

Plasmaproteine:

Adsorption auf Nanopartikeln und der daraus resultierende Effekt in vivo

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Boris Petri

aus Idstein

Dezember 2005

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. R.H. Müller

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. J. Kreuter

Disputation am 12. April 2006

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzungen der Dissertation	4
2	METHODEN	6
2.1	2-D PAGE.....	6
2.2	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	15
2.3	Laserdiffraktometrie.....	16
2.4	Zetapotentialmessungen	16
2.5	Bengalrosaadsorption	17
2.6	Bestimmung der Oberflächenladungsdichte.....	18
3	UNTERSUCHUNG KATIONISCH GELADENER PARTIKEL MIT UNTERSCHIEDLICHER OBERFLÄCHENLADUNGSDICHTE	19
3.1	Einführung	19
3.2	Synthese der Partikel.....	21
3.3	Physikochemische Charakterisierung	22
3.4	Proteinadsorption.....	24
3.5	Zusammenfassung und Fazit.....	33

4	EXAKTE QUANTIFIZIERUNG EINZELNER PLASMAPROTEINE ANHAND VON KALIBRIERGERADEN AN PEGYLIERTEN STYRENMODELLPARTIKELN	35
4.1	Einführung	35
4.2	Physikochemische Charakterisierung	36
4.3	Detektion der Latexpartikel	37
4.4	Erstellen der Kalibriergeraden und Berechnung	41
4.5	Ermittlung der Proteinbeladung	48
4.6	Fazit.....	50
5	PLASMAPROTEINADSORPTION AUF MIT DOXORUBICIN BELADENEN UND UNBELADENEN PBCA-NANOPARTIKELN MIT HUMAN- UND RATTENPLASMA ZUR ÜBERWINDUNG DER BBB.....	52
5.1	Einleitung	52
5.2	Ergebnisse der 2-D PAGE- und Tierstudien	58
5.3	Diskussion	99
5.4	Fazit.....	105
6	AMPHOTERICIN B-NANOSUSPENSIONEN ZUR THERAPIE VON <i>BALAMUTHIA MANDRILLARIS</i>	107
6.1	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	107
6.2	Amphotericin B.....	108
6.3	Herstellung und Prüfung der Nanosuspensionen.	109
6.4	2-D PAGE.....	112

6.5	Tierstudie	113
6.6	Fazit.....	114
7	ZUSAMMENFASSUNG	115
8	SUMMARY	118
9	ANHANG.....	121
9.1	Lösungen für die 2-D PAGE	121
9.2	Verwendete Pufferlösungen.....	125
9.3	Färbeprotokoll	127
9.4	Chemikalienliste	128
9.5	Abkürzungen.....	130
10	REFERENZEN	132
11	DANKSAGUNG.....	142
12	PUBLIKATIONEN	143
13	LEBENS LAUF.....	145

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Müller für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Möglichkeit der freien Gestaltung dieser Doktorarbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter vom Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main für die Herstellung und Überlassung der PBCA-Partikel. Frau Dr. Svetlana Gelperina danke ich für die Durchführung der Tierstudien am Zentrum für Molekulare Diagnostik in Moskau. Durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft tragen beide wesentlichen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit

Herrn Dr. Bernd-Reiner Paulke vom Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung, Golm, danke ich für die Synthese der in dieser Arbeit untersuchten Polymerpartikel sowie seiner steten Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Dr. Sven Edel, geb. Schmidt, danke ich für die Vermittlung der Grundkenntnisse der 2-D PAGE.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises und auch bei den Studenten bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich im Scherkhaus eine tolle Zeit erleben durfte. Besonderer Dank geht hier an Frau Dr. Ilona Buttle für die schönen Stunden im 2-D PAGE-Labor.

Herrn Felix Troester und Herrn Dr. Wolfgang Mehnert danke ich für die Durchsicht meines Manuskriptes.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern Anneliese und Karl-Heinz Petri sowie meinem Onkel und Freund Herrn Franz Hikade für die Unterstützung und Liebe, die sie mir in allen Situationen meines bisherigen Lebens zuteil werden ließen.

12 Publikationen

Zeitschriftenartikel

Labarre, D., Vauthier, C., Chauvierre, C., Petri, B., Müller, R.H., Chehimi, M. (2005) Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush, *Biomaterials* 26 (24): 5075-84

Lemarchand, C., Gref, R., Passirani, C., Garcion, E., Petri, B., Müller, R.H., Costantini, D., Couvreur, P. (2005) Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems, *Biomaterials*

Proceedings:

Müller, R.H., Petri, B. 2002. PathFinder technology for the delivery of drugs to the brain. In: 4th World Meeting Pharm., Biopharm., and Pharm. Technology, Florence

Petri, B., Paulke, B.R, Mothes, R., Schweigert, F.J., Müller, R.H. 2004. Plasma protein adsorption on PEG-grafted polystyrene nanoparticles measured by 2-D PAGE and SELDI-TOF MS. In Annual Meeting of the Controlled Release Society (CRS) Honolulu, Hawaii

Abstracts:

Petri, B., Müller, R.H. 2002. Detektion von Plasmaproteinadsorption auf Modellnanopartikeln mit 2-D-PAGE-Gelelektrophorese. In Jahrestagung der Pharmazeutischen Gesellschaft, Berlin, *Archiv der Pharmazie* 1, Suppl., 118,2002

Petri, B., Paulke, B.R., Müller, R.H. 2003. Plasma protein adsorption of model PEG-Nanoparticles with increasing PEG-400-MMA surface chain density.

In: 11th European Congress on Biotechnology, Basel, P342, 2003

Petri, B. Roedl, W., Wagner, E. Müller, R.H. 2003. Plasma protein adsorption on DNA-PEI complexes with different hydrophobicity, In: Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), Salt Lake City, W5062

Petri, B., Paulke, B.R., Müller, R.H. 2003. Plasma protein adsorption of model PEG-Nanoparticles with increasing PEG 200-MMA surface chain density. In: Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), Salt Lake City, W4166, 2003

13 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Boris Petri
 Geburtsdatum: 19.04.1973
 Geburtsort: Wiesbaden
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 – 1985 Gesamtschule Hünstetten-Wallrabenstein
 1985 – 1992 Pestalozzischule Idstein
 27.05.1992 Erwerb der Allgemeinen Fachhochschulreife

Berufsbildung:

1992 – 1993 Studium des Maschinenbaus an der Uni Dortmund
 1993 – 1996 Ausbildung zum Pharmazeutisch-Technischen-Assistenten an der Fresenius Akademie Wiesbaden
 1996 – 2000 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
 27.08.1998 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 30.03.2000 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 05/00 – 10/00 Praktikum an der University of Utah, Utah USA
 11/00 – 04/00 Praktikum in der „Apotheke Neues Kranzler Eck“ Berlin
 29.05.2001 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 03.07.2001 Erteilung der Approbation
 seit 01.10.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der FU Berlin
 Betreuung der Studierenden in den Praktika Arzneiformenlehre I+II
 Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Dr. R.H. Müller