird zunächst die Extruder Apperatur mit absolutem Ethanol gespült und anschließend bei 100°C getrocknet. Alternativ kann auch ein herkömmlicher Evakuator verwendet werden. Der Arbeitsplatz sowie die Handschuhe und alle anderen Kontaktflächen werden mit RNase Away (Invitrogen) gereinigt.

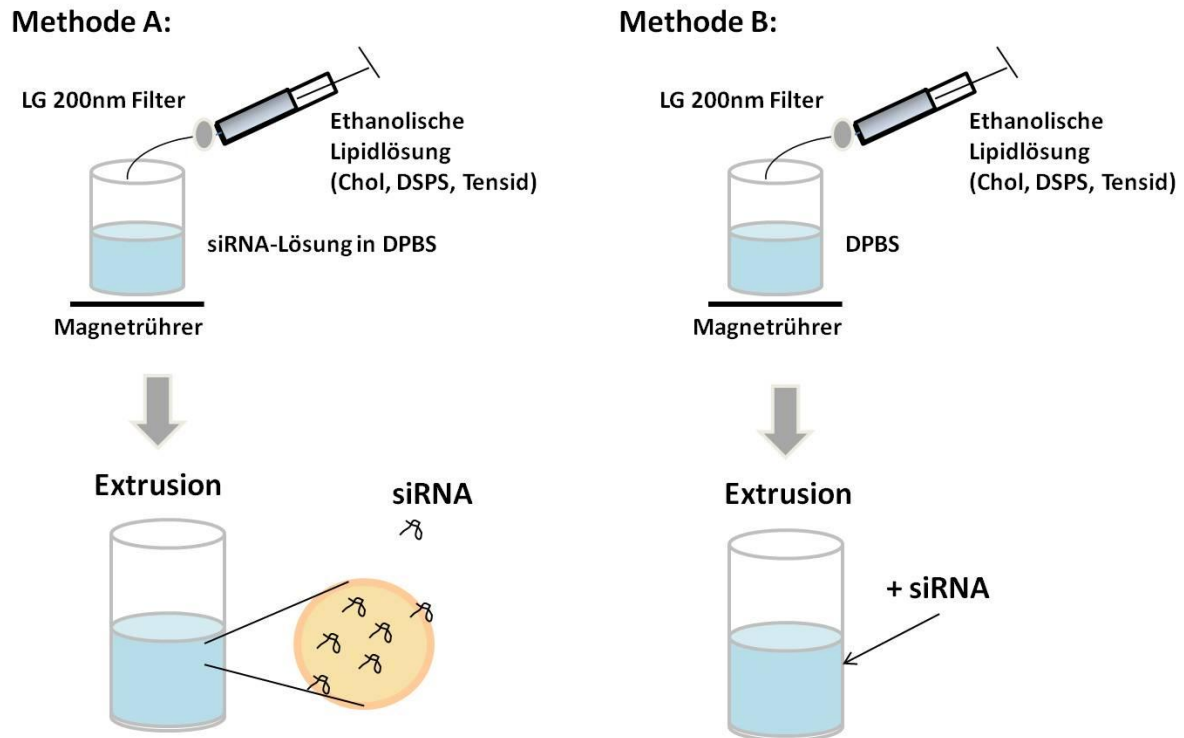


Abbildung 74: Schematische Darstellung der Beladung der Liposomen mit siRNA. Links Methode A: die ethanolische Lipidlösung wird direkt in die wässrige siRNA Lösung getropft. Anschließend wird extrudiert. Rechts Methode B: die ethanolische Lipidlösung wird in die wässrige Lösung getropft, es wird extrudiert und die siRNA wird in die fertige Liposomenlösung getropft

7.9. Bestimmung der siRNA-Einkapselungseffizienz mittels Ribogreen Assay

Mittels des Quanti-iT™ RiboGreen® RNA Assays von Invitrogen kann die Konzentration von siRNA in Lösung bestimmt werden. Das Quanti-iT™ RiboGreen® RNA Reagenz ist ein hochempfindlicher Fluoreszenzfarbstoff, der mit Nucleinsäuren wechselwirkt. Mit diesem Assay kann die RNA/siRNA Konzentration bis zu 1 ng/ml detektiert werden. Der Assay wurde nach Vorschrift des Herstellers (Invitrogen: Quanti-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit) durchgeführt.

Das Kit wird in dieser Arbeit zur Ermittlung der eingekapselten Menge an siRNA in Liposomen verwendet. Es wird die äquivalente Konzentration an siRNA in reinem DPBS sowie in der Liposomenlösung angesetzt. Ebenso wird eine Kalibriergerade (Abbildung 75) mit der verwendeten siRNA erstellt. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität und der sich aus dem Emissionsdiagramm ergebenden Fläche der reinen siRNA-Lösung und der Lösung von Liposomen mit eingekapselter siRNA kann die prozentuale Einkapselungseffizienz errechnet werden. Es wird nur die noch in Lösung frei vorliegende siRNA bestimmt, somit also die nicht in das Liposomeninnere aufgenommene, bzw. nicht an der Liposomenoberfläche gebundene siRNA detektiert. Die liposomal gebundene/eingekapselte siRNA kann also nur

über Differenzmessung der Intensitäten der theoretisch maximal möglichen freien siRNA und der nach liposomalen Bindung noch freien siRNA quantifiziert werden.

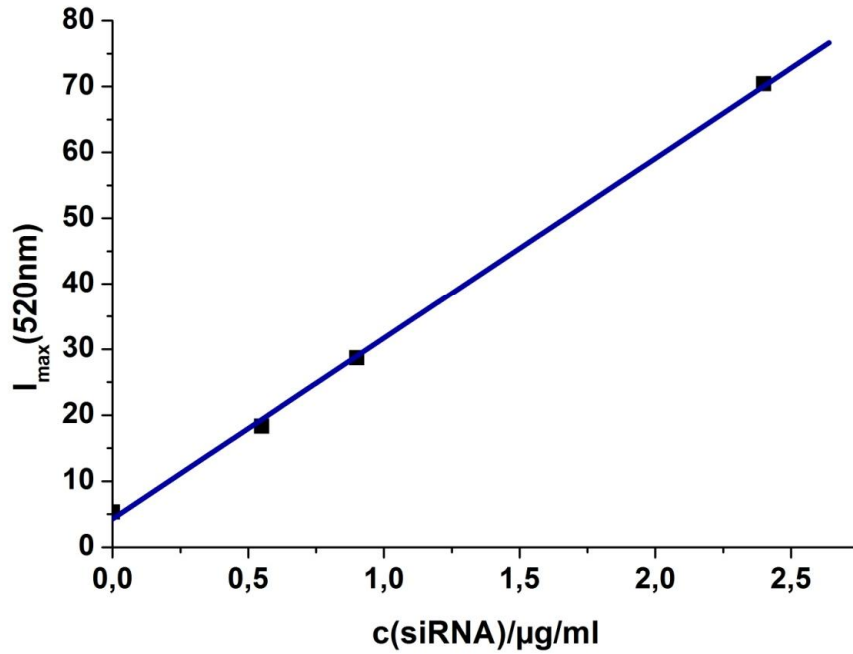


Abbildung 75: Fluoreszenz-Kalibriergerade des RiboGreen® RNA Assays zur Bestimmung freier Rest-siRNA nach liposomaler Komplexierung/Verkapselung.

8. Verwendete Geräte und Materialien

8.1. Material

Serum und Plasma wurden von der Transfusionszentrale der Uni-Klinik Mainz erhalten. Das Plasma wurde in Form von Citratplasma erhalten.

Natriumchlorid (NaCl), Natriumdodecylsulfat (SDS, reinst), Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid (Tris-HCl) wurden in molekularbiologischer Reinheit von Roth, der DPBS Puffer (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline 1x) von Invitrogen erhalten.

Cholesterol und Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) wurden von Sigma Alldrich erhalten. Die siRNA stammt von Quiagen.

4-12% Bis-Tris Gel wurden von Invitrogen, der Marker AllBlue von BioRAD erworben.

Die folgenden Säulen wurden von der Firma TOSOH erhalten: AffieBlue, Protein A-Säule, DEAE-Säule.

8.2. Lichtstreuung

Die dynamischen Lichtstremessungen wurden unter Verwendung der im Folgenden angeführten Anlage weist folgende Spezifikationen auf: Goniometer SP-125 mit ALV/SO-SIPD Single Photon Detector (Lichtwellenleiter-Optik), ALV-5000/EPP/60X Multitau Realtime Digital Korrelator, alles von der Firma ALV, Langen, und ein Argon-Ionen-Laser (SpectraPhysics Stabilité 2060-4S, Wellenlänge 514,5 nm, Leistung 500 mW).

Die statischen Lichtstremessungen wurden an einer Anlage durchgeführt, die mit einem Helium-Neon-Lase (JDS Uniphase 1145p-3083, Wellenlänge 632.8 nm, Leistung 25 mW) betrieben wird. Die Detektionseinheit besteht aus einem Goniometer ALV-SP-86, einem ALV/Hugh QEAPD Avalanche-Photodioden / Faseroptikdetektionssystem und dem Digital Korrelator /Strukturator ALV-300, alles von der Firma Langen.

Für alle Messungen wurden Küvetten aus Quarzglas von der Firma Hellma, Mühlheim, mit einem Durchmesser von 20 mm und einem Volumen von 14 ml verwendet.

Die Auswertung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mit dem in unserer Arbeitsgruppe von Olliver Nirschl geschriebenen Programm HDRC.

8.3. UV/VIS Messungen

Alle UV-Spektren wurden mit einem Carry 100Bio UV-VIS Spectrophotometer (Varian, Inc.) aufgenommen.

8.4. GPC-Messungen

GPC-Spektren wurden in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril 1:1 mit Zusatz von 0,15% Trifluoressigsäure gemessen. Es wurden NOVEMA-Säulen der Firma PSS mit 10µl Material der Porengröße 30, 300, 3000, verwendet. Es wurde jeweils mit einem UV-Detektor des Typs Waters 486 (bei $\lambda=260\text{nm}$) und einem RI-Detektor des Typs Hitachi L-2490 detektiert. Die Flußrate betrug 0,7 ml/min (Pumpe: Hitachi L-7110). Als Standards wurden Polylysine mit bekanntem Molekulargewicht verwendet. Die Messungen wurden bei 25°C (Säulenofen: Hitachi L2350) durchgeführt.

8.5. SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-PAGE wurde eine XCell Surelock Mini-Zelle (Invitrogen) mit fertigen Tris-Glycin-Gelen (Gradient 10-20%) verwendet.

Anhang

A. Einfluss verschiedener experimenteller Parameter auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von humanem Serum

1. Einfluss der Temperatur

Humanes Serum wird üblicherweise bei -20°C gelagert. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Einfrier- und Auftauvorgang zur Entstehung von Kryopräzipitaten (hervorgerufen durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen) führt [118]. Insgesamt werden die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Serum und Plasma durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen verändert [117]. Im folgenden Diagramm ist die Änderung der Autokorrelationsfunktion von humanem Serum mit der Anzahl der Einfrier- und Auftauvorgänge gezeigt. Es wird deutlich, dass sich die Korrelationsfunktionen mit zunehmendem Auftauvorgang zu längeren Korrelationszeiten verschieben. Wobei die frische Probe, vor dem Einfrieren, sich im Genauigkeitsbereich der Testmethode nicht von der Probe nach einmaligem Einfrieren unterscheidet. Serumproben sollten somit in kleinen Fraktionen eingefroren werden und am Tag des Experimentes aufgetaut und nicht erneut wieder eingefroren werden.

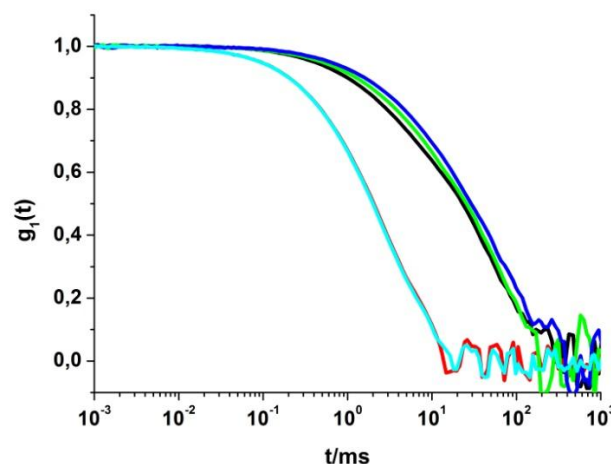


Abbildung 76: Autokorrelationsfunktionen des humanen Serums ($c = 59\text{ g/L}$): – vor dem Einfrieren, – nach dem 1. Auftauen, – nach dem 2. Auftauen, – nach dem 3. Auftauen, – nach dem 4. Auftauen, Streuwinkel 30° , $T = 293\text{ K}$.

In früherer Arbeit [Diplomarbeit, Kristin Rausch, 2010] wurde bereits gezeigt, dass humanes Serum über einen Zeitraum von 6 h stabil ist. Auch nach einstündigem Erwärmen des Serums auf 37°C treten keine Veränderungen auf. Nach 24 h Inkubation bei 37°C tritt ein zusätzlicher

„slow-mode“ auf, welcher auf die Bildung größerer Strukturen hinweist. Durch monoexponentielles Fitten im Bereich dieses „slow-modes“ erhält man einen hydrodynamischen Radius von $\langle R_h \rangle = 433$ nm, welcher deutlich über der größten Serumsfraktion liegt.

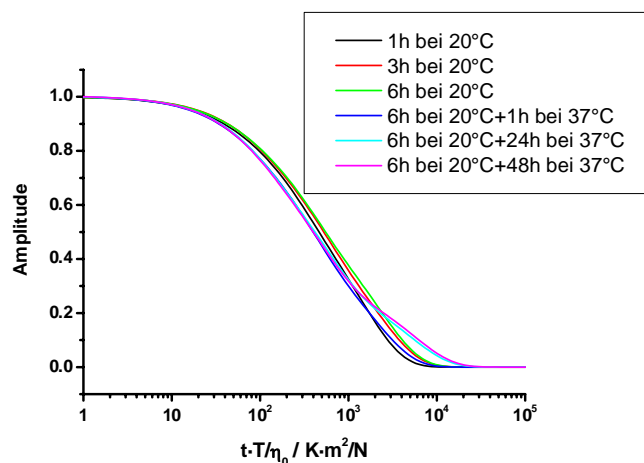


Abbildung 77: Zeit- und temperaturabhängige Beständigkeit des Streuverhaltens von humanem Serum: Fits der ACFs in universeller Auftragung gegen das Produkt aus Korrelationszeit t in s, absolute Temperatur in K und Viskosität $\eta(T)$ in mPa s [Diplomarbeit, Kristin Rausch, 2010]

Während des Auftauvorganges wurde auch die Änderung der Oberflächenspannung¹³ des humanen Serums gemessen. Der Wert änderte sich im betrachteten Zeitraum sowie nach dem ersten Auftauen nicht (Tabelle 23).

Tabelle 23: Werte der Oberflächenspannung von humanem Serum. Gemessen wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Raumtemperatur sowie nach einmaligem Einfrieren und Auftauen.

Zeitpunkt	Serum vor dem Einfrieren (Inkubation bei 293 K)	Serum nach erstem Einfrieren und Auftauen (Inkubation bei 293 K)
0 h	44.1 mN/m	44.7 mN/m
1 h	43.7 mN/m	44.5 mN/m
3 h	43.2 mN/m	44.0 mN/m
5 h	45.5 mN/m	43.8 mN/m

¹³ Gemessen von Elke Muth, MPI, Mainz

2. Verdünnung von humanem Serum

Der Einfluss der Verdünnung des humanen Serums mit verschiedenen Lösungen ist im Folgenden diskutiert. Einige Vorversuche hierzu wurden bereits in früherer Arbeit [Diplomarbeit, Kristin Rausch, 2010] durchgeführt und werden in dieser Arbeit bezüglich der Applikation verifiziert. Bei Variation der Serumkonzentration von 0.6 bis 61 mg/ml durch Verdünnung mit destilliertem Wasser, bzw. mit 0.152 M NaCl Lösung kann im Bereich der Messgenauigkeit der Methode keine Veränderung des mittleren hydrodynamischen Radius festgestellt werden [Diplomarbeit, Kristin Rausch, 2010]. Die meisten Messungen von Nanopartikeln in humanem Serum erfolgen in DPBS (Invitrogen) bei einer Serumkonzentration von 30 mg/ml (Serum wird im Volumenverhältnis 1:1 mit DPBS, bzw. Partikel gelöst in DPBS gemischt). In der folgenden Tabelle sind die hydrodynamischen Radien der Einzelmoden sowie der zugehörigen Amplitudenanteile von mit DPBS verdünntem Serum ($c_{S,verd.}=30\text{mg/ml}$) sowie konzentriertem Serum ($c_{S,konz.}=59\text{ mg/ml}$) dargestellt. Innerhalb des betrachteten Konzentrationsbereiches treten somit keine mit DLS detektierbaren Veränderungen auf.

Tabelle 24: Hydrodynamische Radien der Einzelmoden und Amplitudenanteile (A/%) von konzentriertem humanem Serum ($c_{S,konz.}=59\text{ mg/ml}$) und Serum verdünnt mit DPBS ($c_{S,verd.}=30\text{ mg/ml}$) (Invitrogen).

Konzentration (mg/ml)	R_{h1} (nm)	A_1 (%)	R_{h2} (nm)	A_2 (%)	R_{h3} (nm)	A_3 (%)
59	3.2	3	24.5	27	103	70
30	2.9	3	28.4	32	121	65

3. Filtration von humanem Serum

Filtrationsexperimente des humanen Serums wurden bereits in früherer Arbeit [Diplomarbeit, Kristin Rausch] ausführlich diskutiert und das Ergebnis ist hier zusammenfassend dargestellt. GS 220 nm Filter können zur Filtration von humanem Serum verwendet werden. Die Eignung dieses Filters wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (vgl. Abbildung 78) nach verschiedenen Filtrationsschritten, DLS (Abbildung 79) sowie über Proteinbestimmung nach verschiedenen Filtrationsschritten überprüft. Es konnte mit allen Methoden keine Abnahme der Proteinkonzentration nach Filtration festgestellt werden.

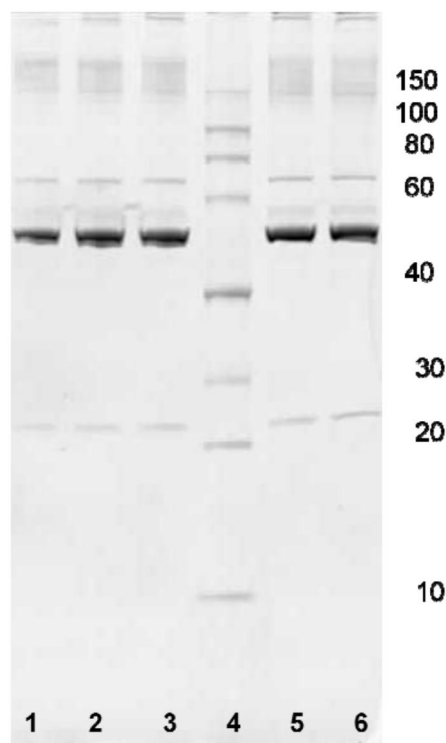


Abbildung 78: 10-20%ige SDS-Page von humanem Serum ($m=0.6\mu\text{g}$). Es sind Fraktionen des Filtrats nach GS220nm Filtration sowie das unfiltrierte humane Serum aufgetragen. In den Taschen 1, 2, 3, 5 sind die Fraktionen nach verschiedenen Durchflussvolumina (DV) aufgetragen. (1) DV = 2ml, (2) DV = 2ml + 20 Tropfen, (3) DV = 2ml + 29 Tropfen, (4) Marker, (5) DV = 2ml + 34 Tropfen, (6) unfiltriertes Serum.

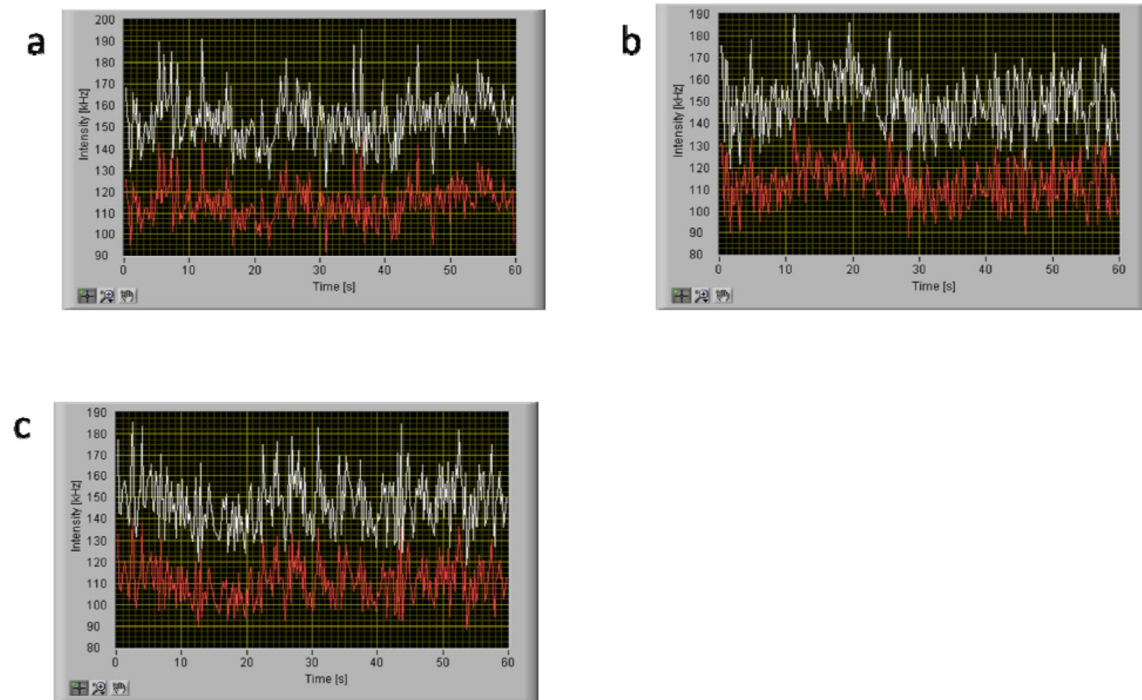


Abbildung 79: Vergleich der mittleren Streuintensität bei 90° Streuwinkel als Funktion der Zeit (a) 1 x GS220nm filtriert, (b) 2 xGS220nmfiltriert, (c)3 x GS220nm filtriert.

B. Charakterisierung von Nanopartikeln in humanem Serum

In diesem Abschnitt sind die Graphen weiterer Nanopartikel die bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum untersucht wurden angeführt.

1. Polystyrol- und Poly-Laktid –nanopartikel mit p(HPMA)-co-p(LMA) als Tensid

Polystyrol- und Polylaktid-Nanopartikel werden über Miniemulsion mit p(HPMA)-co-p(LMA) als Tensid hergestellt und bezüglich ihres Aggregationsverhaltens in Serum untersucht. Die Strukturen zeigen keine Aggregation in humanem Serum, genauere Angaben zu den Strukturen sowie die Graphen können der entsprechenden Publikation entnommen werden (Anhang C, [112]).

2. Dextran

Dextran (SigmaAldrich) wird in humanem Serum untersucht. Dextran bildet in wässriger Lösung Strukturen mit $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 17$ nm aus und zeigt keine Aggregation in humanem Serum (Abbildung 80).

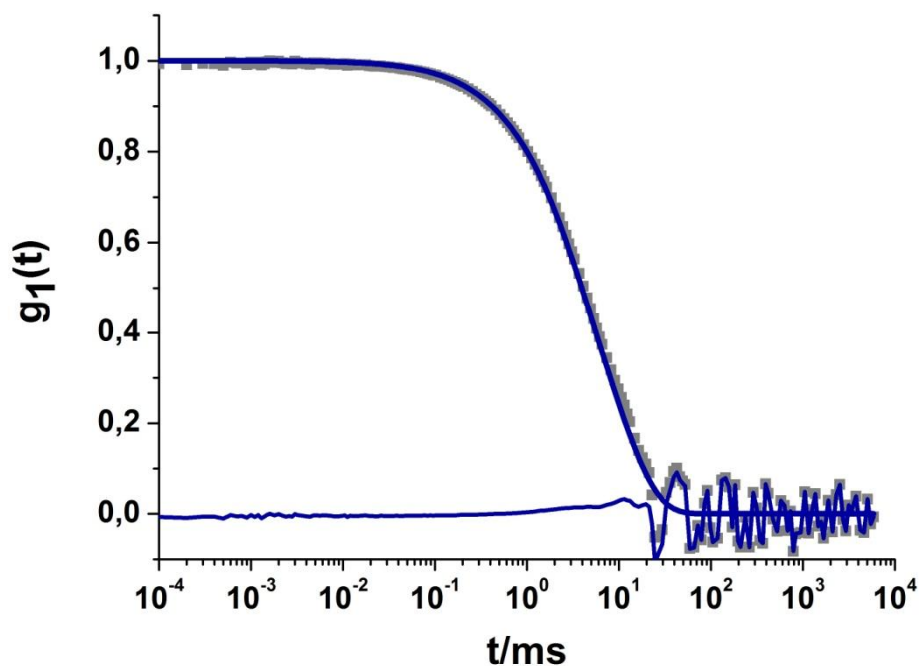


Abbildung 80: Dextran-Partikel in humanem Serum ($c_{\text{Dextran}} = 0.35$ mg/ml, $c_s = 30$ mg/ml): ■ AKF der Mischung, — Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) der Mischung aus Dextran-Partikel und Serum und Residuum, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

3. Ferromagnetische Nanopartikel in humanem Serum

Ferromagnetische Nanopartikel modifiziert mit Streptavidin (MicroBeads der Firma Miltenyi Biotec) (FeO-Partikel) werden in humanem Serum, sowie in DPBS Puffer (Invitrogen) charakterisiert. Die Partikel besitzen einen hydrodynamischen Radius von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 43$ nm und zeigen keine Aggregation in humanem Serum (Abbildung 81).

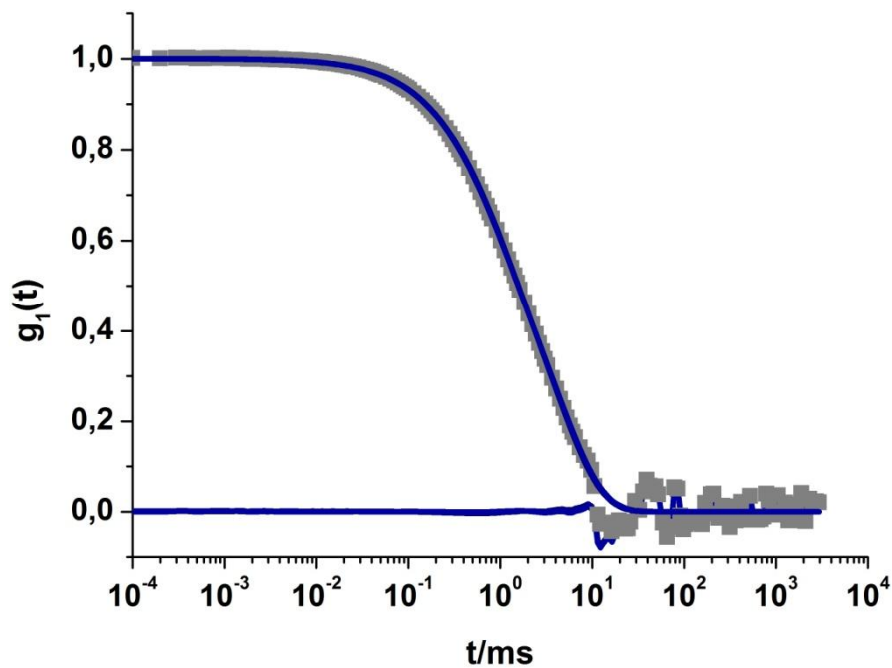


Abbildung 81: FeO-Partikel in humanem Serum (Ansatz: 10^8 Partikel pro ml Serum, $c_s = 6.6$ mg/ml):
 ▪ AKF der Mischung, — Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) der Mischung aus FeO-Partikel und Serum und Residuum, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

4. Kationische zylindrische Polymerbürsten zur DNA Transfektion

DNA wurde mit einer kationischen zylindrischen Polymerbürste mit Polyvinyl-N-ethylpyridinium bromid Seitenketten (PVP-Bürste) komplexiert [Dissertation, Frauke Kühn, 2010]. Die Konzentration des untersuchten Komplexes beträgt $c(\text{DNA}) = c(\text{PVP-Bürste}) = 10 \text{ mg/ml}$. Der hydrodynamische Radius dieses Komplexes beträgt in 0.152 M NaCl Lösung $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 123 \text{ nm}$. Der Komplex zeigt keine Aggregation in humanem Serum (Abbildung 82).

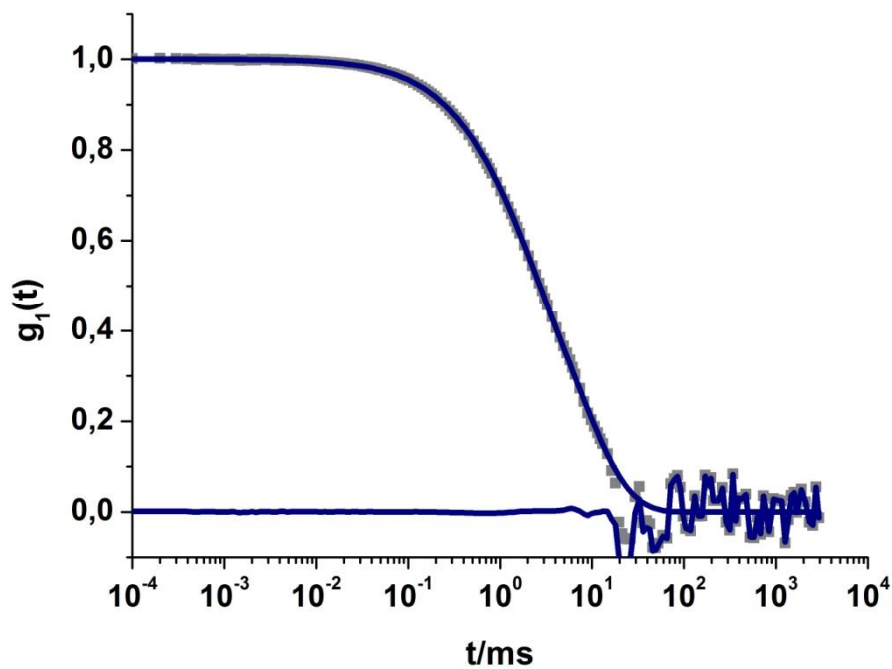


Abbildung 82: PVP-Bürste komplexiert mit DNA in humanem Serum ($c(\text{DNA}) = c(\text{PVP-Bürste}) = 10 \text{ mg/ml}$; $c_{\text{Serum}} = 46 \text{ mg/ml}$): \blacksquare AKF der Mischung, $-$ Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) der Mischung aus PVP-Bürste/DNA-Komplex und Serum und Residuum, Streuwinkel 30° , $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $T = 293 \text{ K}$.

5. Polybetaine als zwitterionische Polyampholyte in humanem Serum

Poly- ϵ -methacryloyl-L-lysine (PMALys) wurden von Desiree Weller¹⁴ über freie radikalische Polymerisation synthetisiert. Die erhaltenen Strukturen besitzen ein Molekulargewicht von $M_w = 721000$ g/mol. Das zwitterionische Polymer zeigt bei einer Konzentration von $c_{\text{PMALys}} = 0.5$ mg/ml keine Aggregation in humanem Serum ($c_s = 30$ mg/ml).

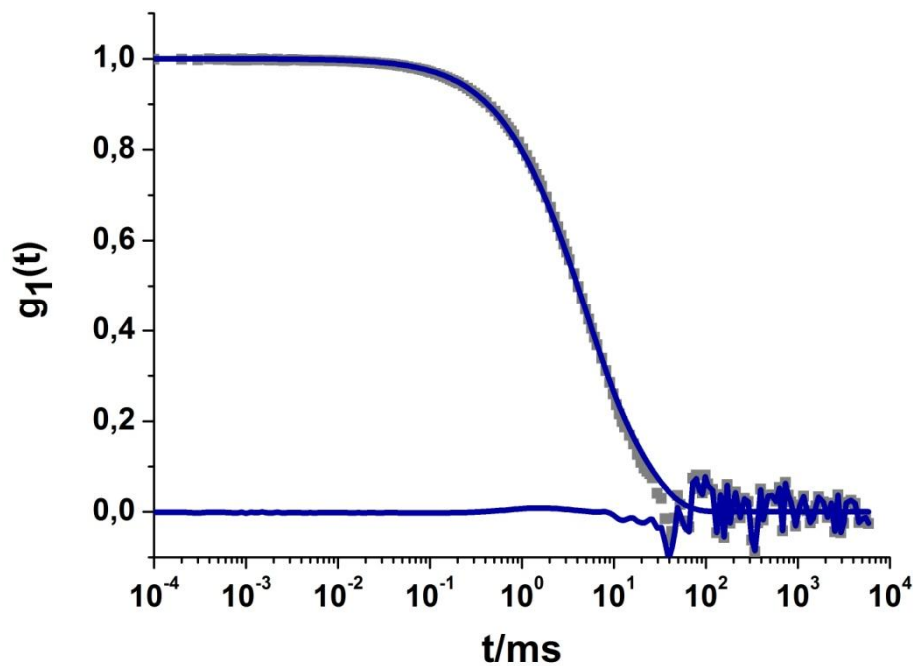


Abbildung 83: Poly- ϵ -methacryloyl-L-lysine (PMALys) ($M_n = 721000$ g/mol) in humanem Serum ($c_{\text{serum}} = 30$ mg/ml, $c_{\text{PLMALys}} = 0.5$ mg/ml): \blacksquare AKF der Mischung, $-$ Fit nach $g_1(t)_m$ (Gl.5-3) der Mischung aus Liposomen und Serum und zugehöriges Residuum, Streuwinkel 60° , $\lambda = 632.8$ nm, $T = 293$ K.

¹⁴ Desiree Weller, Arbeitskreis Prof. M. Schmidt, Johannes Gutenberg Universität Mainz

6. HPMA-co-LMA in humanem Serum

Im Folgenden sind ergänzende Graphen zum Kapitel 5.3.4. angefügt.

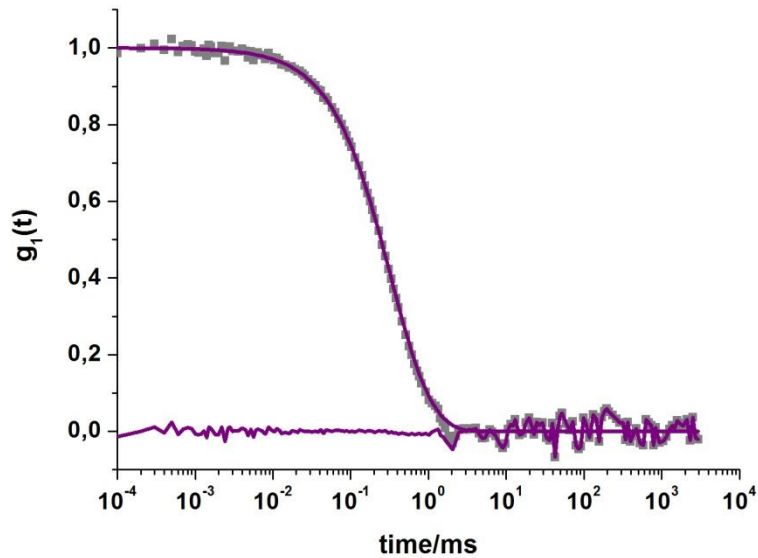


Abbildung 84: ACF von p(HPMA)-co-p(LMA) in LDL solution, Fit nach $g_1(t)_m$, Streuwinkel 60° , $T = 293,15$ K.

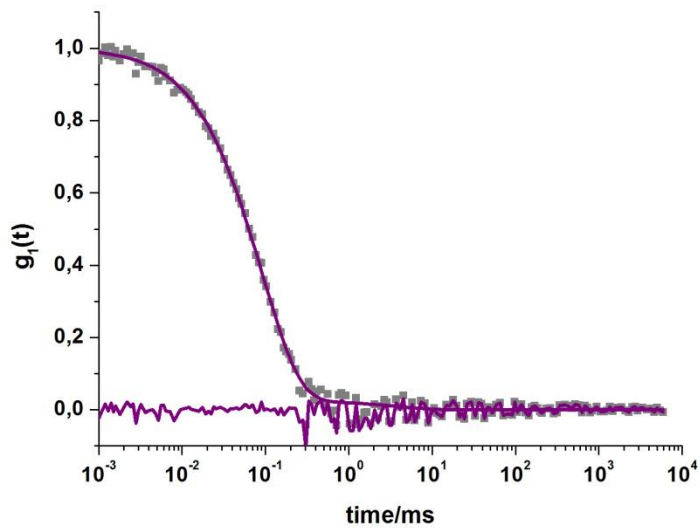


Abbildung 85: ACF von p(HPMA)-co-p(LMA) in Albumin Lösung, Fit nach $g_1(t)_m$, Streuwinkel 60° , $T = 293,15$ K.

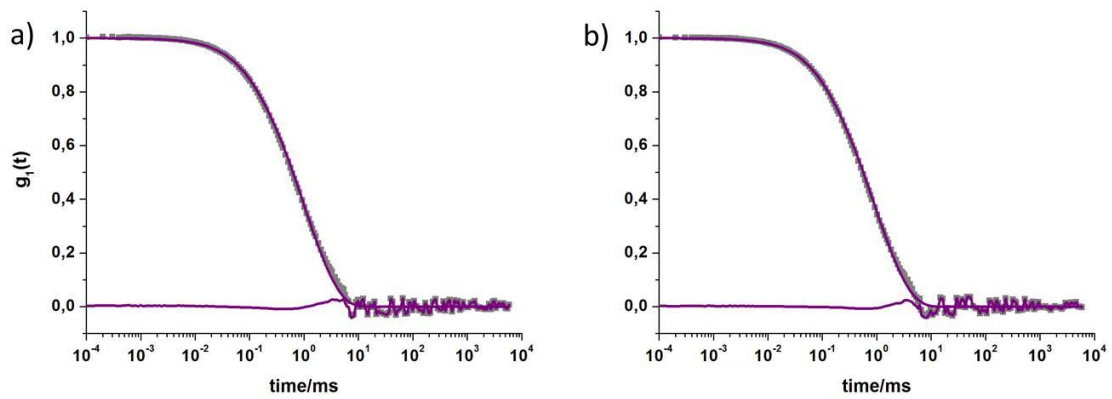


Abbildung 86: ACF of p(HPMA)-co-p(LMA) mit (a) 10% Domperidone (b) 50% Domperidone in Serum nach 24h Inkubation bei 20°C , Fit nach $g_1(t)$, Streuwinkel 60°, T = 293,15 K.

D. Abkürzungsverzeichnis

A	Amplitude
A ₂	2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks
ACF	Autokorrelationsfunktion
AP	akute phase proteins
Apo	Apolipoprotein
BSA	bovines Serum Albumin
c	Konzentration
CE	Kapillarelektrophorese
Chol	Cholesterol
Coa	coagulation factor
Compl	complement factors
CTR	Countrate
D	Diffusionskoeffizient
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dom	Domperidon
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
DSPC	Disteraoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPC	egg phosphatidyl choline
EPR	enhanced permeability and retention
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HDL	high density lipoprotein
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HPMA	hydroxypropylmethacrylamid
ICT	isothermal titration calorimetrie
IE	Ionenaustausch-Chromatographie
Ig	Immunoglobulin
LDL	low density lipoprotein
Lipo	Lipoproteine
LMA	Laurylmetacrylate
MPS	Mononukleäres-Phagozytose-System
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorit
NP	Nanopartikel
PEG	Polyethylenglykol
PEG-PLL	pegyliertes Polylysin
PLL	Poly-L-Lysin
PS	Polystyrol
REM	Rasterelektronenmikroskop
R _h	hydrodynamischer Radius
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering ribonucleic acid

SLS	statische Lichtstreuung
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TL	„Tissue leakage“ proteins
VDW	Van-der-Waals
VLDL	very low density lipoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor

Literaturverzeichnis

1. Duncan, R., *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. Nature Reviews Cancer, 2006. 6(9): p. 688-701.
2. van den Berg, J.H., et al., *Shielding the cationic charge of nanoparticle-formulated dermal DNA vaccines is essential for antigen expression and immunogenicity*. Journal of Controlled Release, 2010. 141(2): p. 234-240.
3. Walkey, C.D., et al., *Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake*. J Am Chem Soc, 2012. 134(4): p. 2139-47.
4. Walkey, C.D. and W.C. Chan, *Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment*. Chem Soc Rev, 2011.
5. Zolnik, B.S. and N. Sadrieh, *Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. 61(6): p. 422-7.
6. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nat Nanotechnol, 2007. 2(12): p. 751-60.
7. Ota, S., et al., *Concurrent criterion-related validity and reliability of a clinical device used to assess lateral patellar displacement*. J Orthop Sports Phys Ther, 2006. 36(9): p. 645-52.
8. Couvreur, P. and C. Vauthier, *Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease*. Pharm Res, 2006. 23(7): p. 1417-50.
9. Eifler, A.C. and C.S. Thaxton, *Nanoparticle therapeutics: FDA approval, clinical trials, regulatory pathways, and case study*. Methods Mol Biol, 2011. 726: p. 325-38.
10. Dobrovolskaia, M.A., D.R. Germolec, and J.L. Weaver, *Evaluation of nanoparticle immunotoxicity*. Nat Nanotechnol, 2009. 4(7): p. 411-4.
11. Dobrovolskaia, M.A. and S.E. McNeil, *Immunological properties of engineered nanomaterials*. Nat Nanotechnol, 2007. 2(8): p. 469-78.
12. Owens, D.E., 3rd and N.A. Peppas, *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. Int J Pharm, 2006. 307(1): p. 93-102.
13. Hall, J.B., et al., *Characterization of nanoparticles for therapeutics*. Nanomedicine (Lond), 2007. 2(6): p. 789-803.
14. Duncan, R., *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(9): p. 688-701.
15. Liu, Z., et al., *Interactions between solubilized polymer molecules and blood components*. J Control Release, 2012. 160(1): p. 14-24.
16. Bertrand, N. and J.C. Leroux, *The journey of a drug-carrier in the body: an anatomico-physiological perspective*. J Control Release, 2012. 161(2): p. 152-63.
17. Aggarwal, P., et al., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. 61(6): p. 428-37.
18. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. J Control Release, 2010. 145(3): p. 182-95.
19. Tenzer, S., et al., *Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis*. ACS Nano, 2011. 5(9): p. 7155-67.
20. Arvizo, R.R., et al., *Identifying new therapeutic targets via modulation of protein corona formation by engineered nanoparticles*. PLoS One, 2012. 7(3): p. e33650.
21. Rausch, K., et al., *Evaluation of Nanoparticle Aggregation in Human Blood Serum*. Biomacromolecules, 2010.
22. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. Nat Mater, 2009. 8(7): p. 543-57.
23. Lodish, H.F., *Molecular cell biology*. 5th ed. 2003, New York: W.H. Freeman and Company. xxxiii, 973, 79 p.
24. Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P., *Anatomie, Physiologie, Patophysiologie des Menschen*, ed. W.V. mbH. 2007, Stuttgart.

25. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. 1(11): p. 845-67.
26. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth, *Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation*. Clin Exp Immunol, 1988. 73(3): p. 484-8.
27. Andersen, J.T. and I. Sandlie, *The versatile MHC class I-related FcRn protects IgG and albumin from degradation: implications for development of new diagnostics and therapeutics*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. 24(4): p. 318-32.
28. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, *Human anatomy, physiology, and pathophysiology*. Reference ed. 1985, Amsterdam ; New York
New York, NY, USA: Elsevier ;. xxi, 812 p.
29. Rossing, T.H., N. Maffeo, and V. Fencl, *Acid-base effects of altering plasma protein concentration in human blood in vitro*. J Appl Physiol, 1986. 61(6): p. 2260-5.
30. Finn, T.E., et al., *Serum albumin prevents protein aggregation and amyloid formation and retains chaperone-like activity in the presence of physiological ligands*. J Biol Chem, 2012. 287(25): p. 21530-40.
31. Murray, P.R., K.S. Rosenthal, and M.A. Pfaller, *Medical microbiology*. 6th ed. 2009, Philadelphia: Mosby/Elsevier. x, 947 p.
32. Male, D.K., *Immunology*. 7th ed. 2006, [Edinburgh]: Mosby Elsevier. x, 552 p.
33. Wasan, K.M., et al., *Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. 7(1): p. 84-99.
34. Wen, Y., et al., *Chemotherapeutic-induced apoptosis: a phenotype for pharmacogenomics studies*. Pharmacogenet Genomics, 2011. 21(8): p. 476-88.
35. Vijayaraghavalu, S., D. Raghavan, and V. Labhsetwar, *Nanoparticles for delivery of chemotherapeutic agents to tumors*. Curr Opin Investig Drugs, 2007. 8(6): p. 477-84.
36. Cho, K., et al., *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. 14(5): p. 1310-6.
37. Carter, P., L. Smith, and M. Ryan, *Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology*. Endocr Relat Cancer, 2004. 11(4): p. 659-87.
38. Haag, R. and F. Kratz, *Polymer therapeutics: concepts and applications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. 45(8): p. 1198-215.
39. Knop, K., et al., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. 49(36): p. 6288-308.
40. Doshi, N. and S. Mitragotri, *Macrophages recognize size and shape of their targets*. PLoS One, 2010. 5(4): p. e10051.
41. Champion, J.A., A. Walker, and S. Mitragotri, *Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres*. Pharm Res, 2008. 25(8): p. 1815-21.
42. Kodama, T., et al., *Collagenous macrophage scavenger receptors*. Curr Opin Lipidol, 1996. 7(5): p. 287-91.
43. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. Annu Rev Biochem, 1994. 63: p. 601-37.
44. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. J Control Release, 2010.
45. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul, 2001. 41: p. 189-207.
46. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Control Release, 2000. 65(1-2): p. 271-84.
47. Davis, M.E., Z.G. Chen, and D.M. Shin, *Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2008. 7(9): p. 771-82.
48. Hu-Lieskovan, S., et al., *Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2005. 65(19): p. 8984-92.

49. Nomura, T., et al., *Effect of particle size and charge on the disposition of lipid carriers after intratumoral injection into tissue-isolated tumors*. Pharm Res, 1998. 15(1): p. 128-32.
50. Schluep, T., et al., *Pharmacokinetics and biodistribution of the camptothecin-polymer conjugate IT-101 in rats and tumor-bearing mice*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. 57(5): p. 654-62.
51. Cedervall, T., et al., *Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(7): p. 2050-5.
52. Lacerda, S.H., et al., *Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins*. ACS Nano, 2010. 4(1): p. 365-79.
53. Sharma, U.S., et al., *Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model*. Pharm Res, 1997. 14(8): p. 992-8.
54. Gavrillov, K. and W.M. Saltzman, *Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies*. Yale J Biol Med, 2012. 85(2): p. 187-200.
55. Torchilin, V.P. and V. Weissig, *Liposomes: a practical approach*. 2nd ed. Practical approach series 264. 2003, Oxford ; New York: Oxford University Press. xxiii, 396 p.
56. Mayer, L.D., et al., *Identification of vesicle properties that enhance the antitumour activity of liposomal vincristine against murine L1210 leukemia*. Cancer Chemother Pharmacol, 1993. 33(1): p. 17-24.
57. Allen, T.M., et al., *Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo*. Biochim Biophys Acta, 1991. 1066(1): p. 29-36.
58. Woodle, M.C., et al., *Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1992. 1105(2): p. 193-200.
59. Immordino, M.L., F. Dosio, and L. Cattel, *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*. Int J Nanomedicine, 2006. 1(3): p. 297-315.
60. Love, K.T., et al., *Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(5): p. 1864-9.
61. Siomi, H. and M.C. Siomi, *On the road to reading the RNA-interference code*. Nature, 2009. 457(7228): p. 396-404.
62. Whitehead, K.A., R. Langer, and D.G. Anderson, *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2009. 8(2): p. 129-38.
63. Bitko, V., et al., *Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA*. Nat Med, 2005. 11(1): p. 50-5.
64. Wagner, E., *Functional Polymer Conjugates for Medicinal Nucleic Acid Delivery*. Advanced Polymer Science, 2011.
65. Lu, J.J., R. Langer, and J. Chen, *A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery*. Mol Pharm, 2009. 6(3): p. 763-71.
66. Bansal, R., et al., *Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice*. Hepatology, 2011. 54(2): p. 586-96.
67. Poelstra, K. and D. Schuppan, *Targeted therapy of liver fibrosis/cirrhosis and its complications*. J Hepatol, 2011. 55(3): p. 726-8.
68. Schmidt, M., *Simultaneous static and dynamic light scattering: application to polymer structure analysis*. Brown (Hg.) 1993-Dynamic light scattering: p. 372-406.
69. Kühn, F., *Diplomarbeit*. Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2007.
70. Zimm, B.H., *The dependence of the scattering of light on angle and concentration in linear polymer solutions*. J Phys Colloid Chem, 1948. 52(1): p. 260-7.
71. Schärfl, W., *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions / Wolfgang Schärfl*. 2007, Berlin: Springer. xiv, 191 p.
72. Schärfl, W., 2006.
73. Berne, B.J. and R. Pecora, *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. 1976, New York: Wiley. vii, 376 p.
74. Burchard, W. and W. Richtering, *Progr. Colloid Polym. Sci*, 1989. 80(151).

75. Marquardt, D.W., *An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters*. Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics, 1963. 11(2): p. 431-441.
76. Nirschl, O., *Programmierung numerischer Modelle zur Molekülcharakterisierung gemessener Lichtstreuendaten*. Diplomarbeit, 2007.
77. Adam, Läger, and Stark, *Physikalische Chemie und Biophysik*. 2009, Berlin: Springer Verlag.
78. Lechner, M.D., K. Gehrke, and E.H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie*. 3. überarbeitete und erweiterte Ausgabe ed. 2003, Basel: Birkhäuser.
79. Koolman, J., *Taschenatlas der Biochemie*. Vol. 3. Auflage. 2002: Thieme Verlag Stuttgart.
80. Winter, R. and F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. 1998, Stuttgart: B.G.Teubner.
81. Grodzki, A.C. and E. Berenstein, *Antibody purification: affinity chromatography - protein A and protein G Sepharose*. Methods Mol Biol, 2010. 588: p. 33-41.
82. Hober, S., K. Nord, and M. Linhult, *Protein A chromatography for antibody purification*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 848(1): p. 40-7.
83. Leatherbarrow, R.J. and P.D. Dean, *Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A*. Biochem J, 1980. 189(1): p. 27-34.
84. Schwister, K., *Taschenbuch der Chemie*, ed. F. Leibzig. 2005.
85. Clark, J.L., P.F. Miller, and G. Rumbles, *J.Phys.Chem.*, 1998. 102.
86. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. 2006, New York: Springer. xxvi, 954 p.
87. Müller, W., *Hydrophobe und hydrophile Beladung Beladung polymerer Vesikel*, in *Institut für Physikalische Chemie*. 2009, Johannes Gutenberg Universität: Mainz. p. 147.
88. Zaias, J., et al., *Reference values for serum proteins of common laboratory rodent strains*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009. 48(4): p. 387-90.
89. Arnold, J.N., et al., *Human serum IgM glycosylation: identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin*. J Biol Chem, 2005. 280(32): p. 29080-7.
90. Dati, F., et al., *Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470)*. International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities. College of American Pathologists. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1996. 34(6): p. 517-20.
91. Olson, F., et al., *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*. Biochim Biophys Acta, 1979. 557(1): p. 9-23.
92. Hope, M.J., et al., *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*. Biochim Biophys Acta, 1985. 812(1): p. 55-65.
93. Klasczyk, B., et al., *Interactions of alkali metal chlorides with phosphatidylcholine vesicles*. Langmuir, 2010. 26(24): p. 18951-8.
94. Cevc, G., *Membrane electrostatics*. Biochim Biophys Acta, 1990. 1031(3): p. 311-82.
95. al., M.-U.e., *Gene vectors based on DOEPC/DOPE mixed cationic liposomes: a physical study*. Soft Matter, 2011. 7(5991).
96. Raczkowska, J., et al., *Structure evolution in layers of polymer blend nanoparticles*. Langmuir, 2007. 23(13): p. 7235-40.
97. Lian, T. and R.J. Ho, *Trends and developments in liposome drug delivery systems*. J Pharm Sci, 2001. 90(6): p. 667-80.
98. Allen, T.M. and A. Chonn, *Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system*. FEBS Lett, 1987. 223(1): p. 42-6.
99. Woodle, M.C. and D.D. Lasic, *Sterically stabilized liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1992. 1113(2): p. 171-99.
100. Kozak, D., et al., *Protein resistance of dextran and dextran-poly(ethylene glycol) copolymer films*. Biofouling, 2011. 27(5): p. 497-503.

101. Nuhn, L., et al., *Cationic nanohydrogel particles as potential siRNA carriers for cellular delivery*. ACS Nano, 2012. 6(3): p. 2198-214.
102. Li, Y., et al., *Simple and robust approach for passivating and functionalizing surfaces for use in complex media*. Langmuir, 2012. 28(25): p. 9707-13.
103. Keefe, A.J. and S. Jiang, *Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity*. Nat Chem, 2012. 4(1): p. 59-63.
104. Gessner, A., et al., *Functional groups on polystyrene model nanoparticles: influence on protein adsorption*. J Biomed Mater Res A, 2003. 65(3): p. 319-26.
105. Hemmelmann, M., et al., *Amphiphilic HPMA-LMA copolymers increase the transport of Rhodamine 123 across a BBB model without harming its barrier integrity*. J Control Release, 2012. 163(2): p. 170-7.
106. Barz, M., et al., *From defined reactive diblock copolymers to functional HPMA-based self-assembled nanoaggregates*. Biomacromolecules, 2008. 9(11): p. 3114-8.
107. Hemmelmann, M., et al., *HPMA based amphiphilic copolymers mediate central nervous effects of domperidone*. Macromol Rapid Commun, 2011. 32(9-10): p. 712-7.
108. Hemmelmann, M., et al., *Aggregation Behavior of Amphiphilic p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymers Studied by FCS and EPR Spectroscopy*. Biomacromolecules, 2012.
109. Allmeroth, M., et al., *Modifying the body distribution of HPMA-based copolymers by molecular weight and aggregate formation*. Biomacromolecules, 2011. 12(7): p. 2841-9.
110. Alyaudtin, R.N., et al., *Interaction of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier in vivo and in vitro*. J Drug Target, 2001. 9(3): p. 209-21.
111. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 47(1): p. 65-81.
112. Kelsch, A., et al., *HPMA Copolymers as Surfactants in the Preparation of Biocompatible Nanoparticles for Biomedical Application*. Biomacromolecules, 2012.
113. McNeil, S.E., *Nanoparticle therapeutics: a personal perspective*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009. 1(3): p. 264-71.
114. Walczyk, D., et al., *What the cell "sees" in bionanoscience*. J Am Chem Soc, 2010. 132(16): p. 5761-8.
115. Gessner, A., et al., *Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis*. Eur J Pharm Biopharm, 2002. 54(2): p. 165-70.
116. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
117. Cohnen, G. and D. Paar, *[Quantitative changes in serum proteins after freezing and thawing]*. Z Klin Chem Klin Biochem, 1969. 7(1): p. 63-5.
118. Sparrow, R.L., D.W. Greening, and R.J. Simpson, *A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma*. Methods Mol Biol, 2011. 728: p. 259-65.

