

Institut für Translationale Immunologie (TIM)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mit siRNA beladene Nanopartikel -  
Zwerge mit großem therapeutischem Potential

K u m u l a t i v e D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Dr. rer. nat. Leonard Kaps  
aus  
Wetzlar

Mainz, 2019

Wissenschaftlicher Vorstand: [REDACTED]

1. Gutachter: [REDACTED]

2. Gutachter: [REDACTED]

Tag der Promotion: 20.10.2020

## Inhaltsverzeichnis

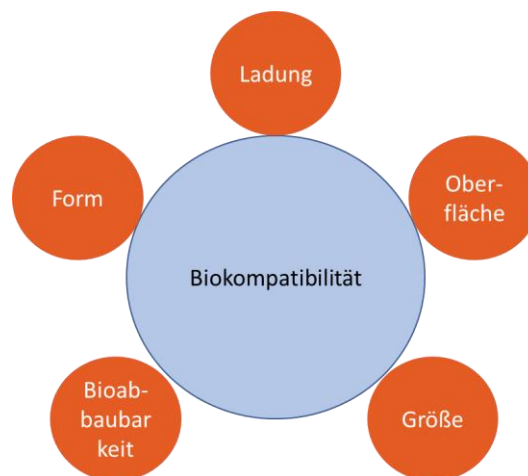
Deckblatt	I/II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	III
1. Einleitung	4
2. Zusammenfassung	5
2.1 Publikation I: $\alpha$ -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages(7)	5
2.2 Publikation II: Physicochemical and Preclinical Evaluation of Spermine-Derived Surfactant Liposomes for in Vitro and in Vivo siRNA-Delivery to Liver Macrophages(9)	9
2.3 Publikation III: Cylindrical Brush Polymers with Polysarcosine Side Chains: A Novel Biocompatible Carrier for Biomedical Applications(10)	11
3. Diskussion	14
4. Literatur	17
5. Anhang Publikationen	20
5.1 Publikation I: $\alpha$ – Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages(7)	20
5.2 Publikation II: Physicochemical and Preclinical Evaluation of Spermine-Derived Surfactant Liposomes for in Vitro and in Vivo siRNA-Delivery to Liver Macrophages(9)	20
5.3 Publikation III: Cylindrical Brush Polymers with Polysarcosine Side Chains: A Novel Biocompatible Carrier for Biomedical Applications(10)	20

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Ausschlaggebende Eigenschaften von Nanopartikeln in Bezug auf ihre.....	5
Abbildung 2. Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von. ....	6
Abbildung 3. Syntheschema der Mannose dekorierten Nanohydrogelpartikel .....	7
Abbildung 4: <i>In vitro</i> Validierung von ManNP and NonNP. (A) Zellviabilität.....	8
Abbildung 5. <i>In vitro</i> Zellaufnahme von mit (A) Oregon Green 488® oder (B).....	9
Abbildung 6. <i>In vitro</i> Knockdown durch mit anti-CSF-1R siRNA beladenen. ....	10
Abbildung 7. Physikochemische Charakterisierung und <i>in vivo/in vitro</i> Testung.....	11
Abbildung 8. A) <i>Ex vivo</i> Imaging 48 h nach intravenöser Injektion von siRNA/L-NP(-hbPG) ...	12
Abbildung 9. Schematische Darstellung der siRNA beladenen Nanobürsten, bestehend.....	13
Abbildung 10. <i>In vitro</i> Zellaufnahme von mit Fluoreszenz-markierter anti-ApoB.....	14
Tabelle 1. Physikochemische/biologische Eigenschaften der (Mannose) Nanohydrogel.....	17

## 1. Einleitung

Nanopartikel zum Transport von Wirkstoffen haben in die Klinik bereits Einzug gehalten. Sie bieten eine Antwort auf Löslichkeits- und Stabilitätsprobleme im Blutplasma und im Gewebe, fehlende Verteilungsspezifität sowie z.T. als auch auf eine geringe therapeutische Breite von Wirkstoffen(1). Durch die stetige Weiterentwicklung der nanopartikelpartikulärer Trägersysteme konnten in den letzten Jahrzehnten beachtliche Fortschritte hinsichtlich ihrer Effizienz, u.a. basierend auf Morphologie, Größe, Polarität und Oberflächeneigenschaften gemacht werden. Dies ermöglichte unter anderem die Herstellung von Trägersysteme mit einer maßgeschneiderten Bioverteilung und verbesserten Biokompatibilität(2).

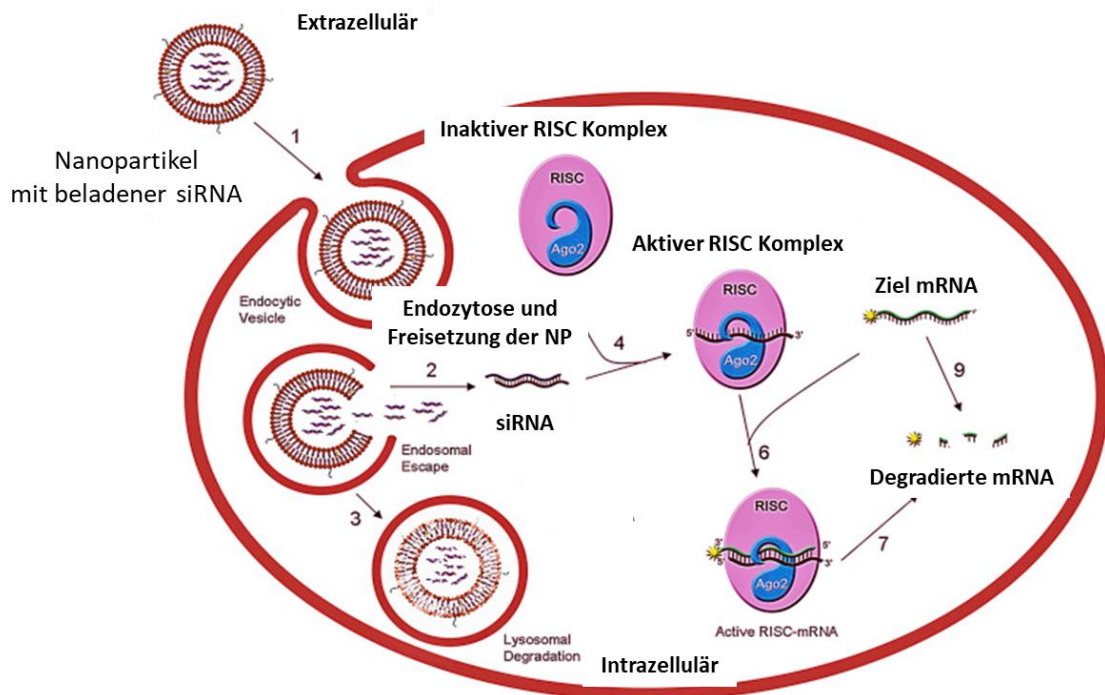


**Abbildung 1. Ausschlaggebende Eigenschaften von Nanopartikeln in Bezug auf ihre Biokompatibilität.**

Die Oberflächenladung von Nanopartikeln ist für die Interaktion mit Plasmaproteinen *in vivo* besonders wichtig und wird physikochemisch durch das zeta-Potentials quantifiziert. Für medizinische Anwendungen haben sich Systeme mit neutralem zeta-Potential und geringem Aggregationsverhalten gegenüber Plasmaproteinen bewährt(3)(2). Nanopartikel müssen sogenannte „*stealth properties*“-Tarnkappeneigenschaften (ursprünglich dem Wortschatz der Militärtechnik entliehen) mitbringen, um von unserem Immunsystem unentdeckt zu bleiben. Die Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit Protein-repulsiven Polyethylenglykol-Ketten reduziert ihre Opsonierung durch das myeloide Immunsystem und schützt somit vor einer vorzeitigen Phagozytierung im retikulohistiozytärem System(4). Nanopartikel dürfen einerseits bei wiederholter therapeutischer Anwendung keine Akkumulation im Körper aufweisen, müssen aber andererseits aber den Wirkstoff, bis zur Ankunft im gewünschten Zielorgan und der Zielzelle, ausreichend Schutz bieten(5).

Nanopartikel können neben klassischen niedermolekularen auch auf Ribonukleinsäuren basierende Wirkstoffe transportieren. RNA-Therapeutika können durch RNA-Interferenz die Expressionen von pathologisch überexprimierten Genen runterregulieren, bzw. zu einem spezifischen Knockdown des Gens führen. Small interfering RNA (siRNA), kleine RNA-Fragmente in der Größe von ~21-22 Basenpaaren, spielen in der therapeutischen Anwendung von RNA-Therapeutika eine wichtige Rolle. SiRNAs binden, nach der Aufnahme ins Zytoplasma, sequenzspezifisch an ihre komplementäre messenger RNA (mRNA) und führen in

Folge zu einem Abbau des Zieltranskripts im RISC-Proteinkomplex. Diese Spezifität erlaubt eine zielgenaue Regulation von Genen auf transkriptioneller und in Folge auf translationaler Ebene und eröffnet vielfältige therapeutische Möglichkeiten.



**Abbildung 2. Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln und siRNA induziertem Knockdown (modifizierte Graphik von Mihaila R et. al. (6)).**

Die medizinische Anwendung von siRNA *in vivo* ist jedoch mit einer Reihe von Hürden verbunden. Freie siRNA wird nach intravenöser Injektion, aufgrund ihrer Elektronegativität, rasch von Plasmaproteinen gebunden und in Folge über die Nieren ausgeschieden. Zudem bleibt siRNA vom Immunsystem nicht unentdeckt und aktiviert z.B. die Toll-like Rezeptoren TLR-3, -7 und -9. Ferner führen im Blut zirkulierende Nukleasen zu einem raschen Abbau freier Nukleinsäuren (2)(3).

Daher müssen siRNAs für einen effektiven therapeutischen Einsatz i.d.R. gut verpackt werden. Nanopartikel sind dafür die idealen Trägersysteme, die empfindlichen Moleküle an ihren Wirkort, ins Zytoplasma der Zielzelle, zu transportieren.

## 2. Zusammenfassung

### 2.1 Publikation I: $\alpha$ -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages(7)

**Autoren: Leonard Kaps\*, Nadine Leber\*, Aiting Yang, Misbah Aslam, Mariacristina Giardino, Adrian Klefenz, Niklas Choteschovsky, Sebastian Rosigkeit, Asmaa Mostafa, Lutz Nuhn, Detlef Schuppan and Rudolf Zentel (\*geteilte Erstautorenschaft)**

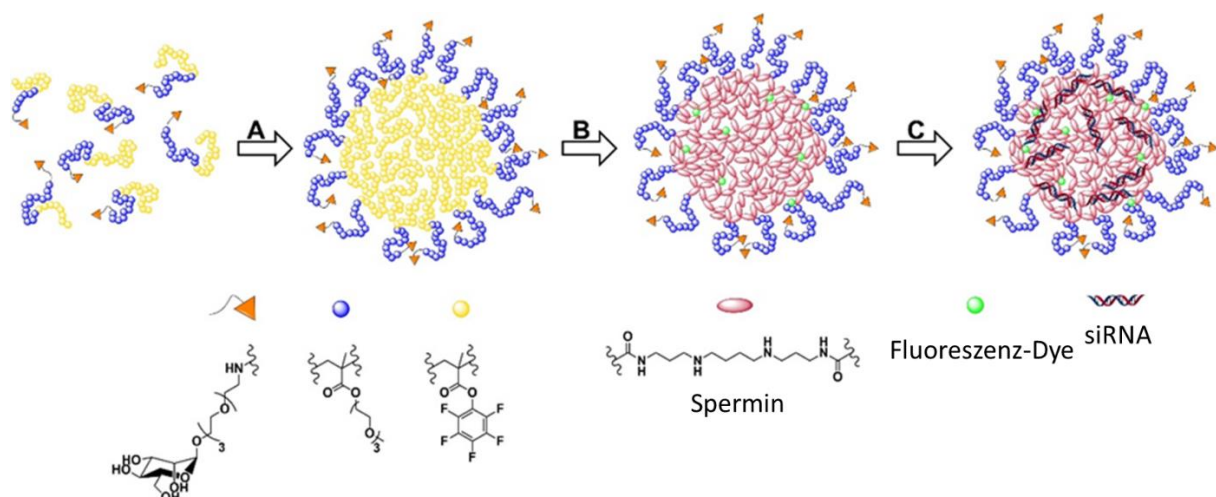
Nanohydrogele bestehen aus amphiphilen Block-Copolymeren, die in ihrem kationischem Kern Spermin als Bindungseinheit für siRNA enthalten. Anti-col1a1 (Alpha-1-Typ-I-Kollagen)

siRNA beladene Nanohydrogel Partikel (anti-col1a1 siRNA/NonNP) zeigten einen antifibrotischen Effekt in CCl<sub>4</sub> fibrotischen Mäusen. Die intravenöse Injektion von anti-col1a1 siRNA/NonNP führte zu einer Reduktion der Kollagenakkumulation und damit der Leberfibrose(3). Die Nanohydrogel Partikel wurden in dieser Arbeit schrittweise weiterentwickelt und für ihre therapeutische Anwendung *in vivo* optimiert(2). In der darauffolgenden zweiten Generation wurden die Partikel mit einem säurelabilen Kern ausgestattet, um eine verbesserte Bioabbaubarkeit nach Aufnahme in die Zelle zu ermöglichen(2).

Lebermakrophagen zeigen eine große Plastizität bezüglich ihres Phänotyps und können, entsprechend des biologischen Kontextes, in erster Näherung in pro-inflammatorische M1 oder anti-inflammatorische M2 Makrophagen eingeteilt werden. M2 Makrophagen haben einen inhibierenden Effekt auf wechselwirkende Immunzellen. Sie unterstützen somit ein immunsuppressives Mikromilieu und fördern die Immuntoleranz gegenüber Tumoren/Metastasen, sowie das Voranschreiten von Fibrose in der Leber, u.a. durch Freisetzung fibrogener Zytokine und Chemokine(8). M1 Makrophagen stellen in diesem Paradigma den Gegenspieler von M2 Makrophagen dar und zeigen anti-fibrotische, sowie Tumor-suppressive Eigenschaften(8).

Die beiden Phänotypen können unter anderem durch die Expression ihrer Oberflächenmarker unterschieden werden. M2 Makrophagen überexprimieren den Mannose-Rezeptor CD206 (siehe Abbildung 4B), welcher mit hoher Affinität Mannose bindet. Eine Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit Mannose könnte somit die Aufnahme in M2 polarisierte Makrophagen erhöhen.

In der dritten Generation der Nanohydrogelpartikel gelang, mit Hilfe eines Mannosegekoppelten Kettentransfermoleküls per RAFT (Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs) Polymerisation, die kovalente Anbindung einer Mannose Einheit an das  $\alpha$ -Ende je eines amphiphilen Block-Copolymers (Abbildung 3).



**Abbildung 3. Syntheschema der Mannose dekorierten Nanohydrogelpartikel (ManNP).** Das amphiphile Coblockpolymer Mannose-poly(tri(ethylene glycol)methyl ether methacrylate)-block-poly(pentafluorophenyl methacrylate) (Man-P(MEO3MA)-b-P(PFPMA)) aggregiert in DMSO zu Nanomizellen (A). Die kovalente Vernetzung mit Spermin, im Kern der Nanomizellen, führt zu stabilen mit Mannose dekorierten Nanohydrogelpartikeln (B/C).

Der hydrodynamische Radius der Mannose-funktionalisierten Nanohydrogelpartikel (ManNP) wurde durch dynamische Lichtstreuung auf  $\sim 40$  nm bestimmt. Die Lokalisation der Mannose auf der Oberfläche der Partikel wurde durch selektive Agglutination mit einem Concanavalin-Assays bestätigt. Die mit irrelevanter Sequenz-permutierter (*scramble*) siRNA beladenen ManNP (scsiRNA/ManNP) zeigten wie auch scsiRNA/NonNP keine Zytotoxizitäten bis zu entsprechend hohen siRNA Konzentrationen von 300 nM (Abbildung 4A). Fluoreszenz markierte siRNA/ManNP Komplexe wurden *in vitro* bevorzugt von M2 polarisierten Makrophagen aufgenommen (Abbildung 4C).

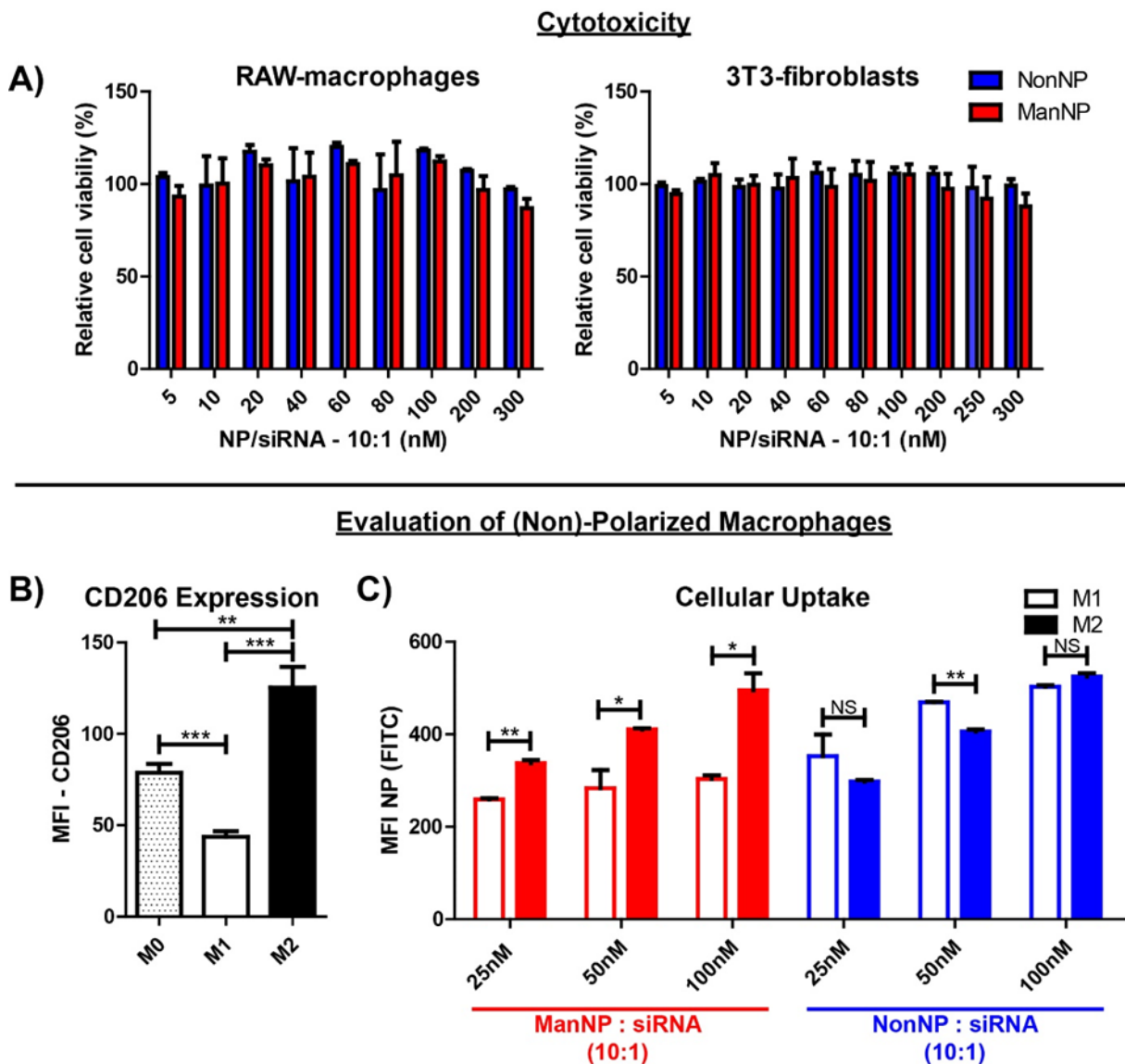
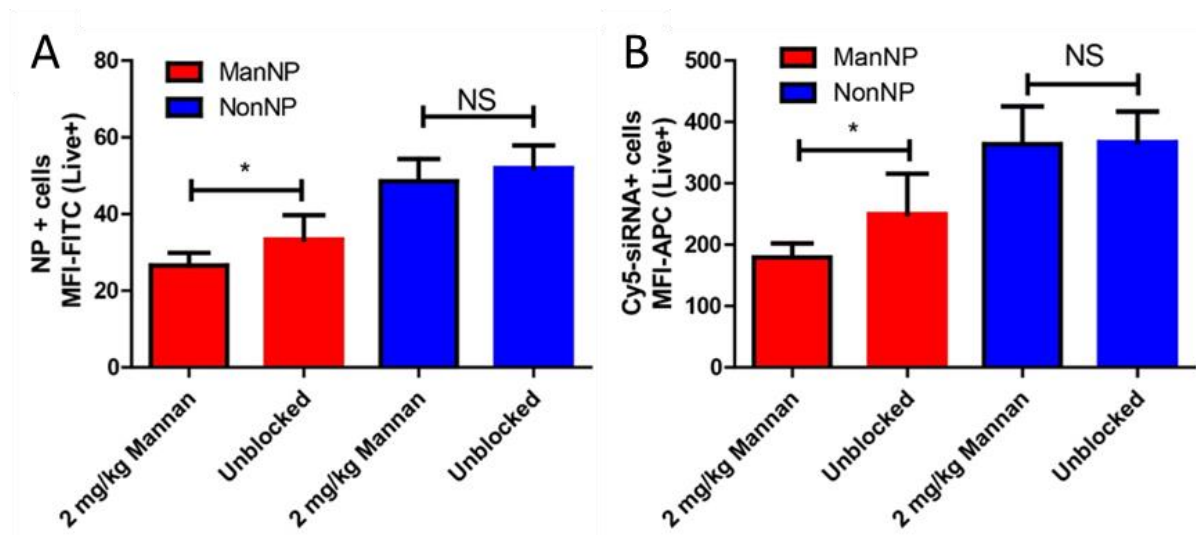


Abbildung 4: *In vitro* Validierung von ManNP and NonNP. (A) Zellviabilität von murinen RAW-Makrophagen und 3T3 Fibroblasten bei steigenden Konzentrationen von mit *scramble* siRNA (scsiRNA) beladenen ManNP/NonNP, bestimmt mittels MTT-Zellviabilitäts-Assay: Die Komplexe zeigen keinen zytotoxischen Effekt bis zu entsprechend hohen siRNA Konzentrationen von 300  $\mu$ M siRNA (10:1 Massenverhältnis (w/w) von NP:siRNA, 72 h Inkubation, n=2). (B) Expression des Mannoserezeptors CD206 in M1-, M2-polarisierten oder nativen M0 primären Makrophagen (*bone-marrow derived macrophages* - BMDM). Die Makrophagen wurden über 24 h mit den Zytokinen IL4/13 (20 ng/ml) in Richtung eines M2- oder mit LPS/Int- $\gamma$  (1 $\mu$ g/ml, 50 ng/ml) in Richtung eines M1-Phenotyps polarisiert. Für die Generierung von M0 Makrophagen, als der native Phenotyp, wurden keine Zytokine hinzugesetzt. (C) Zelluläre Aufnahme von Fluoreszenz (Oregon green<sup>®</sup>-)markierten

und mit scsiRNA beladenen ManNP/NonNP in M2- und M1-polarisierte Makrophagen bei entsprechenden Konzentrationen von 25, 50 and 100 nM nach 1 h Inkubation, bestimmt mittels Durchflusszytometrie (n=3, \*, \*\* p<0.05, 0.001).

Durch die Blockierung von CD206 Rezeptoren mit Mannan, einem Polysaccharid aus Mannose, konnte die Zellaufnahme von ManNP in M2 polarisierte Makrophagen signifikant reduziert werden. Die Zellaufnahme von NonNP wurde hingegen durch Mannan nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** *In vitro* Zellaufnahme von mit (A) Oregon Green 488<sup>®</sup> oder (B) Cy5-scramble siRNA markierten ManNP (rot) und NonNP (blau) beladen, in M2-polarisierte primäre Makrophagen, ohne und mit Blockierung des CD206 Rezeptors mit Mannan, bestimmt mittels Durchflusszytometrie: Nach Blockierung von CD206 mit Mannan zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellaufnahme von Cy5-siRNA/ManNP, wohingegen die Aufnahmeeffizienz in NonNP unverändert blieb. (Triplikate, \*p<0.05, NS – nicht signifikant)

Mit anti-CSFR-1 (*Colony stimulating factor 1 receptor*) siRNA beladene ManNP induzierten bei einer Konzentration von 100 nM siRNA einen sequenzspezifischen Knockdown von CSFR-1 Transkripten in M2-polarisierten Makrophagen, während kein Knockdown-Effekt in M1-polarisierten Makrophagen zu beobachten war (Abbildung 6). CSFR-1 ist der Rezeptor für das Zytokin CSF1 (*Colony stimulating factor 1*), das an der Ausreifung und Polarisierung von Monozyten zu (M2-)Makrophagen mitverantwortlich ist.



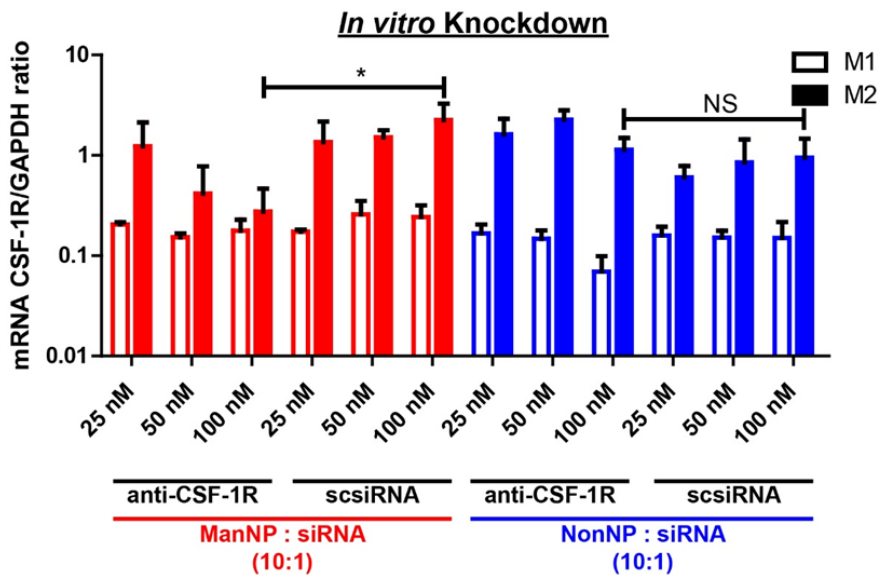


Abbildung 6. *In vitro* Knockdown durch mit anti-CSF-1R siRNA beladenen ManNP vs. NonNP in M2-polarisierten Makrophagen. CSF-1R Transkript wurde mittels qPCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) bestimmt und anschließend mit der Expression des *house keeping* Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normalisiert. Signifikanzen wurden durch one-way ANOVA berechnet (\* $p < 0.05$  vs. scsiRNA/ManNP, means  $\pm$  SD, Triplikate).

Initiale *in vivo* Biodistributionsstudien zeigten, dass nah-infrarot (CS800-Farbstoff)-markierte und mit Cy5-scramble siRNA (Cy5-scsiRNA) beladene ManNP, nach intravenöser Injektion, primär in den Lebern von CCl<sub>4</sub> leberfibrotische Mäusen akkumulierten.

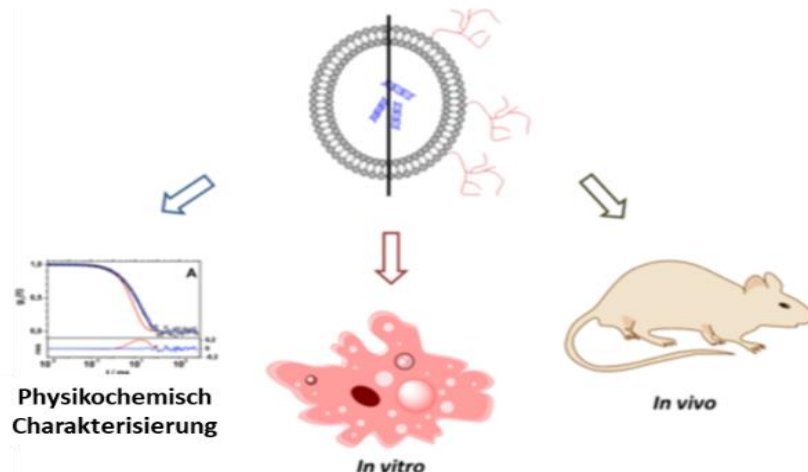
ManNP qualifizierten sich somit als vielversprechende siRNA-Träger zur Adressierung von CD206+ Makrophagen in der Leber. Weiterführende therapeutische Studien sind daher in Planung.

## 2.2 Publikation II: Physicochemical and Preclinical Evaluation of Sperm-Derived Surfactant Liposomes for *in Vitro* and *in Vivo* siRNA-Delivery to Liver Macrophages(9)

Autoren: Laura K. Müller, Leonard Kaps, Detlef Schuppan, Alexander Brose, Wenqiang Chai, Karl Fischer, Sophie Müller, Holger Frey, Manfred Schmidt, Kristin Mohr

Liposomen (L-NP), bestehend aus Cholesterol, Distearoylphosphatidylcholine, TF-Detergens (1-hydroxy-50-amino-3,4,7,10,13,16,19,22-octaoxa-37,41,45-triaza-pentacontane), sowie einem neuartigem Sperminderivat (HOEG8-C12-spermine), wurden als biokompatibles Trägersystem für siRNA physikochemisch charakterisiert und zur Adressierung von Lebermakrophagen *in vitro/in vivo* getestet (

Abbildung 7). Durch ein automatisiertes Extruderverfahren konnten einlagige Liposomen in reproduzierbarer Größe mit homogener Größenverteilung hergestellt werden. Die Liposomen änderten bei Beladung mit siRNA nicht ihre Größe. In der dynamischen Lichtstreuung konnte gezeigt werden, dass siRNA beladene L-NP in Gegenwart von menschlichem Serum Aggregate (>100 nm Durchmesser) bilden.



**Abbildung 7. Physikochemische Charakterisierung und *in vivo/in vitro* Testung der siRNA beladenen Liposomen**

Die Aggregation der L-NPs mit Plasmaproteinen *in vivo* birgt das Risiko einer eingeschränkten Zirkulationszeit oder gar Lungenembolie. Durch den Zusatz von hochvernetzten Cholesterol-Polyglycerol (hbPG) in die Formulierung wurde die sterische Abschirmung erhöht und das Aggregationsverhalten von L-NP-hbPG gegenüber Plasmaproteinen verbessert. Mit anti-CD68 siRNA beladene L-NP(-hbPG) induzierten *in vitro* einen signifikanten und sequenzspezifischen Knockdown von CD68 Transkripten in murinen RAW-Makrophagen. CD68 ist ein Oberflächenprotein und gilt Pan-Makrophagen-Marker. Zudem zeigten die L-NP(-hbPG) *in vitro* keinen Hinweis auf einen zytotoxischen Effekt. Nach intravenöser Injektion in balb/c Mäuse akkumulierten CW800-Fluoreszenz-markierte L-NP-hbPG beladen mit anti-CD68 siRNA (1 und 2 mg/kg siRNA) primär den Lebern. L-NPs ohne Zusatz von hbPG zeigten hingegen eine deutlich schlechtere Lebertargetierung (Abbildung 8A). Durchflusszytometrie von mit Kollagenase verdauten Lebern zeigte, dass eine quantitative Aufnahme (~5%) von L-NP(-hbPG) in Lebermakrophagen (CD45+, CD11b+, F4/80+) erfolgte. Mit anti-CD68 siRNA beladene L-NP(-hbPG) induzierten *in vivo* bei einer entsprechenden Konzentration von 2 mg/kg siRNA einen signifikanten und sequenzspezifischen Knockdown der Makrophagen-spezifischen CD68 Transkripte in den Lebern. Die Knockdown-Effizienz beider siRNA Träger war jedoch, trotz der besseren Lebertargetierung von L-NP-hbPG vergleichbar (Abbildung 8B).

Das zugesetzte hbPG in der liposomalen Formulierung zeigte letztendlich im Vergleich zu nativen L-NP keinen signifikanten Vorteil zur Adressierung von Lebermakrophagen, sowie keine Verbesserung der Knockdown Effizienz *in vivo*.

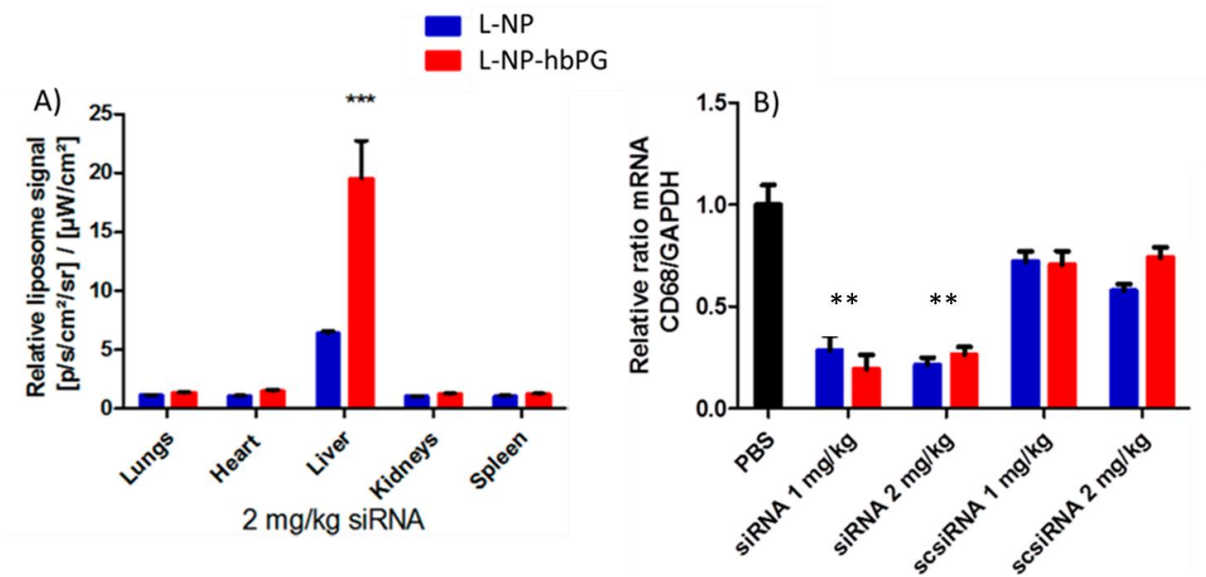


Abbildung 8. A) *Ex vivo* Imaging 48 h nach intravenöser Injektion von siRNA/L-NP(-hbPG) (2 mg/kg siRNA) in balb/c Mäusen: L-NP-hbPG zeigte im Vergleich zu L-NP eine signifikant besser Akkumulation in der Leber. B) *In vivo* knockdown: AntiCD68 siRNA/L-NP(-hbPG) führten bei einer siRNA Konzentration von 1 und 2 mg/kg siRNA zu einem sequenzspezifischen Knockdown von CD68 Transkript in den Lebern. Mit scramble siRNA beladene Partikel sowie mit PBS behandelte Tiere dienten als negativ Kontrollen (n = 3, \*\*, \*\*\*p < 0.001, 0.0001 vs. PBS/scsiRNA beladenen L-NP(-hbPG); mean ± SD).

### 2.3 Publikation III: Cylindrical Brush Polymers with Polysarcosine Side Chains: A Novel Biocompatible Carrier for Biomedical Applications(10)

Autoren: Christian Hörtz, Alexander Birke, Leonard Kaps, Sandra Decker, Eva Wächtersbach, Karl Fischer, Detlef Schuppan, Matthias Barz, and Manfred Schmidt

Zylindrische Bürstenpolymere stellen eine vielversprechende Klasse von siRNA Trägersysteme dar. Dicht aufgepfropfte Seitenketten aus Polysarkosin verleihen den Bürstenpolymeren einen intrinsischen proteinrepulsiven Effekt („*stealth properties*“) und bieten zudem die Möglichkeit der Anbindung von Biomolekülen zur Targetierung von spezifischen Zellen.

Neuartige zylindrische Bürstenpolymere mit aufgepfropften Seitenketten aus Poly-L-lysine-*b*-polysarkosin (PSar/PLL) wurden physikochemisch charakterisiert und *in vitro* für die weitere biomedizinische Anwendung evaluiert (

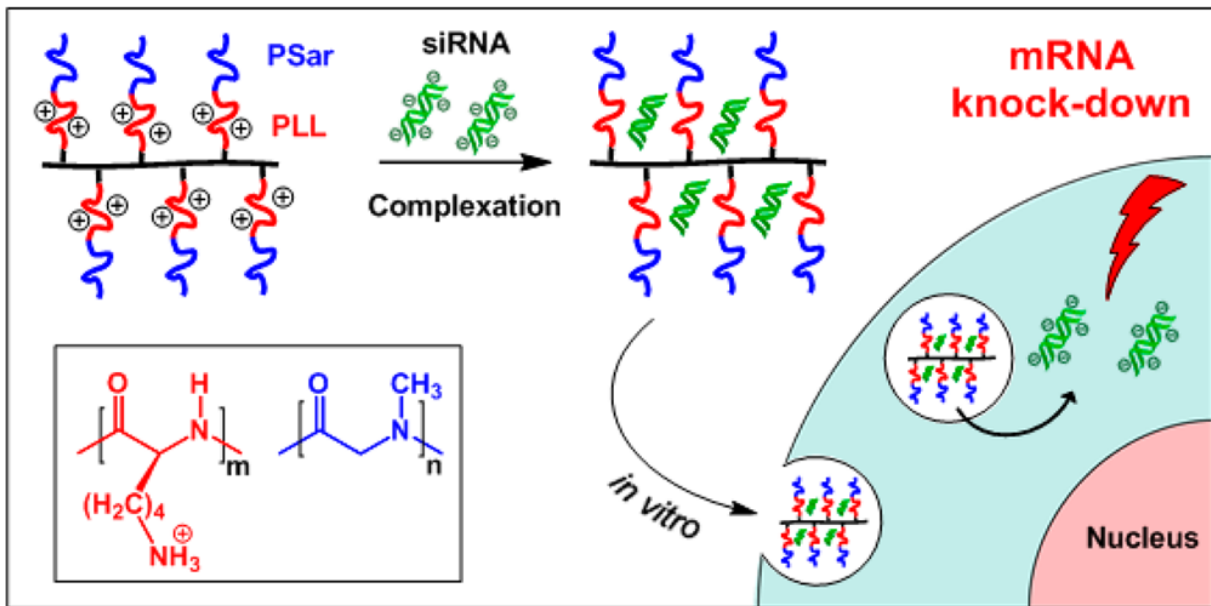
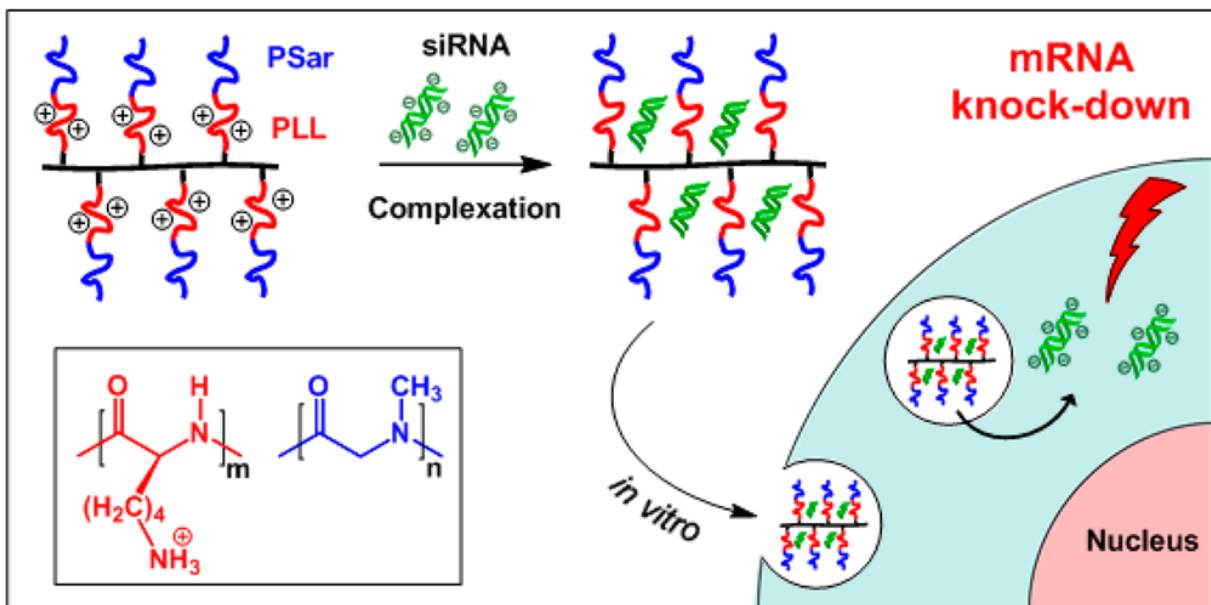


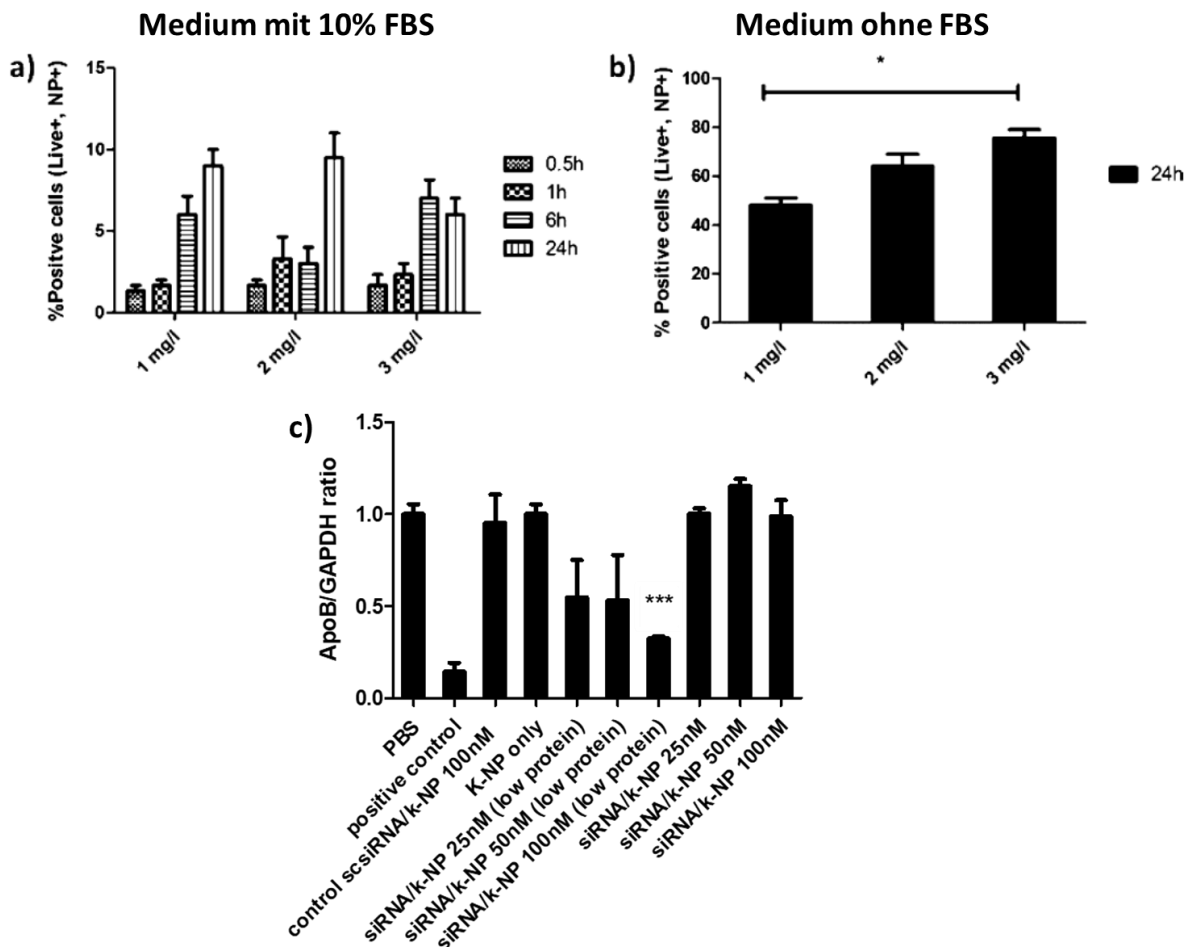
Abbildung 9).



**Abbildung 9. Schematische Darstellung der siRNA beladenen Nanobürsten, bestehend aus einem Poly[N-(6-aminohexyl)methacrylamid] (PAHMA) Rückgrad mit aufgepfropften Polysarkosinseitenketten, bei der Freisetzung ihres Cargos nach Aufnahme in die Zelle.**

Polysarkosin ist ein wasserlösliches, nicht immunogenes, Polymer auf der Basis des körpereigenen Aminosäurederivates Sarkosin (N-methy-Glyzin). Im Vergleich zu Polyethylenglykol zeigt es, auch nach wiederholter Anwendung, keine Akkumulation in filterierenden Organen (z.B. Nieren). Bürstenpolymere mit aufgepfropften Seitenketten aus Poly-L-lysine-b-polysarkosin assemblieren zu Kern-Schalepartikeln (K-NP) mit einem kationischen Poly-L-lysine (PLL)-Kern und einer neutralen Polysarkosin-Korona. Die Bürstenpolymere wurden synthetisch durch ringöffnende Polymerisation von N-Carboxyanhydrid (NCA) hergestellt. K-NP zeigten eine hohe siRNA Beladungskapazität von ~ 270 siRNA Makromolekülen pro Partikel. Sie zeigten keine Tendenz zur (Selbst-) Aggregation

im serumhaltigen Medium. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine zeitabhängige Zellaufnahme von siRNA beladenen K-NP in AML-12 murinen Hepatozyten nachgewiesen werden (Abbildung 10a). Im proteinarmen Medium, ohne 10% fötales Rinderserum (FBS), war die Zellaufnahme um den Faktor  $\sim 8$  höher (Abbildung 10b). Die mit siRNA beladenen Partikel führten nach 24 h bei einer entsprechenden Konzentration von 100 nM siRNA im proteinarmen Medium (ohne FBS) zu einem signifikanten und sequenzspezifischen Knockdown von ApoB100 Transkripten in AML-12 Hepatozyten (Abbildung 10c). In proteinhaltigem Medium zeigten die siRNA beladenen Partikel weder eine effiziente Zellaufnahme noch induzierten sie einen signifikanten Knockdown.



**Abbildung 10.** *In vitro* Zellaufnahme von mit Fluoreszenz-markierter anti-ApoB siRNA beladenen K-NP nach 0,5, 1, 6 und 24 h in a) proteinhaltigem (10 % FBS) und b) proteinarmen Medium (ohne Zusatz von FBS) in murinen AML-12 Hepatozyten, bestimmt mittels Durchflusszytometrie: Die Zellaufnahme der siRNA/K-NP in AML-12 Hepatozyten wird in Gegenwart von Serumproteinen reduziert. C) *In vitro* knockdown von anti-ApoB siRNA beladenen K-NPs im proteinhaltigen und proteinarmen Medium nach 24 h in AML-12 Hepatozyten: Die siRNA/K-NPs induzierten im proteinarmen Medium einen signifikanten und sequenzspezifischen Knockdown von ApoB RNA in AML-12 Hepatozyten. Mit scramble siRNA beladene Partikel sowie mit PBS behandelte Zellen dienten als negativ Kontrolle (n = 3, \*,\*\*\*p < 0.05, 0.0001 vs. PBS/scsiRNA loaded K-NP; mean  $\pm$  SD).

### 3. Diskussion

Zur therapeutischen Anwendung in der Leber sollten Nanopartikel einen Durchmesser von < 100 nm aufweisen(3)(2). NPs mit einem größeren Durchmesser bergen das Risiko, sich in den feinen Gefäßen insbes. der Lunge oder der Milz zu verfangen und in Folge Embolien hervorzurufen. Zu kleine Partikel hingegen bieten wenig Ladungskapazität, um therapeutisch relevante Mengen an Wirkstoff zu transportieren. Zudem passieren sehr kleine Partikel mit einem hydrodynamischen Radius < 5.5 nm den glomerulären Filter und werden rasch über die Nieren ausgeschieden(11). Neben der Größe der NPs ist die Biokompatibilität ein wichtiges Kriterium. Die Träger dürfen bei wiederholter Anwendung im Körper nicht akkumulieren und sollten im Idealfall nach dem Wirkstoff-Transport in die Zelle rasch biologisch abbaubar sein. Bis *dato* haben sich Systeme in der medizinischen Anwendung bewährt, die ein neutrales zeta-Potential aufweisen und dadurch ein geringes Aggregationsverhalten mit Plasmaproteinen aufweisen(3)(2).

Die von uns untersuchten Trägersysteme erfüllen die genannten Grundvoraussetzungen für eine *in vivo* Anwendung. Sie rangieren in der Größenordnung zwischen 20 und 100 nm und weisen, auch nach Beladung mit siRNA, eine annähernd neutrale Oberflächenladung auf. Nach Zerfall ihrer makromolekularen Struktur sind die verbleibenden Polymerketten klein genug, um rasch vom Körper eliminiert zu werden.

Vor der Anwendung in Tiermodellen müssen Nanopartikel zuerst aus ethischen, aber auch finanziellen Gesichtspunkten *in vitro* validiert werden, bevor sie ihr therapeutisches Potenzial *in vivo* unter Beweis stellen dürfen. Ihre Biokompatibilität kann durch Zellviabilitäts Assays *in vitro* eingeschätzt werden. Der MTT Assay stellt dafür eine häufige und weit verbreitete Methode dar, Nanopartikel auf ihre Zytotoxizität hin zu testen(3)(2). Die Methode beruht darauf, dass wasserlösliches MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), NADH/NADPH anhängig, zu hydrophobem blau-violetten Formazan reduziert wird. Das gebildete Formazan korreliert dabei mit der Zellviabilität und kann, nach der Auflösung in organischen Lösungsmitteln z.B. DMSO (Dimethylsulfoxid), photometrisch quantifiziert werden. Keine der getesteten Nanopartikel zeigte *in vitro* einen signifikanten zytotoxischen Effekt bis hin zu entsprechenden hohen siRNA Konzentration von 400 nM.

Die Zellaufnahme der NPs stellt eine weitere wichtige Voraussetzung für ihre spätere Effizienz *in vivo* dar. Obwohl die genauen Aufnahmewege (Endo-, Phagozytose etc.) von NPs molekularbiologisch schwierig zu bestimmen sind, lässt sich mittels Durchflusszytometrie ihre quantitative Aufnahme *in vitro* als auch, nach Verdauung des zu untersuchenden Gewebes zu einer Einzelzellsuspension, *in vivo* untersuchen.

ManNP wurden bevorzugt in M2-polarisierte primären Makrophagen aufgenommen, während ihre Aufnahme in M1-polarisierte Makrophagen vergleichsweise gering war. Zudem hob die Blockierung von CD206 mit Mannan die präferentielle Aufnahme von ManNP in M2-polarisierte Makrophagen auf. Dies lässt die Hypothese zu, dass ManNPs von CD206 Rezeptoren gebunden werden und es in Folge zur einer verbesserten Zellaufnahme der ManNP kommt.

M2 Makrophagen stellen ein attraktives Ziel für immunregulatorische Therapien dar. Durch die Förderung eines immunsuppressiven Milieus sind sie eng mit Fibrose und Tumorprogress in der Leber assoziiert. Ein hoher Anteil von M2- vs. M1-polarisierten Makrophagen ist ein prognostisch ungünstiger Faktor für das Überleben bei onkologischen Erkrankungen in der Leber oder anderen Organsystemen(12)(13).

(HbPG-)NP zeigten, nach 24 h Inkubation, eine robuste Zellaufnahme in murine MH-S Makrophagen. Interessanterweise änderte der Zusatz von hbPG zur liposomalen Formulierung nicht das Aufnahmeverhalten in Makrophagen, obwohl hbPG, synergistisch zu PEG, für einen zusätzlichen proteinrepulsiven Effekt sorgte. Die spezifischen Aufnahmewege von NPs in Makrophagen sind nicht ausreichend erforscht und bedürfen weiterer mechanistischer Untersuchung, um NPs für ihre medizinische Anwendung optimieren zu können.

Für die biomedizinische Evaluierung wurde das Polymerbürstenderivat (K-NP) mit einem höheren Sarkosin-Gewichtsanteil von 78% ausgewählt. In der dynamischen Lichtstreuung konnte gezeigt werden, dass dieses Derivat eine geringere Tendenz zu Aggregation in proteinhaltiger Lösung zeigte. Zudem tendierten K-NP mit einem kleineren Sarkosin-Block zu Autoaggregation. Nichtsdestotrotz hing die Effizienz der zellulären Aufnahme signifikant mit der Konzentration an Proteinen im Kulturmedium zusammen. Bei Zusatz von 10% fötalem Kälberserum reduzierte sich die zelluläre Aufnahme von K-NP in murine AML-12 Hepatozyten um 70%. Proteinaggregationen stellen für NPs aufgrund ihrer Größe und ihrer Ladung ein Problem dar. Die angelagerte Protein-Corona verändert die Größe und Ladung der Partikel und maskiert Liganden für ein zellspezifisches *delivery*. K-NP sind, trotz des hohen Anteils an Sarkosin, nicht ausreichend vor Auto- und Proteinaggregation geschützt. Für ihre Weiterentwicklung zur therapeutischen *in vivo* Anwendung müsste ihre hydrophile Corona optimiert werden, um eine verbesserte Zellaufnahme auch im proteinreichen Medium zu erreichen.

Die *in vitro* Knockdown Effizienz der siRNA beladenen Trägersysteme ist letztendlich ausschlaggebend, um ihren therapeutischen Wert *in vivo* abschätzen zu können.

Mit anti-CSFR-1 beladene ManNP induzierten bei 100 nM siRNA einen robusten Knockdown in M2-polarisierten primären Makrophagen, wohingegen kein Effekt in M1-polarisierten Makrophagen zu erkennen war. Die Funktionalisierung mit Mannose erhöht, durch Interaktion mit CD206, die Zellaufnahme von ManNP in M2-polarisierte Makrophagen. Die Selektivität der siRNA Nanoträger für den M2 Phänotyp ist für therapeutische Versuche von großem Wert. ManNP beladen mit siRNA, welche spezifische Rezeptoren oder Signalwege zur Aufrechterhaltung des M2-Phänotyps targetieren, könnten in Zukunft eine therapeutische Repolarisation weg von den Immuntoleranz und Fibrose-induzierenden M2- in Richtung proinflammatorischen antifibrotischen M1-polarisierten Makrophagen bewirken. Wir testen aktuell eine Reihe von vielversprechenden siRNA-Targets (z.B. Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha oder Osteopontin), die zur einer (Re-)Polarisation zum M1-Phänotyps führen könnten.

Liposomen (L-NP) beladen mit anti-CD68 siRNA induzierten einen robusten Knockdown für CD68 Transkript in murinen MH-S Makrophagen. Obwohl Nanopartikel gut von Makrophagen aufgenommen werden, sind die Fresszellen des angeborenen Immunsystems schwierig mit siRNA zu transfizieren. Ein Grund dafür ist ihre hohe Dichte an TLRs (Toll-like Rezeptoren

insbesondere TLR-3, -4 und - 7) zur Erkennung von Pathogenen auf ihrer Oberfläche. Nanopartikel werden von TLRs erkannt und aktivieren in Folge eine proinflammatorisch Kaskade, welche den Knockdown-Effekt maskiert bzw. ihm entgegenwirkt(14). Die getesteten Liposomen führten nicht zu einem derartigen Effekt und zeigten keine erkennbare Immunaktivierung.

Die mit anti-ApoB siRNA beladenen Polymerbürsten (K-NP) zeigten im voll supplementierten Medium keinen Knockdown für ApoB Transkripte in murinen Hepatozyten. Im proteinfreien Medium induzierten die siRNA beladenen Träger hingegen einen signifikanten und Sequenz-spezifischen Knockdown. Es ist davon auszugehen, dass K-NPs gegen Wechselwirkungen mit Proteinen nicht ausreichend geschützt sind und bei Auto-Aggregation oder Aggregationen mit Proteinen nicht effizient in Zellen aufgenommen werden.

Nach der *in vitro* Validierung qualifizierten sich ManNP und L-NP für eine weiterführende biologische Evaluierung *in vivo*. ManNPs zeigten *in vivo*, wie zuvor NonNPs, nach intravenöser Injektion eine hohe Akkumulation in den Lebern von leberfibrotischen Mäusen. ManNP wurden in therapeutischen Dosen gut vertragen und zeigten laborchemisch, als auch histologisch in Leberdünnschnitten keine akute Toxizität. In initialen *in vivo* Experimenten zeigte sich, dass ManNP eine verbesserte Kolo-kalisation mit CD206+ Lebermakrophagen, im Vergleich zu NonNP, aufweisen. Zudem reduzierte die Mannose Funktionalisierung eine unspezifischen Zellaufnahme in CD206-negativen Leberzellen. Die Mannose scheint einen Beitrag zur sterischen Abschirmung des Partikels, zusätzlich zur PEG-Korona, zu leisten. Die genauen mechanistischen Effekte werden in unserer Gruppe momentan genauer untersucht.

Auch L-NP akkumulierten, nach intravenöser Gabe, in den Lebern und wurden auf zellulärer Ebene quantitativ (~7%) von Lebermakrophagen aufgenommen. HbPEG-stabilisierte Liposomen reicherten sich, im Vergleich zu Kontroll-Liposomen ohne hbPEG, signifikant stärker in den Lebern an. *In vivo* führte der hbPEG Zusatz zu einer verlängerten Zirkulation im Blut mit weniger Retention in extrahepatischen Organen (z.B der Milz). Jedoch korrelierte das verbesserte *Lebertargeting* von mit anti-CD68 siRNA beladenen L-NP-hbPEH nicht mit ihrem Knockdown Effekt in der Leber. Es ist zu vermuten, dass neben der makroskopischen auch die mikroskopische Verteilung, sowie die zelluläre Aufnahme und Prozessierung in den Zielzellen eine entscheidende Rolle spielt. Hier bedarf es weiterer mechanistischer Untersuchungen, um das Verhalten der Liposomen nach Aufnahme in ihre Zielzellen besser zu verstehen.

In der Zusammenschau der Daten zeigten die Polymerbürstenderivate (k-NP) als siRNA Träger *in vitro* kein Potenzial, welches eine weitere Testung *in vivo* gerechtfertigt hätte. Nichtsdestotrotz könnten Polymerbürsten mit ihrem longitudinalen Aufbau in Zukunft eine Rolle als siRNA Träger spielen. Ihre chemische Struktur, mit der Vielzahl an reaktiven Gruppen, bietet Verbesserungsmöglichkeiten, die Wechselwirkungen mit Proteinen zu reduzieren und weitere Modifikationen zum zellspezifischen *Targeting* einzuführen. Zudem könnte die reduzierte Zellaufnahme im proteinhaltigen Medium letztendlich ein Vorteil sein und k-NP durch Optimierung mit den entsprechenden Liganden eine hohe Spezifität für die adressierten Zielzellen verleihen. Die nächsten Generationen dieser NPs werden zeigen, wie wertvoll sie letztendlich für den medizinischen Einsatz sind.



Liposomen L-NP-hbPEG haben gezeigt, dass durch Optimierung der protein-repulsiven Korona mit hbPEG die Zirkulationszeit der Partikel im Blut verlängert werden kann. Jedoch führte die hbPEG Modifikation letzten Endes nicht zu einer verbesserten Aufnahme in Lebermakrophagen oder gar einem effizienteren Knockdown-Effekt. Das Verhalten von Nanopartikeln *in vivo* ist komplex und es bedarf weiterer Untersuchungen bezüglich ihrer zellulären Aufnahme und intrazellulären siRNA Freisetzung.

Mit Mannose funktionalisierte Nanohydrogele konnten *in vivo* mit einer guten Biokompatibilität und ihrem selektiven *Targeting* für CD206+ Lebermakrophagen überzeugen. Sie sind vielversprechende siRNA Trägersysteme für weiterführende therapeutische Studien *in vivo*. Jedoch bleibt ihre Transfektionseffizienz *in vivo* noch abzuwarten. Therapeutische Versuche *in vivo* sind mit diesen Partikeln in Planung.

In Tabelle 1 sind, der besseren Übersicht halber, die physikochemischen und biologischen Eigenschaften der *in vivo* getesteten NPs gegenübergestellt.

**Tabelle 1. Physikochemische/biologische Eigenschaften der ManNP/NonNP und (hbPG)-L-NP**

	Physikochemische Eigenschaften		Biologische Eigenschaften			
	Radius (nm)	zeta Potential siRNA/NP Komplex (mVal)	Zytotoxizität <i>in vitro</i>	Knockdown <i>in vitro</i>	Biodistribution <i>in vivo</i>	Knockdown <i>in vivo</i>
L-NP	61	-5,2 ± 9,6	keine bis 400 nM siRNA	bei 100 nM antiCD68 siRNA	Moderate Akkumulation in der Leber (~5% in Makrophagen)	bei 2 mg/kg antiCD68 siRNA
L-NP-hbPG	62	-7.7 ± 5.9			Hohe Akkumulation in der Leber (~5% in Makrophagen)	
NonNP	11.9	-1.1 ± 0.2	keine Zytotoxizität bis 400 nM siRNA	signifikanter Knockdown bei 100 nM antiCSFR1/col1a1 siRNA	Hohe Akkumulation in der Leber (~20% in Makrophagen)	bei 2 mg/kg anticol1a1 siRNA
ManNP	9.5	1.7 ± 0.1			Hohe Akkumulation in der Leber (spezifischer Uptake in CD206+ Makrophagen)	

#### 4. Literatur

Im Folgenden ist die zitierte Literatur der Einleitung, Zusammenfassung und Diskussion aufgeführt. Für die in den Publikationen aufgeführte Literatur verweise ich freundlich auf das Literaturverzeichnis der jeweiligen Publikationen (**Publikationen stehen in der Online Version aus urheberrechtlichen Gründen nicht zur Verfügung**).

1. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2008 May 24 [cited 2019 May 5];83(5):761–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.clpt.6100400>
2. Leber N, Kaps L, Aslam M, Schupp J, Brose A, Schäffel D, et al. SiRNA-mediated *in vivo* gene knockdown by acid-degradable cationic nanohydrogel particles. J Control Release

[Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 12];248:10–23. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916309221>

3. Kaps L, Nuhn L, Aslam M, Brose A, Foerster F, Rosigkeit S, et al. In Vivo Gene-Silencing in Fibrotic Liver by siRNA-Loaded Cationic Nanohydrogel Particles. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(18):2809–15.

4. Hak S, Helgesen E, Hektoen HH, Huuse EM, Jarzyna PA, Mulder WJM, et al. The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging. *ACS Nano* [Internet]. 2012 Jun 26 [cited 2018 Oct 21];6(6):5648–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22671719>

5. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2013 Mar 10 [cited 2018 Sep 29];166(2):182–94. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912008553>

6. Mihaila R, Ruhela D, Keough E, Cherkaev E, Chang S, Galinski B, et al. Mathematical Modeling: A Tool for Optimization of Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of siRNA. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2017 Jun 16 [cited 2018 Sep 29];7:246–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28624200>

7. Leber N, Kaps L, Yang A, Aslam M, Giardino M, Klefenz A, et al.  $\alpha$ -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages. *Macromol Biosci*. 2019;1900162:1–12.

8. Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* [Internet]. 2015 Sep;39:S51–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2015.05.005>

9. Müller LK, Kaps L, Schuppan D, Brose A, Chai W, Fischer K, et al. Physicochemical and Preclinical Evaluation of Spermine-Derived Surfactant Liposomes for in Vitro and in Vivo siRNA-Delivery to Liver Macrophages. *Mol Pharm* [Internet]. 2016;acs.molpharmaceut.6b00312. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00312>

10. Hörtz C, Birke A, Kaps L, Decker S, Wächtersbach E, Fischer K, et al. Cylindrical Brush Polymers with Polysarcosine Side Chains: A Novel Biocompatible Carrier for Biomedical Applications. *Macromolecules* [Internet]. 2015;48(7):2074–86. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma502497x>

11. Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy TY, Vathy LA, Bergey EJ, Sajjad M, et al. In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. *ACS Nano* [Internet]. 2010 Feb 23 [cited 2018 Oct 21];4(2):699–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088598>

12. Yeung OWH, Lo C-M, Ling C-C, Qi X, Geng W, Li C-X, et al. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *J*

Hepatol [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2018 Oct 6];62(3):607–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827814007958>

13. Zhang M, He Y, Sun X, Li Q, Wang W, Zhao A, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. J Ovarian Res [Internet]. 2014 Feb 8 [cited 2018 Oct 6];7(1):19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507759>

14. Chen P, Kanehira K, Taniguchi A. Role of toll-like receptors 3, 4 and 7 in cellular uptake and response to titanium dioxide nanoparticles. Sci Technol Adv Mater [Internet]. 2013 Feb [cited 2018 Oct 13];14(1):015008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27877566>

## 5. Anhang Publikationen

**Aus urheberrechtlichen Gründen steht der Anhang in der Online Version nicht zur Verfügung.**

**5.1 Publikation I:  $\alpha$  – Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages(7)**

**5.2 Publikation II: Physicochemical and Preclinical Evaluation of Spermine-Derived Surfactant Liposomes for in Vitro and in Vivo siRNA-Delivery to Liver Macrophages(9)**

**5.3 Publikation III: Cylindrical Brush Polymers with Polysarcosine Side Chains: A Novel Biocompatible Carrier for Biomedical Applications(10)**