

**Pharmazeutisch-biotechnologische Anwendungen von  
Festen Lipidnanopartikeln (SLN):  
Vakzinadjuvantien und Gentransfervehikel**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kerstin Tabatt

Berlin 2002

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

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. C.-M. Lehr

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2002

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.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Nano- und mikropartikuläre Arzneistoffträgersysteme .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Feste Lipidnanopartikel.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Ziele der Dissertation .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>4</b>
2.1.1	Hochdruckhomogenisation.....	4
2.1.1.1	LAB 60 .....	4
2.1.1.2	Micron LAB 40 .....	5
2.1.1.3	EmulsiFlex <sup>®</sup> -B3.....	5
2.1.2	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	5
2.1.3	Laserdiffraktometrie (LD) .....	6
2.1.4	Zetapotential (Laser Doppler Anemometrie) .....	7
2.1.5	Dynamische-Differenz-Kalorimetrie.....	8
2.1.6	Dampfsterilisation .....	9
2.1.7	Huhnmodell .....	9
2.1.8	Aufarbeitung der Eidotter.....	10
2.1.9	Enzymimmunoassay .....	11
2.1.10	Kolorimetrie/UV-Vis-Spektroskopie .....	12
2.1.11	Gewebeschnitte.....	13
2.1.12	Agarose-Gel-Elektrophorese .....	13
2.1.13	Zellkultur .....	14
2.1.14	Bestimmung der Zytotoxizität.....	14
2.1.14.1	Laktatdehydrogenaseaktivitätsbestimmung (LDH-Test) .....	15
2.1.14.2	WST-1 Test .....	15
2.1.15	Transfektion.....	16
2.1.15.1	Cos-1 Zellen .....	16
2.1.15.2	16HBE14o Zellen.....	17

2.1.16	Proteinbestimmung .....	17
2.1.17	Eichung des Luminometers .....	17
2.1.18	Statistische Analyse .....	19
<b>2.2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Lipide .....	20
2.2.1.1	Compritol ATO 888.....	20
2.2.1.2	Hartparaffin.....	20
2.2.1.3	Cetylpalmitat.....	20
2.2.1.4	Dynasan 112 und Dynasan 114 (D112, D112).....	21
2.2.1.5	Miglyol 812 (Neutralöl).....	21
2.2.1.6	Lipofundin <sup>®</sup> MCT 10 % .....	21
2.2.2	Tenside.....	21
2.2.2.1	Tween 80 .....	21
2.2.2.2	Span 85 .....	22
2.2.3	Kationische Lipide.....	22
2.2.3.1	Benzalkoniumchlorid (BA) .....	22
2.2.3.2	Cetylpyridiniumchlorid (CPC) .....	23
2.2.3.3	Cetrimid (CTAB).....	23
2.2.3.4	Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB).....	24
2.2.3.5	1,2-Dioleyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) .....	24
2.2.3.6	Esterquart (EQ1).....	24
2.2.3.7	Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE).....	25
2.2.4	Adjuvantien.....	26
2.2.4.1	Freunds unvollständiges Adjuvans (FIA).....	26
2.2.4.2	Freunds vollständiges Adjuvans (FCA).....	26
2.2.5	Antigene.....	26
2.2.5.1	Mycoplasma bovis .....	26
2.2.5.2	Murines Immunglobulin G .....	26
2.2.6	Sekundärer Antikörper.....	26
2.2.7	Peroxidasesubstrate.....	27
2.2.7.1	o-Phenylendiamin (OPD) .....	27
2.2.7.2	Tetramethylbenzidin (TMB).....	27
2.2.8	Blocker der unspezifischen Bindungen .....	28

2.2.9	Plasmid-DNA .....	28
2.2.10	Polyethylenimin (pEI) .....	28
2.2.11	Escort <sup>TM</sup> .....	28
2.2.12	Dotap liposomales Transfektionsreagenz .....	29
<b>3</b>	<b>SLN ALS IMPFSTOFFADJUVANTIEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>30</b>
3.1.1	Impfstoffadjuvantien .....	30
3.1.2	SLN als Impfstoffadjuvantien .....	35
3.1.3	Zielsetzung der Arbeit .....	36
<b>3.2</b>	<b>SLN als Adjuvans für die Vakzinierung von Hennen .....</b>	<b>37</b>
3.2.1	Versuchsplanung .....	37
3.2.2	Herstellung der Adjuvantien .....	37
3.2.3	Partikelgrößen und Zetapotentialbestimmung .....	38
3.2.4	Testung an Hennen .....	39
3.2.4.1	Immunsierungsschema .....	39
3.2.4.2	Probennahme .....	39
3.2.4.3	Entwicklung des ELISA-Tests .....	39
3.2.4.4	Vergleich der Antikörpertiter gegen die Zeit .....	42
3.2.4.5	Gewebeschnitte .....	43
3.2.5	Zusammenfassung .....	45
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung zum Einfluß der Adjuvansmenge und der Partikelgröße auf die Immunantwort am Huhnmodell .....</b>	<b>46</b>
3.3.1	Versuchsplanung .....	46
3.3.2	Formulierungsentwicklung und Herstellung der Adjuvantien .....	46
3.3.3	Testung an Hennen .....	48
3.3.3.1	Immunsierungsschema .....	48
3.3.3.2	Probennahme .....	49
3.3.3.3	Auswertung der Dotterproben .....	49
3.3.3.4	Gewebeschnitte .....	59
3.3.4	Ergebnisse .....	63
<b>3.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>65</b>

<b>4</b>	<b>SLN ALS GENTRANSFERVEHIKEL.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>66</b>
4.1.1	Prinzip der Transfektion .....	66
4.1.2	Virale Transfektion .....	66
4.1.3	Nichtvirale Transfektion .....	67
4.1.4	Mechanismus der nichtviralen Transfektion .....	70
4.1.5	Gentherapie.....	72
4.1.6	SLN als Transfektionsagenzien .....	73
4.1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	74
<b>4.2</b>	<b>Formulierungsentwicklung und –optimierung I.....</b>	<b>75</b>
4.2.1	Formulierungsentwicklung .....	75
4.2.1.1	Kationische Lipide.....	75
4.2.1.2	Matrixlipid .....	76
4.2.1.3	Tensid .....	76
4.2.1.4	Herstellung.....	77
4.2.1.5	Lagerung.....	79
4.2.2	Physikalische Charakterisierung.....	80
4.2.2.1	Partikelgrößenbestimmung .....	80
4.2.2.2	Zetapotential .....	86
4.2.2.3	Agarose-Gel-Elektrophorese .....	87
4.2.3	Zellbiologische Charakterisierung der kationischen SLN.....	96
4.2.3.1	Zytotoxizität.....	96
4.2.3.2	In-vitro-Transfektion .....	102
4.2.3.3	Proteingehalt als Maß der Zytotoxizität .....	112
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	114
<b>4.3</b>	<b>Formulierungsentwicklung und –optimierung II.....</b>	<b>119</b>
4.3.1	Formulierungsentwicklung .....	119
4.3.2	Herstellung.....	120
4.3.2.1	Matrixlipid .....	121
4.3.2.2	Tensid .....	122
4.3.2.3	Kationisches Lipid .....	122
4.3.2.4	Lysosomotrophes Agens.....	122



4.3.2.5	Lagerung.....	123
4.3.3	Physikalische Charakterisierung.....	124
4.3.3.1	Partikelgrößenbestimmung.....	124
4.3.3.2	Zetapotential.....	129
4.3.3.3	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	130
4.3.4	Zellbiologische Charakterisierung.....	132
4.3.4.1	In-vitro-Transfektion.....	132
4.3.4.2	Zytotoxizität.....	143
4.3.5	Weitergehende Untersuchungen zum Chloroquin-Einfluß.....	147
4.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	149
<b>4.4</b>	<b>Vergleich mit Liposomen.....</b>	<b>153</b>
<b>4.5</b>	<b>Weitergehende physikalische Charakterisierung.....</b>	<b>159</b>
4.5.1	Differential Scanning Calorimetrie (DSC).....	159
4.5.2	Sterilisation.....	162
<b>4.6</b>	<b>Steigerung der Transfektionseffizienz durch den Einsatz von Kernlokalisationssequenzen (NLS).....</b>	<b>166</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>172</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>175</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>191</b>
<b>7.1</b>	<b>Verwendete Abkürzungen.....</b>	<b>191</b>
<b>7.2</b>	<b>Lieferrachweise der Geräte und Materialien.....</b>	<b>194</b>
7.2.1	Geräte.....	194
7.2.2	Materialien.....	195
<b>7.3</b>	<b>Verwendete Puffersubstanzen und Lösungen.....</b>	<b>198</b>
<b>7.4</b>	<b>Publikationen und Kongreßbeiträge.....</b>	<b>200</b>
7.4.1	Publikationen.....	200
7.4.2	Kongreßbeiträge.....	201

<b>7.5</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>202</b>
<b>7.6</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>203</b>