

**Proteinadsorptionsmuster auf i. v. Nanocarriern
als Schlüssel für das Drug Targeting**

**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

Mirko Jansch

aus

Lippstadt

2012

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2008 bis Juli 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer H. Müller am Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, Biopharmazie und NutriCosmetics, Freie Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Cornelia M. Keck

Disputation am 12.09.2012

Meiner Familie mit großem Dank gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2. DISKUSSION.....	12
2.1 Methodik	14
2.2 Drug Targeting Potenzial von Nevirapin-Nanosuspensionen in die Zellen des MPS	19
2.3 Drug Targeting Potenzial von Didanosin beladenen NLC's in das Gehirn	22
2.4 Bioabbaubare Polyethylencarbonat-Nanopartikel als vielversprechendes Arzneistoffträgersystem mit potentiellen „Stealth“-Eigenschaften.....	25
2.5 Adsorptionskinetik von Plasmaproteinen auf ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln.....	28
2.6 Einfluss der Partikelform auf die Plasmaproteinadsorption und die Makrophagenaufnahme	31
3. PUBLIKATIONEN	33
3.1 <i>In vitro</i> protein adsorption studies on nevirapine nanosuspensions for HIV/AIDS chemotherapy	33
3.2 Evaluation of the <i>in vitro</i> differential protein adsorption patterns of didanosine-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for potential targeting to the brain.....	42
3.3 Biodegradable poly(ethylene carbonate) nanoparticles as a promising drug delivery system with “stealth” potential.....	53
3.4 Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles.....	62

3.5 Influence of particle shape on plasma protein adsorption and macrophage uptake	72
4. ZUSAMMENFASSUNG.....	98
5. SUMMARY	102
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	105
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118
8. PUBLIKATIONSLISTE.....	120
9. DANKSAGUNG	124

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Heute gibt es zahlreiche hochwirksame Arzneistoffe zur Behandlung vieler Krankheiten. Jedoch ist die Behandlung in den meisten Fällen noch nicht optimal. Dies liegt zum einen daran, dass der Wirkstoff nicht zielgerichtet zum Ort des Geschehens gelangt und zum anderen führt der Wirkstoff an anderen Stellen im menschlichen Körper unerwünschte Nebeneffekte herbei. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts hat der Wissenschaftler Paul Ehrlich seine Vision von den „magic bullets“ veröffentlicht (Ehrlich, 1906). Damit definierte er Arzneistoffe, die zielgerichtet zum Ort des Geschehens gelangen und zwar ausschließlich dorthin. Heute, mehr als 100 Jahre später, muss man konstatieren, dass seine Idee vom zielgerichteten Arzneistofftransport (Drug Targeting) noch nicht vollständig erfolgreich umgesetzt werden konnte.

Für den zielgerichteten Arzneistofftransport bietet sich als Eintrittspforte vor allem die intravenöse (i. v.) Applikation an (Kreuter, 1983; Speiser, 1998). Auf diesem Weg gelangen, im Gegensatz zu anderen Applikationswegen, 100 % der injizierten Dosis direkt in den menschlichen Blutkreislauf. Über das Blut wird der Arzneistoff in die verschiedenen Körperregionen bzw. Organe transportiert. Als optimale Drug-Delivery-Systeme für die intravenöse Applikation sind nanopartikuläre Arzneistoffträger („Nanocarrier“) anzusehen (Müller, 1991; Kreuter, 1994). Diese weisen durch ihre Größe ($<1000 \text{ nm}$; $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) enorme Vorteile gegenüber anderen Trägersystemen auf. So lässt sich insbesondere die Transportkapazität durch eine an den Arzneistoff angepasste Trägermatrix signifikant erhöhen (Speiser, 1998). Des Weiteren ist aufgrund der geringen Partikelgröße eine gute Gefäß- und Gewebegängigkeit gewährleistet, soweit es sich um stabile Systeme handelt. Andererseits erlangt aber auch das Thema Nanotoxizität eine immer größere Bedeutung, sowohl bei den staatlichen Zulassungsbehörden, als auch in der öffentlichen Wahrnehmung. Die Verkleinerung der Partikelgröße der Arzneistoffträger hat eine enorme Zunahme der Oberfläche zur Folge, wodurch dann auch automatisch andere Eigenschaften, wie beispielsweise die Adhäsionsfähigkeit verändert werden. Eine erhöhte Oberflächenaktivität kann dabei auch zu einer gesteigerten

Toxizität führen. Eine erhöhte Produktion freier Radikale aufgrund der Interaktion des Nanopartikels mit der Zelloberfläche wird diskutiert (Warheit, 2008). Zudem weisen Partikel mit einer Größe unter 100 nm ein deutlich höheres Toxizitätspotenzial auf, da sie über den Prozess der Endozytose von allen Zellen aufgenommen werden können (Müller et al., 2011b). Generell sollte man die regelmäßige Applikation von nicht bioabbaubarem Nanomaterial vermeiden, da sich dieses dauerhaft im Gewebe ablagern und dort die Zellen auf lange Sicht schädigen könnte (Koosha et al., 1989; Müller et al., 2011b). Diese Problematik kann durch den Einsatz bioabbaubarer Materialien vermieden werden.

Nanocarrier werden grundsätzlich in anorganische und organische Trägersysteme unterteilt. Zu den anorganischen Nanocarriern zählen vor allem Metall-Nanopartikel, wie Eisenoxid- oder Goldpartikel (Gupta et al., 2007; Ghosh et al., 2008). Zu den organischen Nanocarriern gehören unter anderem die Liposomen, Polymerpartikel, feste Lipidnanopartikel (SLN), nanostrukturierte Lipidanopartikel (NLC) sowie Nanokristalle (Soppimath et al., 2001; Sawant und Torchilin, 2010; Müller et al., 2011a; Müller et al., 2011b).

Nach erfolgter i. v. Applikation der Nanocarrier stellt sich die Frage, wie ein gezielter Transport des Arzneistoffes an den gewünschten Wirkort im Organismus erreicht werden kann? Zur Beantwortung muss man sich zunächst vor Augen führen, was mit dem Arzneistoff bzw. Arzneistoffträger nach Eintritt in den Blutkreislauf passiert. Das Blut ist im menschlichen Organismus das verbindende Medium und verantwortlich für den Transport von Nährstoffen, Sauerstoff und Abfallprodukten. Bei Menschen, wie auch bei Nagetieren, macht es ca. 6-7 % des Gesamtgewichts aus. Man unterteilt das Blut in spezielle Zellen und das proteinreiche Plasma. Zu den zellulären Bestandteilen gehören die Erythrozyten (rote Blutkörperchen), die Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und die Thrombozyten (Blutplättchen). Das Blutplasma wiederum besteht aus einer wässrigen Lösung (ca. 90 % Wasser), in welcher sich Proteine, Salze und andere niedermolekulare Stoffe (z. B. Monosaccharide) befinden. Das Plasma ist unter anderem verantwortlich für den Stofftransport, die Immunabwehr, die

Blutgerinnung sowie die Aufrechterhaltung des pH-Wertes und des osmotischen Druckes. Von Gerinnungsfaktoren befreites Blutplasma wird als Serum bezeichnet.

Der Hauptgrund, warum der zielgerichtete Arzneistofftransport nach wie vor nicht zufriedenstellend umgesetzt werden konnte, liegt darin, dass der menschliche Körper über Jahrtausende ein perfekt funktionierendes Abwehrsystem sowohl gegen alternde und veränderte Zellen, als auch Fremdstoffe jeglicher Art entwickelt hat. Bei der Erkennung und Elimination von nicht körpereigenen Stoffen greifen verschiedene physiologische Systeme ineinander und sorgen dafür, dass dem Organismus kein Schaden entsteht. Nun stellen intravenös injizierte Arzneistoffträger in der Regel ebenfalls Fremdkörper dar, die es von Seiten des Organismus zu eliminieren gilt. Für diese Aufgabe ist das Immunsystem im menschlichen Körper verantwortlich (Delves und Roitt, 2000). Es besteht aus verschiedenen Organen, Blutzellen und Molekülen. Man unterscheidet dabei zwischen der unspezifischen, angeborenen und der spezifischen, erworbenen Immunabwehr. Zu der unspezifischen Immunabwehr zählen unter anderem das Komplementsystem sowie die Phagozytose. Die spezifische Immunabwehr zeichnet sich vor allem durch die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten aus. Die T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark und tragen auf ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor, mit welchem sie ein spezifisches Antigen erkennen können. Die B-Lymphozyten werden ebenfalls im Knochenmark gebildet, gehören wie die T-Lymphozyten zur Gruppe der Leukozyten. und können im Gegensatz zu diesen auch freie Antigene erkennen.

Bei der Erkennung und Elimination von körperfremden Stoffen nehmen die Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS; früher: Retikuloendotheliales System, RES) eine Schlüsselrolle ein. Zu diesem Abwehrsystem gehört eine Vielzahl an Zellen in Leber, Milz, Lunge und Lymphknoten sowie im Knochenmark. Zu den am besten erforschten Zellen des MPS zählen die Makrophagen (Gordon, 1995). Diese entstehen über mehrere Zwischenschritte aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks und

realisieren im Zusammenspiel mit den Lymphozyten die wesentlichen Schritte der antigenspezifischen Immunabwehr. Ein kleiner Teil der Makrophagen zirkuliert im Blut (Monozyten), ein Großteil ist fest lokalisiert und wird auch als Gewebsmakrophagen bezeichnet, z. B. die Kupfferschen Sternzellen in der Leber, die Alveolarmakrophagen in der Lunge oder auch Makrophagen in Knochenmark, Lymphknoten und Milz. Die elementare Aufgabe der Makrophagen ist die Phagozytose. Dabei werden Krankheitserreger und anderes Fremdmaterial durch die Makrophagen aufgenommen und anschließend als Antigene auf der Zelloberfläche für die T-Lymphozyten präsentiert.

Ist der i. v. applizierte Arzneistoff nicht gegen einen Erreger, der in den Zellen des MPS lokalisiert ist, vorgesehen, so ist es wichtig, der Erkennung durch die Makrophagen entgegenzuwirken. Normalerweise werden 80-90 % der i. v. injizierten Partikel bereits innerhalb von 5 min durch die Kupffer-Zellen in der Leber aufgenommen, und weitere 2-5 % werden durch die Makrophagen der Milz innerhalb der gleichen Zeitperiode eliminiert (O'Mullane et al., 1987; Müller, 1991; Liliemark et al., 1995). Diese Vorgänge machen deutlich, wie schwer es ist, einen zielgerichteten Arzneistofftransport zu erreichen. Ohne einen besonderen Schutz vor den Makrophagen verbleibt nur noch ein sehr geringer Prozentsatz an injizierten Nanocarriern, der in andere Organe, wie Niere, Herz, Lunge oder Knochenmark gelangen kann. Dementsprechend gering ist dann auch die erwünschte Arzneimittelwirkung.

Um der frühen Erkennung durch die Zellen des MPS zu entgehen und ein Drug Targeting in primär nicht zugängliche Körperbereiche zu erreichen, ist es notwendig, die Nanocarrier vor den Zellen des MPS zu schützen. Besonders häufig wird dazu die Oberfläche der Arzneistoffträger mit Polyethylenglykol (PEG), einem hydrophilen, nichtionischem Polymer modifiziert (Harper et al., 1991; Gref et al. 1993; Li et al., 2001; Moghimi et al., 2001; van Vlerken, 2007). Dadurch entstehen sogenannte „Stealth“-Systeme, die für das MPS „unsichtbar“ sind. Dies hat zur Folge, dass die Arzneistoffträger länger im Blut zirkulieren und so eine höhere Anreicherung des Arzneistoffs im Zielgewebe

erfolgen kann. Es stellt sich nun die Frage, wie sich darüber hinaus ein zielgerichteter Arzneistofftransport erreichen lässt?

Nachdem die Nanocarrier i. v. appliziert worden sind, kommt es zur Interaktion mit dem Blut. Dabei adsorbieren Plasmaproteine auf der Oberfläche der Nanocarrier. Mitunter kommt es auch zu einem Austausch von adsorbierten Proteinen durch andere Proteine. Durch diese Adsorptions- und Desorptionsvorgänge verändern sich das äußere Erscheinungsbild der Nanocarrier und somit auch die weiteren Interaktionsfähigkeiten. Man bezeichnet die adsorbierten Proteine auch als Proteinkorona (Cedervall et al., 2007; Lundqvist et al., 2008). Die Korona hat einen entscheidenden Einfluss darauf, was mit dem Nanocarrier passiert und wohin er im menschlichen Körper gelangt, da sie die Kontaktfläche für Biomoleküle, Zellen und biologische Oberflächen im physiologischen System, dem menschlichen Körper, darstellt.

Anfangs wurden noch die physikochemischen Eigenschaften der Partikel, bzw. der Nanocarrier allein verantwortlich gemacht für die resultierende Organverteilung. Dabei wurden jeweils einzelne Parameter, wie Größe oder Ladung der Partikel verändert und die anschließend erhaltenen Unterschiede im *in-vivo*-Verhalten dadurch versucht zu erklären. So haben Wilkens und Myers die Eliminationsrate von i. v. applizierten Partikeln durch die Leber allein der Partikelladung zugeschrieben (Wilkens und Myers, 1966). Oder die Partikelgröße wurde in Korrelation mit der resultierenden Organverteilung gesetzt (Davis, 1981).

Mit Beginn der 1980er Jahre hat man dann die Gesamtheit der physikochemischen Oberflächeneigenschaften der Partikel als bedeutend für die *in-vivo*-Verteilung angesehen und sich nicht mehr nur auf einen Parameter bezogen. Diese Annahme respektiert die Tatsache, dass die Veränderung einer physikochemischen Eigenschaft der Partikel ändert, dies häufig auch Einfluss auf weitere physikochemische Eigenschaften hat. So variieren z. B. bei Polystyren-Partikeln mit zunehmender Partikelgröße auch die Anzahl der funktionellen Gruppen und die Oberflächenhydrophobizität.

Aber auch diese Sichtweise reichte nicht aus, um das *in-vivo*-Verhalten von i. v. applizierten Partikeln hinreichend erklären zu können. Müller veröffentlichte seine Forschungsergebnisse über drei unterschiedliche Polystyren-Partikel und deren Organverteilung (Müller, 1991). Es handelte sich jeweils um 60 nm Polystyren-Partikel, einmal ohne Oberflächenmodifikation und je einmal mit Poloxamin 908 und Poloxamer 407 modifiziert. Die unmodifizierten Polystyren-Partikel wiesen eine hohe Oberflächenladung auf und waren sehr hydrophob. Diese Eigenschaften führen bekanntermaßen zu einer schnellen Aufnahme durch die Zellen des MPS (Wilkins und Myers, 1966; van Oss et al., 1983), was auch in den *in-vivo*-Daten ersichtlich wurde. Die mit Poloxamin 908 modifizierten Polystyren-Partikel waren ungeladen und sehr hydrophil. Dies wiederum sind Charakteristika für eine geringere Aufnahme durch Makrophagen des MPS und eine längere Verweildauer im Blutkreislauf (Illum et al., 1987). Belegt wurde dies durch die erhaltenen *in-vivo*-Daten. Die mit Poloxamer 407 modifizierten Polystyren-Partikel waren ähnlich wie die mit Poloxamin 908 modifizierten ungeladen und wiesen eine zu diesen sehr ähnliche Oberflächenhydrophilie auf. Im resultierenden Organverteilungsmuster ergaben sich aber deutliche Unterschiede. Zwar entgingen die mit Poloxamer 407 modifizierten Polystyren-Partikel ebenfalls einer Aufnahme in Leber und Milz, aber anders als bei den mit Poloxamin 908 modifizierten Polystyren-Partikeln ergab sich bei ihnen eine deutliche Anreicherung im Knochenmark. Ähnliche Ergebnisse mit Poloxamer 407 überzogenen Polystyren-Partikeln wurden auch von anderen Wissenschaftlern beschrieben (Illum und Davis, 1987).

Zur Erklärung dieses unterschiedlichen *in-vivo*-Verhaltens reichten nun die physikochemischen Eigenschaften der Partikel allein nicht aus, so dass den Proteinen im Blut eine Schlüsselrolle zugeschrieben wurde. Basierend auf den Zusammenhängen zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Partikel, den auf den Partikeln adsorbierten Blutproteinen und dem *in-vivo*-Verteilungsmuster der Partikel entstand das Konzept der „Differenzierenden Adsorption“ (Müller und Heinemann, 1989). Dabei bestimmen die physikochemischen Eigenschaften der Partikel, welche Blutproteine sich auf der

Partikeloberfläche anlagern. Diese wiederum beeinflussen im nächsten Schritt, was mit den Partikeln passiert, also deren Organverteilung. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 1 graphisch dargestellt.

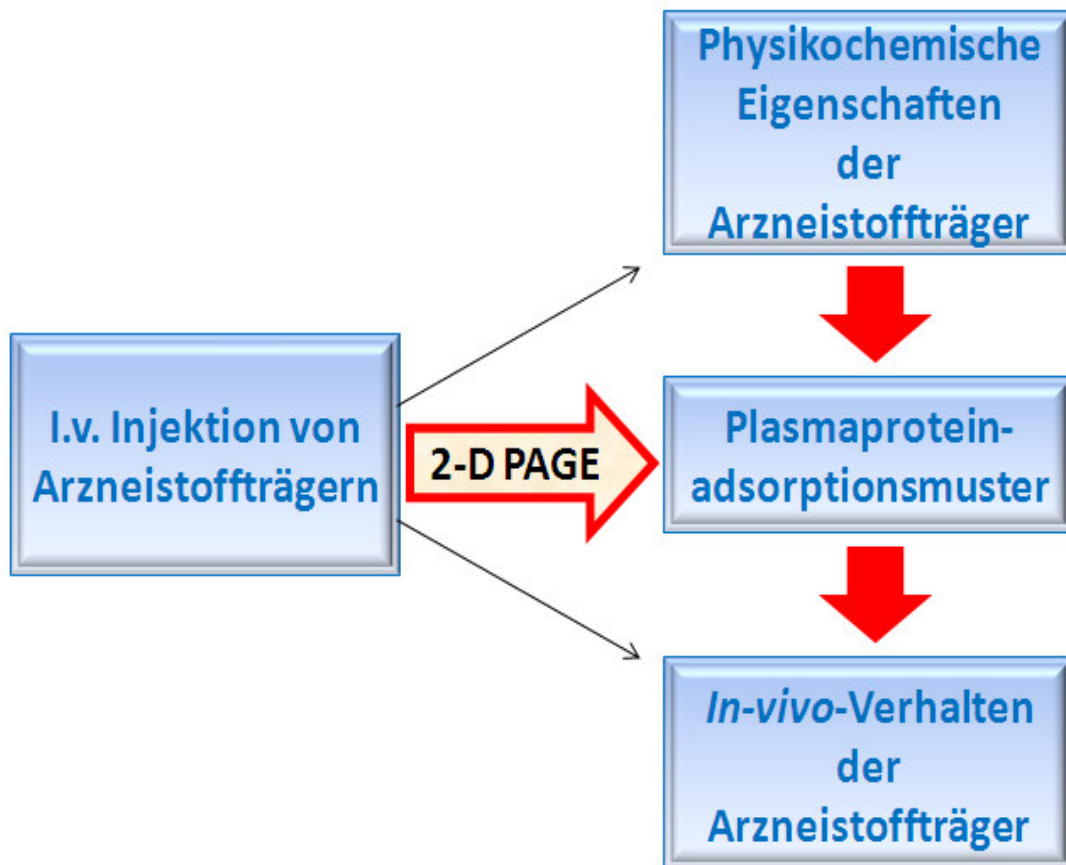


Abb. 1: Konzept der „Differenzierenden Adsorption“: Auf i. v. injizierten Arzneistoffträgern adsorbieren, abhängig von ihren physikochemischen Oberflächeneigenschaften, bestimmte Plasmaproteine, die ihrerseits das *in-vivo*-Verhalten der Partikel bestimmen. Diese Erkenntnis der Korrelation und der verantwortlichen Proteine können für das Targeting von Nanocarriern genutzt werden.

Bezogen auf die bereits erwähnten „Stealth“-Systeme trifft diese Kausalität sehr genau zu. Untersuchungen haben gezeigt, dass auf PEGylierten Arzneistoffträgern deutlich weniger Blutproteine adsorbieren, was dann wiederum zu längeren Blutzirkulationszeiten führt (Tan et al., 1993; Zhang et al., 2001; Gupta und Curtis, 2004). Körpereigene Proteine, die das Andocken der Makrophagen an die Partikel erleichtern, werden auch als Opsonine

bezeichnet. Insofern sind die Oponine verantwortlich für eine erhöhte Phagozytose der Nanocarrier (Absolom, 1986; Juliano, 1988). Dazu gehören unter anderem Fibrinogen, Immunglobulin G (IgG) und Komplementfaktoren (z. B. C3b) (Camner et al., 2002; Leroux et al., 1994). Fehlen diese Oponine auf der Oberfläche der Arzneistoffträger, wie im Fall von Partikeln, die mit PEG modifiziert wurden, so werden die Nanocarrier nicht so schnell von den Makrophagen erkannt und können dementsprechend länger im Blutkreislauf zirkulieren.

Sehr gut untersucht sind diese Zusammenhänge der „Differenzierenden Adsorption“ im Fall des zielgerichteten Arzneistofftransports in das Gehirn. Generell ist die Anreicherung eines Arzneistoffs im Gehirn sehr gering, was an der Blut-Hirn-Schranke liegt. Diese stellt eine nahezu undurchlässige Barriere im menschlichen Organismus dar, um das Gehirn vor Fremdstoffen, die im Blut zirkulieren, zu schützen (Forth et al., 2001; Pardridge, 2003). Dennoch muss in einem gewissen Maße auch hier ein Stoffaustausch stattfinden, so dass das Gehirn mit allen notwendigen körpereigenen Stoffen versorgt werden kann. Es existieren spezifische Transportsysteme, die diesen Austausch ermöglichen. Von Bedeutung für den zielgerichteten Arzneistofftransport ist der Low Density Lipoprotein- (LDL-) Rezeptor, welcher für den Transport von LDL aus dem Blut in das Interstitium des Gehirns zuständig ist. Das im Blut befindliche Apolipoprotein E (ApoE) ist ebenfalls ein Ligand für diesen Rezeptor. Arzneistoffträger, die ApoE an ihrer Oberfläche adsorbiert haben, können so über den LDL-Rezeptor in das Gehirn gelangen. Entsprechende Ergebnisse wurden sowohl mit vorab kovalent an die Partikeloberfläche gebundenen, als auch mit aus dem Blut adsorbiertes ApoE in Tierversuchen nachgewiesen (Kreuter, 2001; Müller et al., 2001). Im zweiten Fall wurde eine erhöhte Adsorption von ApoE auf Partikeln, die mit dem Tensid Tween 80 benetzt wurden, erzielt. Die Korrelationskette lautet: Tween 80 auf der Oberfläche führt zu einer vermehrten Adsorption von ApoE. Daraus wiederum resultiert eine erhöhte Ansammlung der Partikel im Gehirn (Müller und Schmidt, 2002). Dieser zielgerichtete Transport mit Nanocarriern in das Gehirn konnte für verschiedene Wirkstoffe nachgewiesen werden (Darlagin: Alyautdin et al., 1995; Paclitaxel:

Hekmatara et al., 2009; Doxorubicin: Gulyaev et al., 1999 und Tubocurarin: Kreuter, 2004).

In Fortführung dieser Erkenntnisse ist es daher von größter Bedeutung ist es daher, die auf der Oberfläche der Partikel adsorbierenden Blutproteine zu identifizieren. Dafür hat sich in der Vergangenheit die zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE, 2-DE) als Mittel der Wahl etabliert. Diese Methode wurde 1975 von O'Farrel und Klose unabhängig voneinander entwickelt (O'Farrel, 1975; Klose, 1975). Sie basiert im Wesentlichen auf einer Auftrennung der Proteine nach zwei unterschiedlichen Parametern im elektrischen Feld. In der ersten Dimension erfolgt eine Auftrennung anhand des isoelektrischen Punkts der Proteine, in der sich daran anschließenden zweiten Dimension erfolgt die Trennung aufgrund der Größe der Proteine. Dieses Verfahren wird ständig weiter optimiert und entsprechend den Anforderungen der Proteinanalytik auf nanopartikulären Arzneistoffträgern modifiziert (Blunk et al., 1993; Thode et al., 1997; Harnisch und Müller, 1998; Lück et al., 1998; Göppert und Müller, 2004).

Sind erst einmal sämtliche Zusammenhänge zwischen physikochemischen Eigenschaften der Nanocarrier, den daraus resultierenden Proteinadsorptionsmustern und dem sich daraus ergebenden *in-vivo*-Verhalten bekannt, lassen sich über die Modifikation der physikochemischen Eigenschaften der Nanocarrier gezielt bestimmte Blutproteine adsorbieren, die wiederum eine gesteuerte Anreicherung der Partikel in dem gewünschten Organ oder Gewebe zur Folge haben. Um präzise Vorhersagen treffen zu können, ist es daher notwendig, möglichst viele Daten über i. v. injizierte Partikel, deren Proteinadsorptionsmuster und der daraus resultierenden Verteilung im Organismus zu sammeln. Durch die Bestimmung von Proteinadsorptionsmustern lassen sich dann schneller Arzneistoffträger entwickeln, die an den gewünschten Ort des Geschehens transportiert werden können. Die Anzahl an *in-vivo*-Tierversuchen lässt sich mithin deutlich reduzieren. Ursächlich dafür ist, dass Formulierungen frühzeitig ausgeschlossen oder modifiziert werden können, und zwar solche, die kein

entsprechendes Proteinadsorptionsmuster, das auf ein gewünschtes Targetingpotenzial schließen lässt, aufweisen.

Nicht zuletzt aufgrund der sehr aufwändigen Technik zur Bestimmung der adsorbierten Proteine und der recht hohen Kosten sind allerdings nur wenige Forschergruppen weltweit in diesem Bereich der „Grundlagenforschung“ tätig (Leroux et al., 1994; Allemann et al., 1997; Liu et al., 2006; Dobrovolskaia und McNeil, 2007; Kim et al., 2007; Dobrovolskaia et al., 2008). Dies hat zur Folge, dass auch 20 Jahre nach der Veröffentlichung des Konzepts der „Differenzierenden Adsorption“ noch lange nicht alle Zusammenhänge aufgeschlüsselt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen weitere Erkenntnisse gewonnen werden, um dem Ziel des zielgerichteten Arzneistofftransports ein Stück näher zu kommen. Wie zuvor bereits erwähnt, wird den Blutproteinen und deren Adsorption auf der Partikeloberfläche dabei eine Schlüsselrolle zugewiesen. Folglich liegt auch das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Proteinanalytik. Basierend auf der bereits für die Proteinanalytik auf Nanocarriern etablierten 2-D PAGE, sollen wichtige Zusammenhänge zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Partikel, der resultierenden Proteinadsorption und dem *in-vivo*-Verteilungsmuster erarbeitet werden.

So werden unter anderem oberflächenmodifizierte Nevirapin-Nanosuspensionen hinsichtlich ihres Potenzials in die Zellen des MPS vorzudringen, untersucht. Dieses ist ein potenzielles Reservoir des HI-Virus und deshalb von großer Bedeutung für das Drug Targeting. Darüber hinaus gilt es, mit Didanosin beladene nanostrukturierte Lipidcarrier auf ihre Proteinadsorption hin zu analysieren. Da das Gehirn der gewünschte Zielort der Nanocarrier ist, werden primär Tenside, die bereits in früheren Studien zu einem erfolgreichen Transport über die Blut-Hirn-Schranke geführt haben, eingesetzt. Weiterhin solle ein neues, bioabbaubares Arzneistoffträgersystem, bestehend aus Polyethylencarbonat, hinsichtlich des Potenzials, unentdeckt im Blutkreislauf zirkulieren zu können, analysiert werden. Außerdem ist es Ziel, die Adsorptionskinetik auf Eisenoxid-Nanopartikeln zu untersuchen. Dabei wird die

Existenz des „Vroman-Effekts“ auf diesem Partikelsystem analysiert und daneben das Proteinadsorptionsverhalten über einen längeren Zeitraum (5-240 min) bewertet. Abschließend wird der Einfluss der Partikelform auf das resultierende Proteinadsorptionsmuster erforscht und mit den Ergebnissen aus *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien, die von den Kooperationspartnern durchgeführt wurden, verglichen.

2. DISKUSSION

In der folgenden Diskussion wird zunächst in Abschnitt 2.1 die dieser Arbeit hauptsächlich zugrundeliegende Analysemethode 2-D PAGE kritisch betrachtet. Das Hauptaugenmerk gilt dabei der Probenaufbereitung, da dieses der problematischste Schritt der gesamten Methode ist. Im Anschluss daran wird das Potenzial unterschiedlicher i. v. applizierbarer Nanocarrier, bestimmte Zielorte im Organismus zu erreichen, anhand der erhaltenen Ergebnisse diskutiert. Die gewählte Reihenfolge entspricht dabei chronologisch den durchgeführten Arbeiten.

Im Abschnitt 2.2 steht das Drug Targeting in die Zellen des MPS im Vordergrund. Verschiedene, zum Teil oberflächenmodifizierte Nevirapin-Nanosuspensionen werden hinsichtlich ihres Potenzials, in dieses mögliche Reservoir des HI-Virus zu gelangen, untersucht. Aus dieser Arbeit ist die folgende Veröffentlichung entstanden: *Shegokar, R., Jansch, M., Singh, K. K., Müller, R. H., 2010. In vitro protein adsorption studies on nevirapine nanosuspensions for HIV/AIDS chemotherapy. Nanomedicine 7(3), 333-340, doi:10.1016/j.nano.2010.10.012* (siehe Kapitel 3.1).

Im Abschnitt 2.3 ist der zielgerichtete Arzneistofftransport in das Gehirn Gegenstand der Betrachtung. Im Detail werden nanostrukturierte Lipidcarrier, die mit Didanosin beladen wurden, und deren resultierende Proteinadsorption diskutiert. Daraus resultiert die folgende Veröffentlichung: *Wa Kasongo, K., Jansch, M., Müller, R. H., Walker, R. B., 2010. Evaluation of the in vitro differential protein adsorption patterns of didanosine-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for potential targeting to the brain. J. Liposome Res. 21(3), 245-254, doi:10.3109/08982104.2010.539186* (siehe Kapitel 3.2).

Anschließend geht es im Abschnitt 2.4 um das Potenzial eines neuen Typs Nanocarrier mit dem Ziel, der frühzeitigen Erkennung und Elimination durch die Makrophagen zu entkommen. Dieses neue Drug Delivery System besteht aus bioabbaubarem Polyethylencarbonat. Diese Ergebnisse haben zu der folgenden Veröffentlichung geführt: *Bege, N., Renette, T., Jansch, M., Reul, R.,*

Merkel, O., Petersen, H., Curdy, C., Müller, R. H., Kissel, T., 2011. *Biodegradable poly(ethylene carbonate) nanoparticles as a promising drug delivery system with "stealth" potential. Macromol. Biosci. 11(7), 897-904, doi: 10.1002/mabi.201000496* (siehe Kapitel 3.3).

Im dann folgenden Abschnitt 2.5 wird die Adsorptionskinetik auf ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln untersucht und deren Auswirkung auf eine zielgerichtete Applikation diskutiert. Dabei geht es um die Existenz des „Vroman-Effekts“ auf diesem Partikelsystem und die Veränderung der Proteinkorona über eine Zeitspanne von bis zu vier Stunden. Die Ergebnisse wurden bereits in einem wissenschaftlichen Fachjournal publiziert: Jansch, M., Stumpf, P., Graf, C. M., Rühl, E., Müller, R. H., 2012. *Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles. Int. J. Pharm. 428(1-2), 125-133, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.060* (siehe Kapitel 3.4).

Im letzten Abschnitt 2.6 wird der Einfluss der Partikelform auf das resultierende Proteinmuster untersucht. Dabei steht vor allem das Potenzial des zielgerichteten Transports in die Milz im Vordergrund. Die Ergebnisse wurden bereits in Form eines wissenschaftlichen Beitrages verfasst und vom Journal akzeptiert: Jansch, M., Jindal, A. B., Majee Sharmila, B., Samad, A., Devarajan, P. V., Müller, R. H., 2012. *Influence of particle shape on plasma protein adsorption and macrophage uptake. Die Pharmazie* (siehe Kapitel 3.5).

2.1 Methodik

Die vorliegende kumulative Dissertation befasst sich eingehend mit der Proteinadsorption auf nanopartikulären Arzneistoffträgern, welche eine Schlüsselrolle im zielgerichteten Arzneistofftransport einnimmt. Zur Bestimmung der adsorbierten Proteine gibt es zahlreiche Techniken, die in der Wissenschaft verwendet werden. Dazu gehören die Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) (Jorgensen et al., 2009), die Shotgun Proteomics Methode, welche eine Kombination aus Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS) darstellt (Capriotti et al., 2011) oder auch eine Kombination aus Rasterkraftmikroskop (AFM) und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) (Servoli et al., 2008). Auch die Natriumlaurylsulfat Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Kang et al., 2007) wird zur Bestimmung der Proteinadsorptionsmuster verwendet.

Als Analysenmethode für die Identifikation der adsorbierten Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit die zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) ausgewählt, da sich mit dieser Technik komplexe Proteingemische hochauflösend auftrennen lassen. Hervorzuheben ist, dass bei dieser Methode in einem Probenlauf bis zu 10.000 Proteine gleichzeitig bestimmt werden können (Hochstrasser et al., 1990; Tissot et al., 1991). Eine ebenso hohe Auflösung mittels einer Technik lässt sich mit den anderen benannten Methoden nicht realisieren. Neben der Zusammensetzung der Proteinmuster lassen sich mit dieser Methode auch die Anteile der Proteine zueinander bestimmen (Klose und Kobalz, 1995). Darüber hinaus ist diese Technik in früheren Studien bereits erfolgreich eingesetzt und den speziellen Anforderungen an die Analyse von adsorbierten Proteinen auf Arzneistoffträgern angepasst worden (Blunk et al., 1993; Thode et al., 1997; Harnisch und Müller, 1998; Lück et al., 1998; Göppert und Müller, 2004).

Dennoch gibt es auch bei der 2-D PAGE einige kritische Punkte, die vor allem hinsichtlich der Probenaufbereitung berücksichtigt werden müssen. Zuerst stellt sich die Frage nach dem geeigneten Inkubationsmedium. Idealerweise wird Blut

verwendet, da dieses den *in-vivo*-Bedingungen gleichkommt. Es ergibt sich jedoch die Problematik der späteren Separation von Partikeln mit den adsorbierten Proteinen und dem überschüssigen Blut, welche durch die im Blut befindlichen Blutzellen sehr erschwert wird. Aus diesem Grund wird meist auf Blut als Inkubationsmedium verzichtet und entweder das von zellulären Bestandteilen befreite Plasma oder Serum, bei dem zusätzlich die Gerinnungsfaktoren (z. B. Fibrinogen) entfernt wurden, verwendet. Da bei der Adsorption von Proteinen aus dem Blut an der Oberfläche der Nanocarrier die Proteine untereinander Einfluss auf das resultierende Adsorptionsmuster haben, empfiehlt sich Plasma als optimales Inkubationsmedium. Hier sind gegenüber dem Serum alle Proteine aus dem Blut enthalten. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass das Plasma mit zusätzlichen Stoffen versehen wird, um eine frühzeitige Koagulation zu vermeiden. Diese zugesetzten Antikoagulantien können ihrerseits mit den Proteinen aus dem Blut interagieren. Um diese Effekte möglichst gering zu halten, wurde in der vorliegenden Arbeit auf Plasma, welches mit Makromolekülen stabilisiert wurde, verzichtet und stattdessen ausschließlich citratstabilisiertes Plasma verwendet.

Zu beachten sind weiterhin Unterschiede in der Zusammensetzung des Blutes bei verschiedenen Spezies. Für eine genaue Korrelation der *in-vivo*-Verteilungsmuster und der Proteinadsorptionsmuster ist ein identisches Medium optimal. Da die untersuchten Arzneistoffträger für die Anwendung am Menschen konzipiert sind, wurde auch in sämtlichen vorliegenden Studien Humanplasma als Inkubationsmedium ausgewählt.

Die Inkubationszeit ist überdies von großer Bedeutung, deshalb wurde standardmäßig in den vorliegenden Studien eine Inkubationszeit von 5 min festgelegt. Diese Zeitspanne orientiert sich an den *in-vivo*-Bedingungen, da typischerweise innerhalb von 5 min 90 % der i. v. injizierten Partikel durch die Zellen des MPS aufgenommen worden sind (O'Mullane et al., 1987; Müller, 1991; Liliemark et al., 1995). Im Fall von Studien zur Adsorptionskinetik wurden auch andere Inkubationszeiten gewählt, auf die dann an entsprechender Stelle näher eingegangen wird. Aus solchen Adsorptionskinetikstudien geht hervor,

dass die Inkubationszeit einen großen Einfluss auf das resultierende Proteinadsorptionsmuster haben kann (Blunk et al., 1996; Göppert und Müller, 2005a).

Weiterhin kritisch zu sehen ist das Verhältnis von Probe zu Inkubationsmedium. Optimal ist ein Verhältnis analog den *in-vivo*-Versuchen, falls diese bereits vorliegen. Alternativ bietet es sich an, die Probenkonzentration analog zu früheren Proteinadsorptionsstudien zu wählen, so dass Vergleiche zu diesen Ergebnissen gemacht werden können. Dabei hat sich ein Verhältnis Probe zu Inkubationsmedium von 1:3 als Standard etabliert (Harnisch und Müller, 1998, 2000; Göppert und Müller, 2003, 2004, 2005a, 2005b; Schmidt und Müller, 2003; Petri et al., 2007). Jedoch sollte dabei beachtet werden, dass Partikelkonzentration bzw. zugehörige Partikeloberfläche annähernd konstant sind. In den benannten Studien lag die Partikelkonzentration zwischen 10-20 % (w/v). Eine deutliche Abweichung von diesen Partikelkonzentrationen würde bei einem konstanten Verhältnis von 1:3 (Probe zu Inkubationsmedium) zu einer mengenmäßig stark veränderten Oberfläche führen. Dies wiederum beeinflusst die Konkurrenzsituation der Proteine untereinander und somit auch das resultierende Proteinadsorptionsmuster.

Nach erfolgter Inkubation ist es erforderlich, das nicht gebundene Inkubationsmedium von der Probe mit den adsorbierten Proteinen zu trennen. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probe verschiedene Möglichkeiten. In früheren Arbeiten erfolgte die Trennung routinemäßig mittels Zentrifugation (Blunk, 1994; Gessner et al., 2000; Göppert und Müller, 2003; Harnisch und Müller, 1998). Voraussetzung für eine Separation durch Zentrifugation ist ein bestimmter Dichteunterschied zwischen Probe und Inkubationsmedium. Es muss sich eine klar sichtbare Grenze nach dem Zentrifugieren herausgebildet haben, um keine Verfälschung im resultierenden Proteinmuster zu erhalten. Als alternative Separationsmethode wurde die Gelfiltration etabliert (Blunk, 1994; Diederichs, 1996; Göppert, 2005; Göppert und Müller, 2004). Dabei handelt es sich um eine chromatographische Trennmethode, bei der die Separation anhand der

Molekülgröße erfolgt (Größenausschlusschromatographie). Als weitere Methode bietet sich bei magnetischen Partikeln, wie zum Beispiel Eisenoxid-Nanopartikeln, die Trennung in einem elektrischen Feld an (Thode, 1996; Thode et al., 1997). Dazu wird eine Trennsäule in einem Magneten platziert, so dass zunächst nur das ungebundene Inkubationsmedium eluiert wird. Im nächsten Schritt wird die Säule aus dem Magneten entfernt, und es werden die Partikel mit den adsorbierten Proteinen von der Säule eluiert. Bei allen benannten Trennmethoden muss berücksichtigt werden, dass die gewählte Inkubationszeit strenggenommen nicht der tatsächlichen Inkubationszeit entspricht. Unabhängig davon, ob die Separation durch Zentrifugation, Gelfiltration oder mit Hilfe einer Magnetsäule verläuft, ist sie niemals sofort abgeschlossen. Das bedeutet, dass die Inkubation während der Trennung noch eine gewisse Zeit weiterläuft. Bei der Zentrifugation dauert dies etwas länger, da in der Regel für jeweils eine Stunde zentrifugiert wird. Bei der Gelfiltration bzw. Magnetsäule vergehen bis zur Eluation der entsprechenden Fraktionen ebenfalls einige Minuten. Aus diesem Grund sind Ergebnisse, die auf unterschiedlichen Separationstechniken beruhen, nur bedingt miteinander vergleichbar.

Darüber hinaus hat bei der Zentrifugation die Aufreinigung einen Einfluss auf das resultierende Proteinmuster. Dieser Vorgang wird auch als „Waschschritt“ bezeichnet und soll dafür sorgen, dass keine ungebundenen Proteine das Ergebnis verfälschen. Andererseits kann es durch zu häufiges Waschen auch zum Ablösen von vorher adsorbierten Proteinen kommen, was ebenfalls zu einem unkorrekten Proteinadsorptionsmuster führen würde. Von Bedeutung ist gleichwohl das verwendete Waschmedium. Frühere Versuche im Arbeitskreis Müller haben drei Waschvorgänge mit einem pH 7.4 Phosphatpuffer als optimale Versuchsbedingung bestimmt (Harnisch und Müller, 1998).

Ein weiterer, kritisch zu betrachtender Aspekt der 2-D PAGE ist die Probenanzahl. Für statistisch korrekte Auswertungen ist die in dieser Arbeit verwendete Probenanzahl von anfangs zwei, später drei Proben im Grunde zu gering. Der Grund für diese verhältnismäßig niedrige Anzahl an Proben sind die

damit verbundenen Kosten und der enorme Zeitaufwand. Ein Durchgang mit sechs Proben dauert von der Probenvorbereitung bis zur abschließenden Färbung der Gele knapp eine Woche. Die Kosten pro Lauf liegen allein für die sechs Gele bei ca. 300 €. Aus diesem Grund wird auf frühere Arbeiten im Arbeitskreis Müller verwiesen, in denen die Reproduzierbarkeit statistisch korrekt nachgewiesen wurde (Blunk, 1994).

2.2 Drug Targeting Potenzial von Nevirapin-Nanosuspensionen in die Zellen des MPS

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, nehmen die Zellen des MPS bei der Elimination von Fremdstoffen eine bedeutende Rolle ein. Bei der Behandlung vieler Erkrankungen stellt dies ein großes Problem dar, weil der Arzneistoff auf diese Weise sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt wird und somit nicht mehr in die gewünschte Zielregion vordringen kann. Es gibt aber auch Erkrankungen, bei denen genau dies von Vorteil sein kann und darüber hinaus sogar erwünscht ist. Und zwar dann, wenn eine Erkrankung vorliegt, bei der Zellen des MPS einen Hort für das Virus oder die Bakterien darstellen. Dies gilt unter anderem für das HI-Virus.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier unterschiedliche Nevirapin-Nanosuspensionen hinsichtlich ihres Potenzials, in die MPS-Zellen vorzudringen, untersucht. Dabei wurden drei dieser Nanosuspensionen zusätzlich an der Oberfläche modifiziert. Der Arzneistoff Nevirapin ist ein nichtnukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI), der bei HIV-Infektionen eingesetzt wird. Unter dem Handelsnamen Viramune befindet er sich in Form von Tabletten oder als Suspension zur oralen Einnahme auf dem Markt. Das Wirkprinzip beruht auf einer nicht kompetitiven Bindung an die Reverse Transkriptase des Virus. Damit der Wirkstoff an den gewünschten Ort des Geschehens, in diesem Fall in die Zellen des MPS, gelangen kann, ist die Adsorption von Opsoninen auf der Oberfläche der Nanocarrier förderlich. Dies sind Blutproteine, die auf der Oberfläche von körperfremden Stoffen als eine Art Anker fungieren, durch welchen Makrophagen diese erkennen und die Phagozytose beginnen können.

Bezogen auf die erhaltenen Ergebnisse aus der Proteinadsorptionstudie, ist vor allem die starke Adsorption der Immunglobuline interessant, da diese als Opsonine gelten. Somit bewirken sie eine erhöhte Aufnahme der Partikel durch Makrophagen. Zu einem ähnlichen Ergebnis führten auch *in-vivo*-Tierversuche, die mit den gleichen Nevirapin-Nanosuspensionen durchgeführt wurden

(Shegokar, 2010; Shegokar und Singh, 2011). Eine Akkumulation der Partikel in Leber und Milz konnte mit ^{99m}TC markierten Nanosuspensionen für alle vier Formulierungen gezeigt werden. Die unterschiedlichen prozentualen Anteile der adsorbierten Proteine auf der Oberfläche der Partikel können dabei ursächlich für die quantitativen Unterschiede in der Organverteilung sein. So haben zum Beispiel Albumin und Apolipoproteine als Dysopsonine eine protektive Funktion gegenüber der Makrophagenerkennung. Dadurch können die Partikel länger unerkant in der Blutbahn zirkulieren und auch in andere Gewebe gelangen.

Betrachtet man die erhaltenen Pherogramme der drei oberflächenmodifizierten Nanosuspensionen, so ergeben sich nur geringfügige Unterschiede zur ursprünglichen Formulierung. Dies könnte daran liegen, dass die gewählte Tensidzusammensetzung (Tween 80, Pladone, Poloxamer, Polyvinylpyrrolidon) zu sehr stabilen Partikeln führt und bei der anschließenden Oberflächenmodifizierung nur ein sehr geringer Austausch der Tenside durch die oberflächenmodifizierenden Stoffe stattfindet. Somit wäre das äußerliche Erscheinungsbild der Partikel nahezu unverändert und eine ähnliche Proteinadsorption die logische Konsequenz. Diese Art der Oberflächenmodifizierung hat jedoch auch Vorteile, zum Beispiel in Bezug auf die Partikelgröße. In der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von einer Formulierung eine nachträgliche Modifizierung der übrigen Nanosuspensionen durchgeführt. Das bedeutet, dass nach der Herstellung einer Rohsuspension diese mit dem jeweiligen Oberflächenmodifizierer behandelt wurde. Dabei kommt es zum Austausch einzelner Stabilisatormoleküle durch die Oberflächenmodifizierer, wodurch eine neue, veränderte Partikeloberfläche entsteht. Gibt man den Modifikator schon während der Produktion der Nanosuspension hinzu, so kann dies die Stabilität negativ beeinflussen und so zu einer stark veränderten Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und Partikelform führen. Eine veränderte Partikelgröße oder -form bedeutet wiederum veränderte physikochemischen Eigenschaften der Partikel, und da diese in ihrer Gesamtheit für das resultierende Proteinadsorptionsmuster verantwortlich sind, ist ein verändertes Proteinadsorptionsmuster die Folge. Dabei ließen sich dann aber nur wenige beziehungsweise keine konkreten

Rückschlüsse auf den direkten Einfluss des Oberflächenmodifizierers bezogen auf das erhaltene Proteinadsorptionsmuster ziehen.

Betrachtet man die mit PEG modifizierte Nanosuspension, so würde man ein anderes resultierendes Proteinmuster auf der Oberfläche erwarten, da PEG allgemein für einen „Stealth“-Effekt, also eine Abschirmung von Proteinen auf der Partikeloberfläche, bekannt ist. Dieses Phänomen konnte anhand der vorliegenden Pheroграмme nicht ausgemacht werden. Vielmehr lässt die Vielfalt der adsorbierten Proteine und vor allem die Adsorption der Immunglobuline auf ein frühzeitiges Erkennen durch Makrophagen schließen. Damit einhergehend ist eine schnelle Elimination aus dem Blutkreislauf. Das bei der Anwendung von PEG Unterschiede im resultierenden Effekt auszumachen sind, wurde auch schon in früheren Studien aufgezeigt (Gref et al., 2000; Mosqueira et al., 2001). Die Kettenlänge und Dichte des PEG auf der Partikeloberfläche haben einen entscheidenden Einfluss auf das „Stealth“-Potenzial. Sind diese Parameter nicht optimal, wird auch keine Abschirmung vor Plasmaproteinen erzielt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Proteinadsorptionsmuster von allen vier Formulierungen deutliche Charakteristika für eine Erkennung durch Makrophagen aufweisen und somit für den Einsatz bei HIV-Infektionen wegen des Erreichens von potenziellen Virusreservoirs geeignet sind.

2.3 Drug Targeting Potenzial von Didanosin beladenen NLC's in das Gehirn

Neben der im vorherigen Kapitel behandelten Umgehung der Erkennung durch Makrophagen und der damit verbundenen frühzeitigen Eliminierung aus dem Blutkreislauf ist ein weiteres interessantes Ziel der Arzneistofftransport über die Bluthirnschranke in das Gehirn. Auf die damit verbundenen Schwierigkeiten wurde in der Einleitung bereits eingegangen. Eine wichtige Voraussetzung ist, dass eine Erkennung durch die Zellen des MPS vermieden wird, da die Nanocarrier ansonsten frühzeitig aus der Blutzirkulation entfernt werden und die Bluthirnschranke gar nicht erreichen können. Weiterhin ist die Adsorption gehirnspezifischer Proteine auf der Oberfläche der Nanocarrier von großer Bedeutung. Vor allem die Adsorption von ApoE hat sich als besonders förderlich für einen erfolgreichen Arzneistofftransport in das Gehirn erwiesen (Moghimi et al., 1993; Ogawara et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde das „Gehirntargeting“-Potenzial von fünf verschiedenen nanostrukturierten Lipidcarriern (NLC), die mit dem Wirkstoff Didanosin beladen worden sind, untersucht. Didanosin ist ein nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NRTI), der in der HIV-Therapie zum Einsatz kommt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Nanocarriern wurden, ausgehend von einem identischen Lipidgerüst, unterschiedliche Tenside zur Stabilisierung verwendet. Die Intention bestand darin, Nanocarrier zu entwickeln, die mit Hilfe gehirnspezifischer Proteinadsorption selbständig ihren Weg über die Bluthirnschranke in das Gehirn finden. Dies ist von großer Bedeutung, weil durch die zunehmend effizientere Therapie und die damit verbundene längere Lebenszeit der infizierten Patienten die Anzahl neurologischer Störungen durch die HIV-Infektion deutlich zunimmt (Gray et al., 1988). Ein dementielles Syndrom stellt dabei die häufigste Manifestation dar (Simpson und Tagliati, 1994; Sacktor und McArthur, 1997). Neben dem Immunsystem agiert das Nervensystem als Hauptangriffspunkt des HI-Virus (Navia et al, 1986). Darüber hinaus dienen die Mikrogliazellen im Gehirn als wichtiges Reservoir für das HI-

Virus (Schrager und D'Souza, 1998). Diese sind eine spezielle Form von Gliazellen, die dem MPS angehören.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen einige interessante Aspekte auf, und zumindest für drei der fünf Didanosin-Formulierungen kann, basierend auf einer ApoE Adsorption auf der Oberfläche der Nanocarrier, ein Potenzial in das Gehirn vorzudringen, festgestellt werden. Dabei wurde ApoE auf den beiden Formulierungen mit drei Tensiden (Tween 80, Lutrol F68 und Solutol HS 15) und auf den ausschließlich mit Solutol HS 15 modifizierten Nanocarriern nachgewiesen. Anders, als anhand früherer Studien zu erwarten gewesen wäre (Kreuter, 2001; Müller et al., 2001), wurde auf der Oberfläche der allein mit Tween 80 modifizierten Nanocarrier kein ApoE identifiziert. Das gleiche gilt auch für die mit Lutrol F68 (Poloxamer 188) modifizierten Arzneistoffträger. Als Ursache hierfür kann vermutet werden, dass die insgesamt zur Verfügung stehende Partikeloberfläche aufgrund der deutlich größeren Partikelgröße bei diesen Formulierungen zu gering war. Vor allem die Messungen mittels Laserdiffraktometrie zeigen auf, dass es sich hierbei teilweise um Mikropartikel handelt, wohingegen die anderen Formulierungen im unteren Nanometerbereich angesiedelt sind. Bedenkt man weiterhin, dass die Plasmakonzentration von ApoE beim Menschen nur sehr gering ist (0,005 %) (Scanu, 1987), so stärkt das diese These zusätzlich. Bezogen auf Lutrol F68 ist das Ausbleiben einer ApoE Adsorption kein Einzelfall. In einer früheren Studie wurde ebenfalls schon einmal beschrieben, dass es auf Poloxamer 188 stabilisierten Partikeln zu keinerlei Adsorption von ApoE gekommen ist (Göppert und Müller, 2003).

Betrachtet man die ApoE Adsorption auf den übrigen Formulierungen, so erscheint die Menge quantitativ sehr gering. Auch hier sollte die geringe Plasmakonzentration an ApoE berücksichtigt werden. Weiterhin könnte sich die Adsorption der Apolipoproteine A-I und A-IV positiv auf den gehirnspezifischen Effekt von ApoE auswirken. ApoE bindet nämlich nicht nur an Rezeptoren an der Bluthirnschranke, es befinden sich auch Rezeptoren in der Leber, für die ApoE einen Liganden darstellt (Gessner et al., 2001). Für die Rezeptoren in der

Leber sind ApoA-I und ApoA-IV ebenfalls passende Liganden, nicht aber an der Bluthirnschranke. Somit treten sie mit ApoE um die freien Bindungsstellen an den Rezeptoren in der Leber in Konkurrenz, wodurch mehr ApoE für die Bindung an den Rezeptoren am Gehirn verfügbar ist. Ob sich aus der beobachteten Adsorption von ApoE auf der mit Solutol HS 15 modifizierten Partikeloberfläche eine generelle Korrelationskette ableiten lässt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Für eine abschließende Beurteilung sind diesbezüglich weitere Studien notwendig.

2.4 Bioabbaubare Polyethylencarbonat-Nanopartikel als vielversprechendes Arzneistoffträgersystem mit potentiellen „Stealth“-Eigenschaften

Wie bereits an vorheriger Stelle in dieser Arbeit erläutert wurde, stellen die Zellen des MPS ein sehr großes Problem bei der Entwicklung von zielgerichteten Arzneistoffträgern dar. Aus diesem Grund steht die Entwicklung von Nanocarriern, welche einer Erkennung durch die Makrophagen entgehen und länger im Blutkreislauf zirkulieren können, seit Jahren im Fokus der pharmazeutischen Forschung. Solche Arzneistoffträger werden, abgeleitet vom englischen Wort „stealth“ (= Heimlichkeit), auch als Stealth-Partikel, also für das Immunsystem unsichtbare Partikel bezeichnet. In der Literatur sehr häufig beschrieben wird die Oberflächenmodifikation mit Polyethylenglykol (PEG), einem hydrophilen, nichtionischem Polymer. Dies verhindert die Proteinadsorption auf den modifizierten Partikeln (Jeon et al., 1991). Als Folge dessen wird die Aufnahme durch die Zellen des MPS vermindert, was wiederum in einer verlängerten Blutzirkulationszeit resultiert (Niidome et al., 2006; Paciotti et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges Nanocarriersystem hinsichtlich des Potenzials, der frühzeitigen Erkennung und Eliminierung durch die Makrophagen zu entkommen, untersucht. Es handelt sich dabei um Nanopartikel aus Polyethylencarbonat (PEC). Die physikochemischen Eigenschaften dieser Partikel entscheiden über die resultierende Proteinadsorption nach intravenöser Applikation und damit auch über das *in-vivo*-Verhalten, wie zum Beispiel die Zirkulationszeit im Blutkreislauf. Die geschaffenen Voraussetzungen, eine Partikelgröße von etwas über 200 nm und eine nahezu ungeladene Partikeloberfläche, sind dafür insgesamt sehr vielversprechend. So wurde für Nanopartikel dieser Größenordnung eine geringe Erkennung durch Makrophagen beschrieben (Owens und Peppas, 2006), sowie für ungeladene Partikeloberflächen eine deutlich reduzierte

Adsorption von Oponinen (Aggarwal et al., 2009) und eine verminderte Komplementaktivierung festgestellt (Vonarbourg et al., 2006).

Die Ergebnisse der Proteinadsorptionsstudie belegen das Potential eines „Stealth“-Trägersystems für diese Nanopartikel. So konnte im Vergleich zu Polystyren-Partikeln ähnlicher Partikelgröße eine deutliche reduzierte Proteinadsorption festgestellt werden. Darüber hinaus wurden keinerlei Oponine auf der Oberfläche der PEC-Nanopartikel identifiziert. *In-vitro*-Zelleexperimente mit Maus-Makrophagen haben das Potenzial dieses neuen Nanocarriers, lange unerkannt im Blut zirkulieren zu können, bestätigt. Die PEC-Nanopartikel wurden dabei nicht von den Makrophagen via Phagozytose aufgenommen. Dies ist somit ein Indiz dafür, dass sich auf der hydrophilen Partikeloberfläche keine Oponine anlagern konnten, wie dies auch anhand der 2-D PAGE Ergebnisse ersichtlich wurde.

Der Vorteil dieses neuartigen Trägersystems liegt darin, dass aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der PEC-Nanopartikel keine anschließende Modifikation mit einer weiteren Substanz, wie etwa PEG, notwendig ist, um eine Oponin-resistente Partikeloberfläche und damit lang zirkulierende Nanocarrier zu erhalten. Je einfacher ein Arzneistoffträgersystem bei identischen Eigenschaften herzustellen ist, desto besser sind seine Erfolgsaussichten, sich auf dem Markt zu etablieren. Positiv zu beurteilen ist ebenfalls das Nanotoxizitätspotenzial der PEC-Nanopartikel. Sowohl das Polyethylencarbonat selber, als auch seine Abbauprodukte sind biokompatibel, und die Partikelgröße von knapp über 200 nm lässt diesen Rückschluss zu. *In-vivo*-Daten belegen diese Annahme (Dadsetan et al., 2003; Unger et al., 2007).

Mittlerweile wurde dieses neue Nanocarriersystem erfolgreich mit Paclitaxel, einem Wirkstoff gegen Krebs, beladen (Renette et al., 2012). Eine zweifach höhere Blutzirkulationszeit im Vergleich zu Polylactid-co-Glycolid (PLGA) Partikeln in pharmakokinetischen Studien bei Mäusen konnte dabei beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich im Tumormodell eine Akkumulation der PEC-Nanopartikel im Krebsgewebe und eine erhöhte Anti-Tumor-Effizienz gegenüber dem Standardpräparat Taxol. Der anhand der

Proteinadsorptionsstudie beschriebene „Stealth“-Effekt konnte in den *in-vivo*-Tierversuchen ebenfalls bestätigt werden.

2.5 Adsorptionskinetik von Plasmaproteinen auf ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln

Die Proteinadsorption auf nanopartikulären Arzneistoffträgern sowie auf Partikeln im Allgemeinen ist kein irreversibler Vorgang. Vielmehr kann es zu einem Austausch von Proteinen an der Partikeloberfläche kommen (Brash, 1987; Wojciechowski und Brash, 1991; Brash und Ten Hove, 1993; Brash, 2000). Man spricht dann von Adsorptions- und Desorptionsvorgängen auf der Partikeloberfläche. Bezogen auf einen zeitlich sehr frühen Zeitpunkt dieser Vorgänge (Subsekundenbereich), gibt es den sogenannten „Vroman-Effekt“, ein auf den Entdecker Leo Vroman zurückgehendes Phänomen, welches zunächst eine Adsorption von mengenmäßig stark vertretenen Blutproteinen beschreibt, die im Folgenden durch Blutproteine mit einer höheren Affinität zu der Partikeloberfläche ausgetauscht werden (Vroman, 1962; Vroman et al., 1980; Vroman und Adams, 1986; Vroman, 1988). Vroman erkannte eine Abfolge von Proteinen, die sich innerhalb eines Bruchteils einer Sekunde an der Partikeloberfläche gegenseitig ersetzen. Als Erstes adsorbiert das im Blut am häufigsten vorkommende Protein, Albumin (3500-5000 mg/dl). Dieses wird dann durch Fibrinogen (200-450 mg/dl) ersetzt, welches wenig später durch Apolipoproteine (z. B. ApoJ 3,5-10,5 mg/dl) ebenfalls von der Partikeloberfläche verdrängt wird. Diese Ereignisse wurden später auch auf anderen Partikelsystemen erforscht. Es konnte sowohl für Polymerpartikel (Blunk et al., 1996), als auch auf SLN (solid lipid nanoparticles) (Göppert und Müller, 2005a) die Existenz des „Vroman-Effekts“ bestätigt werden. Anders verhält es sich mit der Proteinadsorption auf O/W-Emulsionen verhalten. Bei diesem System konnte kein Austausch von Proteinen auf der Partikeloberfläche, und somit kein „Vroman-Effekt“ nachgewiesen werden (Harnisch und Müller, 2000). Die unterschiedliche Natur der Systeme, besonders die nicht feste Oberfläche der O/W-Emulsionen und die sich daraus ergebenden unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten der Proteine werden ursächlich angeführt.

Bis dato gab es noch keine wissenschaftlichen Daten bezüglich der Adsorptionskinetik auf ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxid-

Nanopartikeln (USPIO). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung eingehend untersucht und kommt zu dem Ergebnis, dass auf USPIO-Nanopartikeln kein Austausch von mengenmäßig stark vorkommenden Proteinen durch Proteine mit einer höheren Affinität zur Partikeloberfläche festgestellt werden konnte und somit der „Vroman-Effekt“ bei dieser Art von Partikeln nicht auftritt. Albumin, das im Blut am häufigsten vorkommende Protein, wurde nur in sehr geringen Mengen identifiziert. Diese beachtliche Tatsache wurde auch schon in früheren Proteinadsorptionsstudien auf Eisenoxid-Partikeln entdeckt (Thode et al., 1997). Die physikochemischen Eigenschaften der Eisenoxid-Partikel verhindern demnach generell eine Adsorption von Albumin. Gegen die Theorie des „Vroman-Effekts“ in diesem Fall spricht auch die bereits sehr frühe Adsorption von Apolipoproteinen. Diese befinden sich im frühen Stadium noch weitaus zahlreicher auf der Partikeloberfläche als Fibrinogen, welches erst mit zunehmender Inkubationszeit vermehrt nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls von Beginn an sehr stark adsorbiert haben die Immunoglobuline. Eine Begründung für das Ausbleiben des „Vroman-Effekts“ kann die extrem große Partikeloberfläche der USPIO-Nanopartikel sein. Bedingt durch die geringe Partikelgröße von ca. 10 nm ergibt sich im Vergleich zu den in früheren Kinetik-Studien verwendeten Polymerpartikeln bzw. SLN eine deutlich größere Partikeloberfläche, die den Proteinen zur Adsorption zur Verfügung steht. Die verwendeten Polymerpartikel waren ca. 1 µm groß bei gleicher Partikelkonzentration, und die SLN besaßen eine Partikelgröße von ca. 200 nm bei doppelter Partikelkonzentration. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auf den USPIO-Nanopartikeln im Subsekundenbereich qualitativ stabile Proteinadsorptionsmuster erhalten wurden und kein „Vroman-Effekt“ auf diesem Partikelsystem festgestellt werden konnte.

Generell ist die Kenntnis über die Verweildauer der Proteine auf der Partikeloberfläche für die Realisierung eines zielgerichteten Arzneistofftransports von immenser Bedeutung. In der Einleitung wurde bereits ausführlich über die Funktion der adsorbierenden Blutproteine berichtet, die den Schlüssel für die weitere *in-vivo*-Verteilung im Organismus darstellen.

Adsorbieren beispielsweise vornehmlich Opsonine auf der Oberfläche, so führt dies zu einer schnellen Erkennung und Phagozytose durch Makrophagen. Im Gegensatz dazu bewirken Dysopsonine auf der Partikeloberfläche eine Verlängerung der Verweilzeit im Blutkreislauf. Wieder andere Proteine können für einen zielgerichteten Transport in spezielle Körperregionen sorgen (ApoE – Gehirn).

Im weiteren Verlauf dieser Kinetik-Studie wurde auch das Proteinadsorptionsverhalten über einen längeren Zeitraum von bis zu 4 Stunden beobachtet. Interessanterweise konnten dabei keine qualitativen Veränderungen im Proteinadsorptionsmuster identifiziert werden. Auch die quantitativen Verhältnisse der adsorbierten Proteine blieben vom Minuten- bis in den Stundenbereich nahezu unverändert. Diese Erkenntnisse sind sehr wichtig, wenn man die Eisenoxid-Nanopartikel in bestimmte Zielregionen des menschlichen Körpers befördern möchte. Durch eine gleichbleibende, konstante Proteinkorona lassen sich genauere Vorhersagen bezüglich der späteren *in-vivo*-Organverteilung treffen. Darüber hinaus lassen sich bei stabilen Proteinadsorptionsmustern besser Modifikationen der Partikeloberfläche durchführen, um so andere Körperregionen zu erreichen.

2.6 Einfluss der Partikelform auf die Plasmaproteinadsorption und die Makrophagenaufnahme

Zu den physikochemischen Eigenschaften von Partikeln gehört neben u.a. der Partikelgröße, der Oberflächenladung, der Oberflächenhydrophobie auch die Partikelform. Hinsichtlich des *in-vivo*-Verhaltens von intravenös injizierten Partikeln unterschiedlicher Form gibt es zahlreiche publizierte Studien (Gratton et al., 2008; Decuzzi et al., 2010). Wenig ist allerdings bis zum heutigen Zeitpunkt darüber bekannt, wie sich die Partikelform auf die resultierende Proteinadsorption auswirkt. Dies ist jedoch für den Transport der Partikel an den gewünschten Wirkort von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proteinadsorptionsmuster von Lipid-Polymer-(LIPOMER)-Nanopartikeln unterschiedlicher Partikelform untersucht. Dabei war die Partikelform standardmäßig sphärisch und einmal abweichend unregelmäßig geformt. Neben dem Einfluss der Partikelform auf die resultierende Proteinadsorption bestand das Interesse darin, eine Erklärung für die vermehrte Anreicherung der unregelmäßig geformten Nanopartikel in der Milz zu finden, wie dies in vorherigen *in-vivo*-Versuchen aufgezeigt wurde (Devarajan et al., 2010).

Anhand der erhaltenen Proteinadsorptionsmuster lässt sich kein direkter Einfluss der Partikelform auf die Proteinadsorption belegen. Es konnten qualitativ keine Unterschiede zwischen den sphärischen und den unregelmäßigen Partikeln bezüglich der adsorbierten Proteine festgestellt werden. Ausgehend von den Proteinadsorptionsmustern muss von einem ähnlichen *in-vivo*-Verhalten der Partikel ausgegangen werden. Dabei ist allerdings anzumerken, dass die Unterschiede in der Partikelform als eher geringfügig einzuschätzen sind, wie man anhand der publizierten Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen erkennen kann. Dennoch wurde speziell diese Art von Partikeln für die Proteinadsorptionsstudien ausgewählt, weil zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits *in-vivo*-Verteilungsdaten vorlagen (Devarajan et al., 2010) und so Rückschlüsse auf die Ursache der

unterschiedlichen Organverteilung erhofft wurden. *In vivo* zeigten die unregelmäßig geformten Nanopartikel eine signifikant erhöhte Anreicherung in der Milz. Im Gegensatz dazu reicherten sich die kugelförmigen Nanopartikel vermehrt in der Leber an. Die erhaltenen Proteinadsorptionmuster konnten für diese Partikelverteilung im Organismus keine eindeutige Erklärung liefern. Zwar ergaben sich quantitative Unterschiede in den adsorbierten Proteinen, ob dies jedoch ursächlich für die unterschiedliche Organanreicherung ist, lässt sich nicht eindeutig belegen. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass im Fall der Ansammlung in der Milz die Partikelform selber den größeren Einfluss auf die Aufnahme hat und nicht die adsorbierten Plasmaproteine. Eine Erklärung, warum die unregelmäßig geformten Nanopartikel nicht so zahlreich durch Lebermakrophagen aufgenommen werden, ergibt sich beim genaueren Blick auf den Vorgang der Phagozytose. Dabei spielt die kontrollierte Anordnung des Aktin-Zytoskeletts um den Partikel eine entscheidende Rolle (May und Machesky, 2001; dos Remedios et al., 2003). Die Partikelform und nicht die Partikelgröße kann bei diesem Prozess zu Beginn der einsetzenden Phagozytose Einfluss darauf nehmen, ob sich das Aktin-Zytoskelett erfolgreich um den Partikel bildet. Gelingt dies, aufgrund einer ungünstigen Partikelform nicht, kann der Partikel auch nicht durch die Makrophage phagozytiert werden (Champion und Mitragotri, 2006). Ausschlaggebend für dieses Phänomen ist der Kontaktwinkel, der sich aufgrund der nicht sphärischen Partikelform ergibt (Champion und Mitragotri, 2009).

Ob es nun an der speziellen Art von Nanopartikeln (LIPOMER) lag, oder ob die Partikelform generell keinen Einfluss auf die resultierende Proteinadsorption hat, kann anhand der vorliegenden Daten nicht hinreichend beurteilt werden. Festgestellt werden konnte auf jeden Fall, dass die Proteinadsorption auf diesem Partikelsystem insgesamt sehr gering ausfällt und zudem keinerlei Opsonine auf der Partikeloberfläche identifiziert werden konnten. Somit ist ein weiteres Indiz dafür gegeben, dass die Partikel nicht direkt von den Leber-Makrophagen aufgenommen werden.

3. PUBLIKATIONEN

3.1 *In vitro* protein adsorption studies on nevirapine nanosuspensions for HIV/AIDS chemotherapy

Der Autor dieser Arbeit hat die Untersuchungen zur Proteinadsorption eigenständig konzipiert und durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung der Nanocarrier erfolgte durch die Co-Autoren. Die Berichtsabfassung über die Proteinadsorption wurde vom Autor dieser Arbeit erstellt.

Quellenangabe:

Shegokar, R., Jansch, M., Singh, K. K., Müller, R. H., 2010. *In vitro* protein adsorption studies on nevirapine nanosuspensions for HIV/AIDS chemotherapy. *Nanomedicine* 7(3), 333-340.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.10.012>

3.2 Evaluation of the *in vitro* differential protein adsorption patterns of didanosine-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for potential targeting to the brain

Der Autor dieser Arbeit hat die Untersuchungen zur Proteinadsorption in Zusammenarbeit mit den Co-Autoren konzipiert und durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung der Nanocarrier erfolgte durch die Co-Autoren. Die Berichtsabfassung über die Proteinadsorption wurde vom Autor dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit den Co-Autoren erstellt.

Quellenangabe:

Wa Kasongo, K., Jansch, M., Müller, R. H., Walker, R. B., 2010. Evaluation of the *in vitro* differential protein adsorption patterns of didanosine-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for potential targeting to the brain. J. Liposome Res. 21(3), 245-254.

<http://dx.doi.org/10.3109/08982104.2010.539186>

3.3 Biodegradable poly(ethylene carbonate) nanoparticles as a promising drug delivery system with “stealth” potential

Der Autor dieser Arbeit hat die Untersuchungen zur Proteinadsorption eigenständig konzipiert und durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung der Nanocarrier sowie die Durchführung der Makrophagen Versuche erfolgte durch die Co-Autoren. Die Berichtsabfassung über die Proteinadsorption wurde vom Autor dieser Arbeit erstellt.

Quellenangabe:

Bege, N., Renette, T., Jansch, M., Reul, R., Merkel, O., Petersen, H., Curdy, C., Müller, R. H., Kissel, T., 2011. Biodegradable poly(ethylene carbonate) nanoparticles as a promising drug delivery system with “stealth” potential. *Macromol. Biosci.* 11(7), 897-904.

<http://dx.doi.org/10.1002/mabi.201000496>

3.4 Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles

Der Autor dieser Arbeit hat die Untersuchungen zur Proteinadsorption eigenständig konzipiert und durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung der ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte durch die Co-Autoren. Die komplette Berichtsabfassung wurde vom Autor dieser Arbeit erstellt.

Quellenangabe:

Jansch, M., Stumpf, P., Graf, C. M., Rühl, E., Müller, R. H., 2012. Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 428(1-2), 125-133.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.060>

3.5 Influence of particle shape on plasma protein adsorption and macrophage uptake

Der Autor dieser Arbeit hat die Untersuchungen zur Proteinadsorption eigenständig konzipiert und durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung der Nanocarrier sowie die *in-vitro*-Studie zur Makrophagenaufnahme erfolgte durch die Co-Autoren. Die Berichtsabfassung über die Proteinadsorption wurde vom Autor dieser Arbeit erstellt.

Quellenangabe:

Jansch, M., Jindal, A. B., Majee Sharmila, B., Samad, A., Devarajan, P. V., Müller, R. H., 2012. Influence of particle shape on plasma protein adsorption and macrophage uptake. Pharmazie 67: (1-7) (akzeptiert).

<http://dx.doi.org/10.1691/ph.2012.2088>

4. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden intravenös applizierbare Nanocarrier im Hinblick auf ihr potentiell *in-vivo*-Verhalten untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Proteinadsorption auf den unterschiedlichen Arzneistoffträgern, da diese als Schlüssel für das Drug Targeting gilt. Zur Bestimmung der Proteinadsorptionsmuster auf den Nanocarriern wurde die zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) verwendet. Übergreifend ging es darum, weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Nanocarrier, den auf der Oberfläche adsorbierenden Plasmaproteinen und dem resultierenden *in-vivo*-Effekt zu gewinnen. Insgesamt wurden dabei in der vorgelegten Arbeit fünf unterschiedliche Themengebiete bearbeitet, die jeweils zu einem veröffentlichten Beitrag in einem Fachjournal geführt haben.

Zunächst wurden oberflächenmodifizierte Nanosuspensionen mit dem Wirkstoff Nevirapin, einem nichtnukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI), hinsichtlich ihres Potenzials, zielgerichtet in Reservoirs des HI-Virus vorzudringen, untersucht. Dabei konnte eine vermehrte Adsorption von Immunglobulinen auf der Oberfläche der Nanosuspensionen ermittelt werden. Diese werden auch als Opsonine bezeichnet, da sie eine schnellere Erkennung durch Makrophagen bewirken. Sie dienen den Makrophagen dabei als eine Art Anker auf der Partikeloberfläche, der es den Makrophagen erlaubt, an diese anzudocken und die Phagozytose zu beginnen. Dies hat zur Folge, dass sich der Wirkstoff in den Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), dem potentiellen Reservoir des HI-Virus, anreichert. Diese Annahmen wurden später durch *in-vivo*-Versuche in Ratten bestätigt.

In einer weiteren Studie wurde das Potenzial unterschiedlicher nanostrukturierter Lipidcarrier (NLC) zur Überwindung der Bluthirnschranke analysiert. Die Arzneistoffträger wurden mit Didanosin, einem nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NRTI), beladen und mit verschiedenen Tensiden an der Oberfläche modifiziert. Dafür wurden Tween 80, Lutrol F68

und Solutol HS 15 sowohl einzeln, als auch in einer Dreierkombination verwendet. Dabei konnte für Nanocarrier modifiziert mit Solutol HS 15 und für Arzneistoffträger, die die Dreierkombination an Tensiden aufwiesen, ein gewisses Potenzial, das Gehirn gezielt zu erreichen, aufgezeigt werden. Begründet wird dies durch den Adsorptionsnachweis von Apolipoprotein E (ApoE) auf der jeweiligen Partikeloberfläche. ApoE hat in früheren Studien bereits diese Fähigkeit für zahlreiche beladene Arzneistoffträger bewiesen. Positiv für die Möglichkeit der Gehirngängigkeit dieser Nanocarrier wirkt sich dabei die ebenfalls identifizierte Adsorption von ApoA-I und ApoA-IV aus. Diese beiden Proteine sind, wie ApoE, Liganden für Rezeptoren in der Leber, nicht aber an der Bluthirnschranke. Somit können sie die Aktivität von ApoE an den Rezeptoren in der Leber unterdrücken. Eine bevorzugte Adsorption von ApoE auf Tween 80 und Lutrol F68 modifizierten Nanocarriern, konnte entgegen früherer Daten in der hier durchgeführten Studie nicht bestätigt werden. Als Ursache dafür wird die im Verhältnis zu den ApoE-adsorbierenden Partikeln, geringere Partikeloberfläche der Nanocarrier angenommen. Zum Teil lagen bei diesen beiden Formulierungen Mikropartikel vor, was bei gleichbleibender Partikelkonzentration zu einer entsprechend geringeren Partikeloberfläche geführt hat.

Ferner wurden Proteinadsorptionsstudien an einem neuartigen, bioabbaubaren Trägersystem aus Polyethylencarbonat-Nanopartikeln durchgeführt. Ziel war es, einen Arzneistoffträger mit einer langen Verweildauer in der Blutbahn zu entwickeln. Durch die Ergebnisse der Proteinadsorptionsstudie konnte das Potenzial dieser Nanopartikel im Blut, als sogenannte „Stealth“-Partikel zu zirkulieren, bestätigt werden. Insgesamt wurde nur eine sehr geringe Proteinadsorption auf diesen neuartigen Nanocarriern festgestellt. Dies allein ist schon ein Indiz dafür, dass die Nanopartikel von Makrophagen nicht so schnell erkannt werden. Zudem konnten auch keine Opsonine auf der Oberfläche der Teilchen detektiert werden. Zelleexperimente mit fluoreszenzmarkierten Partikeln haben dieses Ergebnis noch untermauert, da keine Aufnahme in Makrophagen festzustellen war. Anschließend *in-vivo*-Tierversuche, die von den

Kooperationspartnern mit diesem neuartigen Arzneistoffträgersystem durchgeführt wurden, haben die lange Verweilzeit im Blutkreislauf belegt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Adsorptionskinetik auf ultrakleinen paramagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (USPIO) untersucht. Dabei war vor allem die frühe Adsorption und eventuelle Desorption von Proteinen auf der Oberfläche der Nanopartikel, auch als „Vroman-Kinetik“ bezeichnet, von Interesse. Bei dem genannten Partikelsystem konnte kein „Vroman-Effekt“ festgestellt werden, also kein Austausch von mengenmäßig stark vorkommenden Proteinen durch Proteine, die eine höhere Affinität zur Partikeloberfläche besitzen, aber nicht so zahlreich vorkommen, festgestellt werden. Auch bei längeren Inkubationszeiten in humanem Plasma wurde nur eine geringe Variabilität im Proteinadsorptionsmuster festgestellt. Auf Grund der stabilen Proteinkorona eignet sich diese Art der Nanopartikel besonders für ein gezieltes Targeting, da genauere Vorhersagen bezogen auf die resultierende *in-vivo*-Verteilung getroffen werden können.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Partikelform auf die Proteinadsorption von intravenös applizierbaren Nanopartikeln untersucht. Bis zum Zeitpunkt dieser Untersuchung gab es bereits zahlreiche Studien über ein verändertes *in-vivo*-Verhalten von unterschiedlich geformten Partikeln, aber es lagen keine Informationen darüber vor, ob und wenn ja, wie sich das Proteinadsorptionsmuster dabei verändert. Aus diesem Grund wurden Partikel ausgewählt, die bereits vorher in *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuchen ein von der Partikelform abhängiges Organverteilungsmuster aufgezeigt hatten. Dabei handelte es sich um LIPOMER-Nanopartikel, die, wenn sie unregelmäßig geformt waren, signifikant erhöht in der Milz lokalisiert wurden. Bei der Analyse der Proteinadsorption konnte festgestellt werden, dass sowohl die unregelmäßig geformten, aber auch die sphärischen Nanopartikel qualitativ sehr wenige Plasmaproteine auf der Oberfläche adsorbieren. Keines der identifizierten Proteine gehörte dabei zur Klasse der Opsonine, was wiederum eine schnelle Elimination durch Lebermakrophagen ausschließen lässt. Dennoch konnte kein Indiz in Form eines oder mehrerer entscheidender

Proteine identifiziert werden, die das unterschiedliche *in-vivo*-Verhalten belegt hätten. Daraus wurde gefolgert, dass nicht die Adsorption einzelner Plasmaproteine für die vermehrte Aufnahme in die Milz verantwortlich ist, sondern die Partikelform selbst. Die unregelmäßige Partikelform der LIPOMER-Nanopartikel könnte dabei die Phagozytose durch die Makrophagen verhindern. Vor Beginn der Phagozytose ist eine kontrollierte Anordnung des Aktin-Zytoskeletts um den Partikel von elementarer Bedeutung. Im Fall von unregelmäßig geformten Partikeln kann dieser Vorgang scheitern. Ob dies tatsächlich auch bei den LIPOMER-Nanopartikeln der Grund für das unterschiedliche *in-vivo*-Verhalten ist, muss durch weitere Untersuchungen noch belegt werden.

5. SUMMARY

This thesis investigated intravenous nanocarriers according to their potential *in vivo* fate. The main focus was to determine the protein adsorption onto the surface of different nanoparticulate drug delivery systems, as it is known to play a key role in drug targeting. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) has been used for the analysis of adsorbed proteins on the nanocarriers. The comprehensive aim was to gain further evidence on the relationship between the physicochemical properties of the nanocarriers, the plasma proteins adsorbing onto the surface of them and the resulting *in vivo* effect. In total five different topics have been investigated in this research work. Each one of it has led to a scientific article published in a journal.

First, surface-modified nanosuspensions with the drug nevirapine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), have been examined in terms of the potential goal to reach reservoirs of the HI-Virus. An increased adsorption of immunoglobulins on the surface of nanosuspensions could be determined. They belong to the group of opsonins, proteins that lead to a faster recognition by macrophages. They serve the macrophages as a kind of anchor on the particle surface, which allows the macrophages to identify them as foreign particles and to start engulfing them. Through this process, the active accumulates within the cells of the mononuclear phagocytic system (MPS) and thus, within a potential reservoir of the HI-Virus. These assumptions were later confirmed by *in vivo* experiments in rats.

In another study, the potential of different nanostructured lipid carriers (NLC) to cross the blood brain barrier (BBB) has been investigated. The drug carriers have been loaded with didanosine, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), and were modified with different surfactants. The surfactants used in this study were Tween 80, Lutrol F68 and Solutol HS 15, on top a combination of all three surfactants has been used to generate drug carriers. The results obtained lead to the assumption that the nanocarriers modified with Solutol HS

15 and the formulations containing of triple combination of surfactants may have the potential to reach the brain. This is justified by an adsorption of apolipoprotein E (apoE) on the nanoparticles surface. This protein has already shown the capability to across the BBB in previous studies with drug-loaded carriers. In addition, the identification of apoA-I and apoA-IV may support the possibility of the nanocarriers to reach the brain. These two proteins are ligands to receptors in the liver like apoE, but not at the blood brain barrier. Thus, they can suppress the activity of the apoE receptors in the liver. In contrast to previous studies, a preferential adsorption of apoE on Tween 80 and Lutrol F68 modified nanocarriers could not be confirmed in the present study. A possible explanation for the lack of adsorbed apoE might be found in the relatively small surface area of the two nanocarriers. Size measurements indicated the existence of microparticles in these formulations, which leads to a much smaller corresponding particle surface when the particle concentration is identical.

Furthermore, protein adsorption studies were performed on a novel, biodegradable nanocarrier system composed of polyethylene carbonate. The aim was to develop a drug carrier with a prolonged residence time in the bloodstream. The results of the protein adsorption study confirmed a "stealth" potential of the nanoparticles. Overall, only a very low protein adsorption was determined on these nanocarriers. Furthermore, no opsonins could be found on the surface of the nanoparticles. This is an indication that the nanoparticles will not be recognized by macrophages very quickly. Cell experiments with fluorescently labeled particles have supported that finding, since no uptake was observed in macrophages. Subsequent *in vivo* animal studies, carried out by the cooperation partners, have demonstrated likewise prolonged residence time in the bloodstream for this novel drug delivery system.

In another series of experiments, the adsorption kinetics on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles was investigated. Of major interest was especially the early adsorption and desorption of proteins on the surface of the nanoparticles. This early phase is referred as the "Vroman-kinetics". On this particle system no "Vroman effect" could be identified, as no

exchange of abundant proteins by proteins that have a higher affinity to the particle surface, but are not so numerous, could be determined. Even with longer incubation periods in human plasma, only a small variation in the protein adsorption was found. Due to this stable protein corona, this type of nanoparticles is particularly suitable for a specific targeting, as more accurate predictions of the resulting *in vivo* fate can be made.

In the final part of this thesis, the influence of particle shape on protein adsorption of intravenously administered nanoparticles was investigated. By the time of this study, there were numerous reports of an altered *in vivo* behavior of differently shaped particles, but there was very little information on whether or not it has an influence on the resulting protein adsorption. For this reason, particles were selected that possessed in previous *in vitro* and *in vivo* experiments a particle shape-dependent organ distribution. This was the case for LIPOMER nanoparticles, showing a significantly increased uptake by the spleen when containing of irregular shape. The investigations of plasma protein adsorption revealed very low adsorption rates for both particle types, the irregular and the spherical shaped nanoparticles. None of the identified proteins belonged to the class of opsonins, which in turn exclude rapid elimination by liver macrophages. Nevertheless, no protein could be identified, which would have occupied the different *in vivo* behavior. Therefore, it was concluded that the adsorption of individual plasma proteins is not responsible for the increased uptake into the spleen, rather than the particle shape itself. The irregular shape of the LIPOMER nanoparticles could thereby shield them from engulfment by the macrophages. A controlled rearrangement of actin cytoskeleton on the foreign particle is needed before the macrophages can start phagocytosis. In case of irregular shaped particles, this process might be handicapped. Further studies have to proof, if this is indeed the reason for the different *in vivo* behavior of the irregular shaped LIPOMER nanoparticles.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Absolom, D. R., 1986. Opsonins and dysopsonins: an overview. *Method. Enzymol.* 132, 281-318.
- Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S. E., 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 428-437.
- Allemann, E., Gravel, P., Leroux, J. C., Balant, L., Gurny, R., 1997. Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: Evidence of complement C3 component involvement. *J. Biomed. Mater. Res.* 37, 229-234.
- Alyautdin, R., Gothier, D., Petrov, V., Kharkevich, D., Kreuter, J., 1995. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41, 44-48.
- Blunk, T., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J.-C., Müller, B. W., Müller, R. H., 1993. Colloidal carriers for intravenous drug targeting: Plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 14, 1382-1387.
- Blunk, T., 1994. Plasmaproteinadsorption auf kolloidalen Arzneistoffträgern. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland.
- Blunk, T., Lück, M., Calvor, A., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J.-C., Müller, B. W., Müller, R. H., 1996. Kinetics of plasma protein adsorption on model particles for controlled drug delivery and drug targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42, 262-268.
- Brash, J. L., 1987. Protein adsorption at the solid-solution interface in relation to blood-material interactions. In: Brash, J. L., Horbett, T. A. (Hrsg.), *Proteins*

at interfaces: Physicochemical and biochemical studies. Am. Chem. Soc., Washington D.C., U. S. A.

- Brash, J. L., Ten Hove, P., 1993. Protein adsorption studies on 'standard' polymeric materials. J. Biomat. Sci. Polym. Ed. 4(6), 591-599.
- Brash, J. L., 2000. Exploiting the current paradigm of blood-material interactions for the rational design of blood-compatible materials. J. Biomat. Sci. Polym. Ed. 11(11), 1135-1146.
- Camner, P., Lundborg, M., Lastbom, L., Gerde, P., Gross, N., Jarstrand, C., 2002. Experimental and calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages. J. Appl. Physiol. 92, 2608-2616.
- Capriotti, A. L., Caracciolo, G., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Pozzi, D., Lagana, A., 2011. Shotgun proteomic analytical approach for studying proteins adsorbed onto liposome surface. Anal. Bioanal. Chem. 401, 1195-1202.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., Linse, S., 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 2050-2055.
- Champion, J. A., Mitragotri, S., 2006. Role of target geometry in phagocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103(13), 4930-4934.
- Champion, J. A., Mitragotri, S., 2009. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. Pharm. Res. 26(1): 244-249.
- Dadsetan, M., Christenson, E. M., Unger, F., Ausborn, M., Kissel, T., Hiltner, A., Anderson, J. M., 2003. *In vivo* biocompatibility and biodegradation of poly (ethylene carbonate). J. Control. Release 93(3), 259-270.
- Davis, S. S., 1981. Colloids as drug-delivery systems. Pharm. Technol. 5, 71-88.

- Decuzzi, P., Godin, B., Tanaka, T., Lee, S. Y., Chiappini, C., Liu, X., Ferrari, M., 2010. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J. Control. Release* 141, 320–327.
- Delves, P. J., Roitt, I. M., 2000. The immune system: First of two parts. *New Engl. J. Med.* 343, 37–49.
- Devarajan, P. V., Jindal, A. B., Patil, R. R., Mulla, F., Gaikwad, R. V., Samad, A., 2010. Particle shape: A new design parameter for passive targeting in splenotropic drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 99(6), 2576-2581.
- Diederichs, J. E., 1996. Plasma protein adsorption patterns on liposomes: Establishment of analytical procedure. *Electrophoresis* 17, 607-611.
- Dobrovolskaia, M. A., McNeil, S. E., 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2, 469-478.
- Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B., McNeil, S. E., 2008. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharmacol.* 5, 487-495.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., Nosworthy, N. J., 2003. Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83(2), 433-473.
- Ehrlich, P., 1906. *Collected Studies on Immunity*, John Wiley & Sons, New York, U. S. A.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., 2001. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer Verlag, München, Deutschland.
- Gessner, A., Paulke, B. R., Müller, R. H., 2000. Analysis of plasma protein adsorption onto polystyrene particles by two-dimensional electrophoresis: Comparison of sample application and isoelectric focusing techniques. *Electrophoresis* 21, 2438-2442.

- Gessner, A., Olbrich, C., Schröder, W., Kayser, O., Müller, R. H., 2001. The role of plasma proteins in brain targeting: Species dependent protein adsorption patterns on brain-specific lipid drug conjugate (LDC) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 214(1-2), 87-91.
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., Rotello, V. M., 2008. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(11), 1307-1315.
- Göppert, T. M., Müller, R. H., 2003. Plasma protein adsorption of tween 80- and poloxamer 188-stabilized solid lipid nanoparticles. *J. Drug. Target.* 11, 225-231.
- Göppert, T. M., Müller, R. H., 2004. Alternative sample preparation prior to two-dimensional electrophoresis protein analysis on solid lipid nanoparticles. *Electrophoresis* 25, 134-140.
- Göppert, T. M., 2005. Plasmaproteinadsorption auf parenteral applizierbaren kolloidalen Arzneistoffträgern zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Dissertation, Freie Universität Berlin, Deutschland.
- Göppert, T. M., Müller, R. H., 2005a. Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int. J. Pharm.* 302, 172-186.
- Göppert, T. M., Müller, R. H., 2005b. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns. *J. Drug. Target.* 13, 179-187.
- Gordon, S., 1995. The macrophage. *Bioessays* 17(11), 977–986.
- Gratton, S. E., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., DeSimone, J. M., 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11613-11618.

- Gray, F. R., Gherardi, F., Scaravilli, F., 1988. The neuropathology of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). A review. *Brain* 111, 245-266.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Milshteyn, A., Sinkule, J., Torchilin, V. P., Langer, R., 1993. Biodegradable PEG-coated stealth nanospheres. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 20, 131-132.
- Gref, R., Luck, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., Müller, R. H., 2000. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 18, 301-313.
- Gulyaev, A. E., Gelperina, S. E., Skidan, I. N., Antropov, A. S., Kivman, G. Y., Kreuter, J., 1999. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* 16, 1564-1569.
- Gupta, A. K., Curtis, A. S., 2004. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 493-496.
- Gupta, A. K., Naregalkar, R. R., Vaidya, V. D., Gupta, M., 2007. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine* 2, 23-29.
- Harnisch, S., Müller, R. H., 1998. Plasma protein adsorption patterns on emulsions for parenteral administration: Establishment of a protocol for two-dimensional polyacrylamide electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 349-354.
- Harnisch, S., Müller, R. H., 2000. Adsorption kinetics of plasma proteins on oil-in-water emulsions for parenteral nutrition. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49, 41-46.

- Harper, G. R., Davies, M. C., Davis, S. S., Tadros, T. F., Taylor, D. C., Irving, M. P., Waters, J. A., 1991. Steric stabilization of microspheres with grafted polyethylene oxide reduces phagocytosis by rat kupffer cells *in vitro*. *Biomaterials* 12, 695-699.
- Hekmatara, T., Gelperina, S. E., Vogel, V., Yang, S. R., Kreuter, J., 2009. Encapsulation of water-insoluble drugs in poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 5091-5098.
- Hochstrasser, D. F., Funk, M., Appel, R. D., Pun, T., James, R. W., Hochstrasser, A. C., Scherrer, J. R., Pellegrini, C., Müller, A. F., 1990. From biopsy to automatic diagnosis. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 120, 1862-1866.
- Illum, L., Davis, S. S., 1987. Targeting of colloidal particles to the bone marrow. *Life Sci.* 40, 1553-1560.
- Illum, L., Davis, S. S., Müller, R. H., Mak, E., West, P., 1987. The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer poloxamine 908. *Life Sci.* 40, 367-374.
- Jeon, S. I., Lee, J. H., Andrade, J. D., DeGennes, P. G., 1991. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci.* 142(1), 149-158.
- Jorgensen, L., Wood, G. K., Rosenkrands, I., Petersen, C., Christensen, D., 2009. Proteinadsorption and displacement at lipid layers determined by total internal reflection fluorescence (TIRF). *J. Liposome Res.* 19, 99-104.
- Juliano, R. L., 1988. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2, 31-54.

- Kang, S. C., Jo, Y. J., Bak, J. P., Kim, K. C., Kim, Y. S., 2007. Evaluation for protein binding affinity of maghemite and magnetite nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 3706-3708.
- Kim, H. R., Andrieux, K., Delomenie, C., Chacun, H., Appel, M., Desmaele, D., Taran, F., Georgin, D., Couvreur, P., Taverna, M., 2007. Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and Protein Lab-on-chip system. *Electrophoresis* 28, 2252-2261.
- Klose, J., 1975. Proteinmapping by combined isoelectric focussing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Hummangenetik* 26, 211-234.
- Klose, J., Kobalz, U., 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16, 1034–1059.
- Koosha, F., Müller, R. H., Davis, S. S., 1989. Polyhydroxybutyrate as a drug carrier. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6(2), 117-130.
- Kreuter, J., 1983. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: Materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm. Acta Helv.* 58, 242-250.
- Kreuter, J., 1994. Drug targeting with nanoparticles. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 19(3), 253-256.
- Kreuter, J., 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 65-81.
- Kreuter, J., 2004. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 484-488.
- Leroux, J. C., Gravel, P., Balant, L., Volet, B., Anner, B. M., Allemann, E., Doelker, E., Gurny, R., 1994. Internalization of poly(D,L-lactic acid)

- nanoparticles by isolated human leukocytes and analysis of plasma proteins adsorbed onto the particles. *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 471–481.
- Li, J. P., Pei, Y. Y., Zhang, X. Y., Gu, Z. H., Zhou, Z. H., Yuan, W. F., Zhou, J. J., Zhu, J. H., Gao, X. J., 2001. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: Synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release* 71, 203-211.
- Liliemark, E., Sjostrom, B., Liliemark, J., Peterson, C., Kallberg, N., Larsson, B. S., 1995. Targeting of teniposide to the mononuclear phagocytic system (MPS) by incorporation in liposomes and submicron lipid particles; An autoradiographic study in mice. *Leukemia lymphoma* 18, 113-118.
- Liu, G., Men, P., Harris, P. L., Rolston, R. K., Perry, G., Smith, M. A., 2006. Nanoparticle iron chelators: a new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance. *Neurosci. Lett.* 406, 189-193.
- Lück, M., Paulke, B. R., Schröder, W., Blunk, T., Müller, R. H., 1998. Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J. Biomed. Mater. Res.* 39, 478-485.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K. A., 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14265-14270.
- May, R. C., Machesky, L. M., 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114, 1061-1077.
- Moghimi, S. M., Muir, I. S., Illum, L., Davis, S. S., Kolb-Bachofen, V., 1993. Coating particles with a block copolymer (poloxamine 908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum. *Biochim. Biophys. Acta* 1179, 157-165.

- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C., 2001. Long circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharm. Rev.* 53, 283-318.
- Mosqueira, V. C., Legrand, P., Morgat, J. L., Vert, M., Mysiakine, E., Gref, R., Devissaguet, J.-P., Barratt, G., 2001. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain length and density. *Pharm. Res.* 18(10), 1411-1419.
- Müller, R. H., Heinemann, S., 1989. Surface modelling of microparticles as parenteral systems with high tissue affinity. In: Gurny, R., Junginger, H. E. (Hrsg.), *Bioadhesion - Possibilities and Future Trends*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland.
- Müller, R. H., 1991. *Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting - Modification, characterization and in vivo distribution*. CRC Press, Boca Raton, U. S. A., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland.
- Müller, R. H., Lück, M., Kreuter, J., 2001. Medicament excipient particles for tissue specific application of a medicament, PCT-application PCT/EP98/064299 (P53601).
- Müller, R. H., Schmidt, S., 2002. PathFinder technology for the delivery of drugs to the brain. *New Drugs* 2, 38-42.
- Müller, R. H., Gohla, S., Keck, C. M., 2011a. State of the art of nanocrystals - special features, production, nanotoxicology aspects & intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78(1), 1-9.
- Müller, R. H., Shegokar, R., Keck, C. M., 2011b. 20 Years of lipid nanoparticles (SLN, NLC): Present state of development & industrial applications. *Curr. Drug Discov. Technol.* 8(3), 207-227.
- Navia, B. A., Jordan, B. D., Price, R. W., 1986. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann. Neurol.* 19, 517-524.

- Niidome, T., Yamagata, M., Okamoto, Y., Akiyama, Y., Takahashi, H., Kawano, T., Katayama, Y., Niidome, Y., 2006. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications. *J. Control. Release* 114(3), 343-347.
- O'Farrel, P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Ogawara, K., Furumoto, K. F., Nagayama, S., Minato, K., Higaki, K., Kai, T., Kimura, T., 2004. Precoating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: Implications for rational design of nanoparticles. *J. Control. Release* 100, 451-455.
- O'Mullane, J. E., Artursson, P., Tomlinson, E., 1987. Biopharmaceutics of microparticulate drug carriers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 507, 120-140.
- Owens III, D. E., Peppas, N. A., 2006. Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93-102.
- Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E., Tamarkin, L., 2004. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* 11, 169-183.
- Pardridge, W. M., 2003. Blood-brain barrier drug targeting: The future of brain drug development. *Mol. Interv.* 3(2), 90-105.
- Petri, B., Bootz, A., Khalansky, A., Hekmatara, T., Müller, R. H., Uhl, R., Kreuter, J., Gelperina, S. E., 2007. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Revisiting the role of surfactants. *J. Control. Release* 117, 51-58.
- Renette, T., Librizzi, D., Endres, T., Merkel, O., Beck-Broichsitter, M., Bege, N., Petersen, H., Curdy, C., Kissel, T., 2012. Poly(ethylene carbonate) nanoparticles as carrier system for chemotherapy showing prolonged *in vivo* circulation and anti-tumor efficacy. *Macromol Biosci.* 12(7), 970-978.

- Sacktor, N. C., McArthur, J. C., 1997. Prospects for therapy of HIV-associated neurologic diseases. *J. Neurovirol.* 3, 89-101.
- Sawant, R. R., Torchilin, V. P., 2010. Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers. *Soft Matter* 6(17), 4026-4044.
- Scanu, A. M., 1987. Plasma apolipoproteins: Gene structure, function and variants. In: Putman, F. W. (Hrsg.), *The Plasma Proteins: Structure, function and genetic control*. Academic Press, New York, U. S. A.
- Schmidt, S., Müller, R. H., 2003. Plasma protein adsorption patterns on surfaces of Amphotericin B-containing fat emulsions. *Int. J. Pharm.* 254, 3-5.
- Schrager, L. K., D'Souza, M. P., 1998. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *J. Am. Med. Assoc.* 280(1), 67-71.
- Servoli, E., Maniglio, D., Aguilar, M. R., Motta, A., San Roman, J., Belfiore, L. A., Migliaresi, C., 2008. Quantitative analysis of protein adsorption via atomic force microscopy and surface plasmon resonance. *Macromol. Biosci.* 8, 1126-1134.
- Shegokar, R., 2010. Development and evaluation of novel drug delivery systems for an anti-HIV drugs. Dissertation, S. N. D. T. Women's University, Mumbai, Indien.
- Shegokar, R., Singh, K. K., 2011. Surface modified nevirapine nanosuspensions for viral reservoir targeting: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Int. J. Pharm.* 421, 341-352.
- Simpson, D. M., Tagliati, M., 1994. Neurologic manifestations of HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 121, 769-785.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W. E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 70, 1-20.

- Speiser, P. P., 1998. Nanopartikel. In: Müller, R. H., Hildebrand, G. E. (Hrsg.), Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland.
- Tan, J. S., Butterfield, D. E., Voycheck, C. L., Caldwell, K. D., Li, J. T., 1993. Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats. *Biomaterials* 14, 823-833.
- Thode, K., 1996. Spezifische Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie: Physikochemische Charakterisierung und Studien zur Plasmaproteinadsorption. Dissertation, Freie Universität Berlin, Germany.
- Thode, K., Lück, M., Semmler, W., Müller, R. H., Kresse, M., 1997. Determination of plasma protein adsorption on magnetic iron oxides: Sample preparation. *Pharm. Res.* 14, 905-910.
- Tissot, J. D., Schneider, P., James, R. W., Daigneault, R., Hochstrasser, D. F., 1991. High-resolution two-dimensional protein electrophoresis of pathological plasma/ serum. *Appl. Theor. Electrophor.* 2, 7–12.
- Unger, F., Westedt, U., Hanefeld, P., Wombacher, R., Zimmermann, S., Greiner, A., Ausborn, M., Kissel, T., 2007. Poly(ethylene carbonate): A thermoelastic and biodegradable biomaterial for drug eluting stent coatings. *J. Control. Release* 117, 312-321
- van Oss, C. J., Absolom, D. R., Neumann, A. W., 1983. Interaction of phagocytes with other blood cells and with pathogenic and nonpathogenic microbes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 416, 332-350.
- van Vlerken, L. E., Vyas, T. K., Amiji, M. M., 2007. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharm. Res.* 24, 1405-1414.

- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J. P., 2006. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27(24), 4356-4373.
- Vroman, L., 1962. Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature* 196, 476-477.
- Vroman, L., Adams, A. L., Fischer, G. C., Munoz, P. C., 1980. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood* 55, 156–159.
- Vroman, L., Adams, A. L., 1986. Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 391-402.
- Vroman, L., 1988. The life of an artificial device in contact with blood: Initial events and their effect on its final state. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 64, 352-357.
- Warheit, D. B., 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol. Sci.* 101, 183-185.
- Wilkins, D. J., Myers, P. A., 1966. Studies on the relationship between the electrophoretic properties of colloids and their blood clearance and organ distribution in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.* 47, 568-576.
- Wojciechowski, P., Brash, J. L., 1991. The Vroman effect in tube geometry: The influence of flow on protein adsorption measurements. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2, 203-216.
- Zhang, F., Kang, E. T., Neoh, K. G., Wang, P., Tan, K. L., 2001. Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction in protein adsorption. *Biomaterials* 22, 1541-1548.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-D PAGE	Zwei-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese
2-DE	Zwei-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese
^{99m} Tc	Technetium-99m
Abb.	Abbildung
AFM	atomic force microscope
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoA-IV	Apolipoprotein A-IV
ApoE	Apolipoprotein E
BBB	blood brain barrier
ca.	circa
et al.	und andere
HI-Virus	human immunodeficiency virus
HPLC	high-performance liquid chromatography
i. v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
LDL	low-density lipoprotein
m	Meter
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
min	Minute
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MS	Massenspektrometer
NLC	nanostructured lipid carriers
nm	Nanometer
NNRTI	Nichtnukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
O/W-Emulsion	Öl-in-Wasser-Emulsion
PEG	Polyethylenglykol
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLN	solid lipid nanoparticles

SPR	surface plasmon resonance
TIRF	total internal reflection fluorescence
USPIO	ultrasmall superparamagnetic iron oxide
w/v	weight/volume
z. B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer

8. PUBLIKATIONSLISTE

Buchkapitel:

Jansch, M., Keck, C. M., 2009. Proteinanalytik mit 2D-PAGE. In: Keck, C. M., Müller, R. H. (Hrsg.), *Moderne Pharmazeutische Technologie, Lehrbuch für Studierende der Pharmazie & Nachschlagewerk für Apotheker in Offizin und Forschung*, www.pharmazie-lehrbuch.de.

Begutachtete Publikationen:

Shegokar, R., **Jansch, M.**, Singh, K. K., Müller, R. H., 2010. *In vitro* protein adsorption studies on nevirapine nanosuspensions for HIV/AIDS chemotherapy. *Nanomedicine* 7(3), 333-340, doi:10.1016/j.nano.2010.10.012.

Wa Kasongo, K., **Jansch, M.**, Müller, R. H., Walker, R. B., 2010. Evaluation of the *in vitro* differential protein adsorption patterns of didanosine-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for potential targeting to the brain. *J. Liposome Res.* 21(3), 245-254, doi:10.3109/08982104.2010.539186.

Bege, N., Renette, T., **Jansch, M.**, Reul, R., Merkel, O., Petersen, H., Curdy, C., Müller, R. H., Kissel, T., 2011. Biodegradable poly(ethylene carbonate) nanoparticles as a promising drug delivery system with "stealth" potential. *Macromol. Biosci.* 11(7), 897-904, doi: 10.1002/mabi.201000496.

Jansch, M., Stumpf, P., Graf, C. M., Rühl, E., Müller, R. H., 2012. Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 428(1-2), 125-133, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.060.

Jansch, M., Jindal, A. B., Majee Sharmila, B., Samad, A., Devarajan, P. V., Müller, R. H., 2012. Influence of particle shape on plasma protein adsorption and macrophage uptake. *Die Pharmazie (akzeptiert 23.06.2012)*.

Konferenzbeiträge:

- Jansch, M.**, Nurzatul, E., Keck, C. M., Müller, R. H., Ismail, M., 2009.
Thymoquinone nanoemulsions for intravenous delivery. 5th German-Polish Symposium – New challenges for pharmaceutical sciences, Pozen, Polen.
- Jansch, M.**, Shegokar, R., Singh, K. K., Müller, R. H., 2009. Intravenous anti-HIV nevirapine nanosuspensions: Protein adsorption & organ distribution. 5th German-Polish Symposium – New challenges for pharmaceutical sciences, Pozen, Polen.
- Jansch, M.**, Nurzatul, E., Keck, C. M., Müller, R. H., Ismail, M., 2009. Plasma protein adsorption on thymoquinone i. v. nanoemulsions. 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Kopenhagen, Dänemark.
- Jansch, M.**, Stumpf, P., Graf, C. M., Rühl, E., Müller, R. H., 2009. A novel formulation of magnetic iron oxide nanoparticles for MRT: Determination of plasma protein adsorption pattern. Jahrestagung der DPhG, Jena, Deutschland.
- Jansch, M.**, Shegokar, R., Keck, C. M., Singh, K. K., Müller, R. H., 2009. Plasma protein adsorption patterns on i. v. anti-HIV nevirapine nanosuspensions. 2009 Annual Meeting and Exposition, AAPS - American Association of Pharmaceutical Scientists, Los Angeles, U. S. A.
- Shegokar, R., **Jansch, M.**, Singh, K. K., Müller, R. H., 2010. Correlation of plasma protein adsorption patterns to *in vivo* organ distribution of nevirapine nanosuspensions, Tenth International Symposium of Controlled Release Society - Indian Chapter on Advances in Technology & Business Potential of New Drug Delivery Systems, Mumbai, Indien.
- Jansch, M.**, Stumpf, P., Graf, C. M., Rühl, E., Müller, R. H., Keck, C. M., 2010. Plasma protein adsorption pattern of a new modified type of magnetic iron oxide nanoparticles for MRT diagnostics. 7th World Meeting on

Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology,
Valletta, Malta.

Bege, N., Renette, T., **Jansch, M.**, Reul, R., Petersen, H., Curdy, C., Müller, R. H. and Kissel, T., 2010. Poly(ethylene carbonate) “stealth” nanoparticles – long circulation drug vehicles. International Symposium on Polymer Therapeutics, Valencia, Spanien.

Jansch, M., Wa Kasongo, K., Walker, R. B., Müller, R. H., 2010. Influence of surfactants on the *in vitro* protein adsorption patterns of didanosine loaded NLC. Drug transport and delivery, Göteborg, Schweden.

Jansch, M., Shegokar, R., Keck, C. M., Singh, K. K., Müller, R. H., 2010. PathFinder: Nanotechnologie für die gewebspezifische Arzneistoffapplikation. Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Berlin, Deutschland.

Jansch, M., Wa Kasongo, K., Walker, R. B., Müller, R. H., 2010. Didanosine-loaded NLC for potential delivery of the drug to the brain. 2010 Congress for Students and Post Doctoral Fellows, New Orleans, U. S. A.

Jansch, M., Stumpf, P., Graf, C. M., Rühl, E., Müller, 2010. Adsorption kinetics of plasma proteins on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. 2010 Congress for Students and Post Doctoral Fellows, New Orleans, U. S. A.

Jansch, M., Wa Kasongo, K., Walker, R. B., Müller, R. H., 2010. Didanosine-loaded NLC for potential delivery of the drug to the brain. 2010 Annual Meeting and Exposition, AAPS - American Association of Pharmaceutical Scientists, New Orleans, U. S. A.

Jansch, M., Stumpf, P., Graf, C. M., Rühl, E., Müller, 2010. Adsorption kinetics of plasma proteins on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. 2010 Annual Meeting and Exposition, AAPS - American Association of Pharmaceutical Scientists, New Orleans, U. S. A.

Jansch, M., Müller, R. H., 2011. 2-D PAGE – A powerful tool to estimate organ distribution of intravenously injected drug delivery systems. DPhG Doktorandentagung 2011, Heringsdorf, Deutschland.

Doktorovova, S., **Jansch, M.**, Shegokar, R., Macedo, A., Martins-Lopes, P., Silva, A. M., Lopes, C. M., Müller, R. H., Souto, E. B., 2012. Qualitative analysis of protein adsorption pattern on cationic solid lipid nanoparticles. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, Türkei.

Müller, R. H., **Jansch, M.**, Keck, C. M., 2012. Nano taxis to the brain. Nanomedicine: Visions, risks, potential, European Academy, Berlin, Deutschland.

9. DANKSAGUNG

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rainer H. Müller für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas und die stets hervorragenden Arbeitsbedingungen. Er hat mir bei der Durchführung jeglichen zeitlichen, materiellen und inhaltlichen Spielraum gewährt. Ohne seinen großen persönlichen Einsatz wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Ich möchte Herrn Prof. Müller ferner für die Unterstützung bei der Anfertigung wissenschaftlicher Publikationen sowie der Teilnahme an zahlreichen Konferenzen herzlich danken.

Ein großer Dank gilt all meinen Kollegen in der Kelchstraße, insbesondere für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnt seien hier Corinna Schmidt und Inge Volz, die mich bei den praktischen Arbeiten ein ums andere Mal tatkräftig unterstützt haben. Frau Gabriela Karsubke danke ich für ihre Hilfe bei zahlreichen Verwaltungsaufgaben.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Dr. Wolfgang Schwabe und Herrn Dr. Wolfgang Mehnert für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Studentenpraktika.

Schließlich möchte ich meinen Eltern Ingrid und Detlef, meiner Schwester Nina und meiner Freundin Juliane Wattky für ihre Unterstützung im Laufe dieser Arbeit von ganzem Herzen danken.