

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Sicherheit von Hämoglobin-Mikropartikeln
für deren Verwendung als künstliche Sauerstoffträger

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Axel Steffen
aus Prenzlau, Deutschland

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract.....	2
1 Einleitung.....	3
2 Material und Methoden.....	7
2.1 Materialien	7
2.2 Herstellung der Mikropartikel.....	8
2.3 Charakterisierung der Mikropartikel	8
2.4 Prä-klinische Untersuchungen.....	9
2.4.1 Fließeigenschaften der HbMP	9
2.4.2 Sauerstoffbindungskurve der HbMP.....	9
2.4.3 ROS-Produktions-Test	10
2.5 Herstellung von HbMP mit bakteriell kontaminiertem Hämoglobin	11
2.6 Bestimmung des bakteriellen Wachstums	12
2.6.1 Einfluss von Glutaraldehyd und EDTA	12
2.6.2 Bestimmung der Keimbelastung während der Partikelherstellung.....	13
3 Ergebnisse.....	14
3.1 Untersuchungen zur Partikelformulierung.....	14
3.2 HbMP – Größe und Morphologie.....	15
3.3 HbMP – Stabilität.....	15
3.4 Prä-klinische Untersuchungen.....	16
3.4.1 Fließeigenschaften und Sauerstoffaffinität	16
3.4.2 ROS-Produktions-Test	17
3.5 Bakterielleres Wachstum	17
3.5.1 Einfluss von Glutaraldehyd auf das bakterielle Wachstum	18
3.5.2 Einfluss von EDTA auf das bakterielle Wachstum	19
3.5.3 Kombination von GA und EDTA	21
3.5.4 HbMP- Herstellung mit bakteriell kontaminiertem Hämoglobin	21
4 Diskussion	23
5 Literatur.....	27
Eidesstattliche Versicherung	32
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	33
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	34
Publikation 1	34
Publikation 2	48
Publikation 3	58
Lebenslauf	70
Publikationsliste.....	71
Danksagung	72

Zusammenfassung

Mit der Co-Precipitation-Crosslinking-Dissolution (CCD) Technik können in wenigen Schritten Protein-Mikropartikel hergestellt werden. Abhängig davon, welche Salzlösungen und Proteine für die Präzipitation verwendet werden, unterscheiden sich die resultierenden Partikel in ihren Eigenschaften und ihrer Morphologie. Es zeigte sich, dass durch die Präzipitation von Hämoglobin in $MnCl_2$ mit Na_2CO_3 und anschließender Vernetzung sowie Auflösung der Salzschablone Hämoglobin-Mikropartikel, die HbMP, produziert werden konnten. Die HbMP haben eine erdnussartige Form, eine Partikelgröße von etwa 750 nm mit einer engen Größenverteilung und eine Proteineinschlussrate von 73 %.

Die HbMP sollen als Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger (HBOC) als Blutersatz im Menschen zum Einsatz kommen. In Bezug auf HBOC gibt es Sicherheitsbedenken hinsichtlich oxidativer Gewebsschädigung oder des Bindens von Stickstoffmonoxid und damit Auslösen einer Vasokonstriktion. In ersten prä-klinischen Untersuchungen wurden die HbMP daraufhin untersucht. Die HbMP weisen eine hohe Sauerstoffaffinität auf, dies verhindert sowohl eine Sauerstoffübersversorgung als auch eine Vasokonstriktion der kleinen Blutgefäße.

Neben den prä-klinischen Untersuchungen zur Sicherheit der HbMP, spielt auch die Sicherheit bei der Herstellung der Partikel eine wichtige Rolle, da die HbMP nicht sterilisiert werden können. Bei klassischen Sterilisationsverfahren kommt es zu einer Denaturierung des Hämoglobins oder starken Bildung von Methämoglobin, wodurch die Partikel ihre Sauerstofftransportfähigkeit verlieren. Deswegen werden die Ausgangsmaterialien (insbesondere das Hämoglobin) und die produzierte Partikelsuspension intensiv auf ihre Keimbelastung untersucht. Es ist jedoch vorstellbar, dass einige Bakterien aufgrund ihrer geringen Konzentration bei den Standardtests nicht erkannt werden, deshalb wurde untersucht, wie sich diese Bakterien im Herstellungsprozess verhalten würden. Die biozide Wirkung von Glutaraldehyd und Ethylendiamintetraessigsäure, Chemikalien, die bei der Herstellung von HbMP verwendet werden, ist bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Chemikalien das Bakterienwachstum in den bei der HbMP-Herstellung verwendeten Konzentrationen verhindern. Darüber hinaus wurde die Partikelproduktion mit Hämoglobinlösungen durchgeführt, die mit *Escherichia coli* oder *Staphylococcus epidermidis* versetzt waren. In den fertigen Partikelsuspensionen konnten keine lebenden Bakterien nachgewiesen werden.

Aus allen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass das Verfahren zur Herstellung von HbMP im Hinblick auf eine bakterielle Kontamination sicher ist und die produzierten Partikel die Anforderungen an einen universell einsetzbaren Blutersatzstoff erfüllen.

Abstract

The co-precipitation-crosslinking-dissolution (CCD) technique can be used to produce protein microparticles in a few steps. Depending on the salt solutions and proteins that are used for the precipitation, the resulting particles differ in their properties and morphology. It was found that by precipitating hemoglobin in $MnCl_2$ with Na_2CO_3 , crosslinking and dissolution of the salt template hemoglobin microparticles (HbMP) could be produced. The HbMP have a peanut-like shape, a particle size of about 750 nm with a narrow size distribution and a protein entrapment rate of 73 %.

The HbMP are intended to be used as hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC) as a blood substitute in humans. With respect to HBOC, there are safety concerns regarding oxidative tissue damage or nitric oxide (NO) scavenging and thus triggering vasoconstriction. In initial pre-clinical studies, HbMP were evaluated for this. The HbMP exhibit a high oxygen affinity. This prevents both premature oxygenation and vasoconstriction of small blood vessels due to NO-scavenging. Due to the size of the HbMP of more than 100 nm but less than 1 μm , both penetration of the particles through the endothelial gaps and increased phagocytosis and disturbance of the microcirculation are prevented.

In addition to pre-clinical studies on the safety of HbMP, safety also plays an important role in the production of the particles since they cannot be sterilized. In classical sterilization processes denaturation of hemoglobin or strong formation of methemoglobin occurs which causes the particles to lose their ability to transport oxygen. Therefore, the starting materials (especially hemoglobin) and the produced particle suspension are intensively tested for their bacterial load. However, some bacteria may not be detected by the standard tests due to their low concentration. Therefore, it was investigated how these bacteria would behave in the manufacturing process. The biocidal effects of glutaraldehyde and ethylenediaminetetraacetic acid, chemicals used in the manufacturing of HbMP, are well known. Both chemicals have been shown to inhibit bacterial growth at concentrations used in HbMP production. In addition, particle production was performed with hemoglobin solutions spiked with *Escherichia coli* or *Staphylococcus epidermidis*, respectively. No living bacteria were detected in the final particle suspensions.

From all investigations it can be concluded that the manufacturing process of HbMP is safe regarding bacterial contamination and that the particles produced meet the requirements for a universally applicable blood substitute.

1 Einleitung

Künstliche Sauerstoffträger als Ersatz für rote Blutzellen (RBZ) haben in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Sehr oft wird Hämoglobin als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Sauerstoffträger (HBOC – Hemoglobin-Based Oxygen Carrier) verwendet. Es wird menschliches, tierisches, insbesondere bovines oder rekombinantes Hämoglobin verwendet, das dann mit verschiedenen Methoden chemisch modifiziert, vernetzt, polymerisiert oder verkapselt werden kann [1–3]. In dieser Arbeit werden Biopolymer-Mikropartikel als HBOC mit der einfachen Co-Precipitation-Crosslinking-Dissolution (CCD) Technik unter Verwendung von Hämoglobin hergestellt. Je nach verwendetem Biopolymer gibt es auch verschiedene andere mögliche Anwendungen für diese Mikropartikel. So wurden beispielsweise Enzymartikel hergestellt, die als Mikroreaktoren oder Biosensoren verwendet werden können [4]. Diese Methode kann auch einen vielversprechenden Ansatz zur Herstellung von Drug Carriern durch Präzipitation der gewünschten Biopolymere und entsprechende Oberflächenmodifikationen darstellen [5, 6]. So ist es gelungen, das Vitamin B2, Riboflavin, zusammen mit humanem Serumalbumin (HSA) in diesen Partikeln zu immobilisieren. Dies führte zu Partikeln mit guter Hämokompatibilität und Freisetzung des Wirkstoffs Riboflavin über einen längeren Zeitraum [7]. Darüber hinaus konnten HSA-Mikropartikel mit Doxorubicin beladen werden, einem Zytostatikum, das in der Chemotherapie zur Krebsbehandlung eingesetzt wird. Diese Partikel zeigten eine höhere Wirksamkeit bei der Hemmung der Stoffwechselaktivität in Zellkulturen als freies Doxorubicin allein [8].

Für die Herstellung der Partikel können besonders Calciumchlorid oder Manganchlorid zusammen mit Natriumcarbonat für die Co-Präzipitation verwendet werden. Dabei können die Partikel durch Mischen von zwei Salzlösungen unter milden Prozessbedingungen hergestellt werden [9–11]. Bei diesem Verfahren wurde eine hohe Absorption bzw. Einschlusseffizienz für Biopolymere beobachtet [12, 13]. Durch Präzipitation von CaCl_2 und Na_2CO_3 zusammen mit Biopolymeren können diese effektiver eingeschlossen werden als durch einfache Adsorption an vorgefertigten CaCO_3 Partikel [14]. Diese Grundgedanken wurden aufgenommen und zu der Co-Precipitation-Crosslinking-Dissolution (CCD) Technik weiterentwickelt [15–17].

Im ersten Schritt, der Co-Präzipitation, werden das Biopolymer in CaCl_2 oder MnCl_2 und Na_2CO_3 gemischt. Es entsteht eine Salzschablone, in der das Biopolymer eingeschlossen ist. Im nächsten Hauptschritt, der Vernetzung, werden die einzelnen Moleküle in der Salzschablone chemisch aneinandergebunden. Der dritte Schritt ist das Auflösen des Carbonat-Templates durch Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), so dass sich nur noch die Biopolymerpartikel in der Lösung befinden.

Für die Verwendung der so hergestellten Mikropartikel als künstlicher Sauerstoffträger wird Hämoglobin aus Rinderblut verwendet. Im Vergleich zu menschlichem Hämoglobin ist es in großen Mengen verfügbar und frei von humanen Krankheitserregern. Ein umfassendes Konzept zur biologischen Sicherheit des pharmazeutischen Ausgangsstoffes Rinderhämoglobin wurde unter Berücksichtigung der Empfehlungen der entsprechenden Behörde (Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland) entwickelt. Dabei geht es unter anderem um die Herkunft und Rückverfolgbarkeit des Rinderblutes bis zum einzelnen Tier. Das Rinderblut wird in Tirol, Österreich, gewonnen, einem Gebiet, das laut Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) frei von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) ist [18]. Darüber hinaus werden die Tiere nach einer veterinärmedizinischen Untersuchung für genusstauglich erklärt. In dem geografischen Gebiet, in dem die Tiere leben und von ihnen das Blut entnommen wird, kommen kritische virale Krankheitserreger nicht vor [19]. Dennoch wird das Blut auf virale Kontaminationen untersucht. Außerdem werden das Blut und das daraus gewonnene Hämoglobin auf eine bakterielle Belastung und das Hämoglobin vor der Verwendung als Ausgangsmaterial auf Endotoxine getestet. Nur wenn alle Spezifikationen erfüllt sind, wird das Hämoglobin für die Herstellung von Hämoglobin-Mikropartikeln (HbMP) mit Hilfe der CCD-Technik verwendet [15, 20]. Neben der Sicherheit der Ausgangsstoffe ist auch die Sicherheit des HbMP-Produktionsprozesses in Bezug auf eventuelle bakterielle Kontaminationen sowie die Sicherheit des Endproduktes Teil des Sicherheitskonzeptes.

Um die Sicherheit des Endproduktes und die Möglichkeit des Einsatzes der HbMP als künstlichen Sauerstoffträger im Menschen zu untersuchen, wurden erste prä-klinische Untersuchungen durchgeführt. Frühere Formulierungen von Blutersatzprodukten führten in vivo häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen. Hauptsächlich kam es dabei zu Bluthochdruck durch Vasokonstriktion, ausgelöst von den Produkten [21–23]. Nur wenige der früheren Produkte haben es in eine spätere Phase der klinischen Untersuchungen geschafft, führten allerdings auch dort oft zu Gesundheitsschäden oder Tod und wurden von der FDA nicht zugelassen [24, 25]. Für die durch die HBOC ausgelöste Vasokonstriktion gibt es zwei hauptsächliche Hypothesen. Einerseits könnte sie durch eine Sauerstoffübersättigung ausgelöst werden, andererseits durch die Bindung und damit den Entzug von Stickstoffmonoxid (NO), was zu einer Verengung der Gefäße im Körper führt [22, 26]. Außerdem könnte die Induzierung von oxidativem Stress durch freies Hämoglobin ein weiterer Faktor sein [27]. Aus den bisherigen Erfahrungen und klinischen Untersuchungen mit den HBOC lassen sich einige Schlussfolgerungen für die Entwicklung neuer Produkte ziehen. So sollten sie eine hohe Sauerstoffaffinität haben, um den Sauerstoff nicht frühzeitig abzugeben und eine Vasokonstriktion auszulösen. Außerdem sollten die HBOC eine Größe von mehr als 100 nm und weniger als 1 µm haben. Das würde einerseits einen Übergang

der HBOC durch die Endothelspalten verhindern und andererseits käme es nicht zu einer erhöhten Phagozytose oder Behinderung der Mikrozirkulation [28, 29].

Neben den prä-klinischen Sicherheitsuntersuchungen, ist auch der Aspekt der biologischen Sicherheit im Herstellungsprozess der HbMP ein wichtiger Punkt. Obwohl mit Ausnahme des Hämoglobins alle zur Herstellung der HbMP verwendeten Stoffe pharmazeutische Qualität besitzen oder zugelassene Arzneimittel (humanes Serumalbumin - HSA) sind, ist die Sterilität des Endprodukts nicht gewährleistet. Die terminale Sterilisation des Hämoglobins sowie der Partikelsuspension mit Standardmethoden der Hitzeinaktivierung, UV-C- oder Gammabestrahlung führt zu einer Denaturierung des Hämoglobins oder zu einer starken Bildung von Methämoglobin aufgrund der Oxidation des Eisens in der Häm-Gruppe. Methämoglobin ist nicht in der Lage, Sauerstoff freizusetzen [30, 31]. Es ist daher für die Herstellung der HbMP, die als künstlicher Sauerstoffträger eingesetzt werden sollen, nicht mehr geeignet. Da die vorgenannten Methoden nicht anwendbar sind, wird die Hämoglobinlösung nach der Herstellung sterilfiltriert und auf den Endotoxingehalt sowie die Keimbelastung untersucht. Auf diese Weise ist eine bakterielle Kontamination unwahrscheinlich. Dennoch ist es denkbar, dass eine geringe Zahl an Bakterien durch die Tests nicht erkannt wird. In diesem Fall wäre es von Vorteil, wenn eine zusätzliche Abreicherung während des HbMP-Produktionsprozesses erreicht werden könnte.

Der Herstellungsprozess der HbMP umfasst mehrere Waschschrte, die zu einer Verringerung der potenziellen bakteriellen Belastung beitragen könnten. Glutaraldehyd (GA) wird für die inter- und zu einem gewissen Grad auch intramolekulare Vernetzung der Hämoglobinmoleküle in einer Konzentration von 0,02 % verwendet [32, 33]. Es ist für seine antibakterielle Wirkung bekannt und wird in höheren Konzentrationen als Desinfektionsmittel oder zur Kaltsterilisation von medizinischen Instrumenten in Krankenhäusern eingesetzt [34–36]. Auch in biochemischen Anwendungen und als Fixiermittel für die Elektronenmikroskopie ist es weit verbreitet [37, 38].

EDTA wird bei der Herstellung von HbMP verwendet, um das Mangancarbonat-Template aufzulösen und die reinen Proteinpartikel herzustellen. EDTA wird häufig in medizinischen und biologischen Anwendungen eingesetzt. Aufgrund seiner chelatbildenden Eigenschaften wird es zur Antikoagulation von Blutproben verwendet [39]. Außerdem wird es seit langem zur Permeabilisierung der Zellwand von gramnegativen Zellen benutzt [40, 41]. Eine gewisse hemmende Wirkung von EDTA auf das Wachstum von *Staphylococcus epidermidis* konnte ebenfalls nachgewiesen werden [42].

In dieser Arbeit sollte es untersucht werden, ob die Schritte der Vernetzung der Proteine mit GA oder der Auflösung der Salzschaablone mit EDTA zusätzlich zu den Waschschrten im Partikelherstellungsprozess zu einer Verringerung einer möglichen Kontamination mit

grampositiven und gramnegativen Bakterien beitragen können. Als Modellorganismen wurden hierfür *Staphylococcus epidermidis* und *Escherichia coli* ausgewählt. Beide Bakterien sind intensiv untersucht worden. *E. coli* kommt hauptsächlich im Darm von Menschen und Tieren vor, ist gramnegativ und hat eine ungefähre Länge von 2 µm, einen Durchmesser von 1 µm und eine zylindrische Form [43]. *S. epidermidis* lebt auf der menschlichen Haut, ist aber auch häufig für Infektionen von immungeschwächten Patienten im Krankenhaus verantwortlich [44, 45]. Dieses grampositive Bakterium hat eine kugelförmige Gestalt und einen Durchmesser von 0,5 - 1,5 µm [46]. Darüber hinaus spielen beide Bakterien eine Rolle bei unerwünschten Transfusionsreaktionen [47]. Aufgrund der Lagerungsbedingungen bei Raumtemperatur sind vor allem Thrombozytenkonzentrate betroffen [48, 49]. Eine Kontamination mit *S. epidermidis* erfolgt hier insbesondere durch die Besiedlung der Haut und eine unzureichende Desinfektion der Punktionsstelle bei der Blutspende [50, 51]. Daher kann es sowohl bei der Herstellung von Blutprodukten als auch bei der Produktion von HbMP zu bakteriellen Kontaminationen kommen, die durch Tests nicht erkannt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eigenschaften verschiedener Partikel, die mit dem CCD-Verfahren hergestellt wurden, zu vergleichen und die Partikel auf ihre Eignung zum potentiellen Einsatz als künstlichen Sauerstoffträger als Blutersatz im Menschen zu überprüfen. Die Sicherheit spielt dabei ebenfalls eine große Rolle. So sollen geeignete Hämoglobin-Mikropartikel in ersten präklinischen Tests untersucht werden. Außerdem liegt ein besonderes Augenmerk auf der Sicherheit des Herstellungsprozesses. Es soll geprüft werden, ob das CCD-Verfahren zur HbMP-Herstellung bei einer möglichen Kontaminierung des Hämoglobins mit Bakterien das Sicherheitskonzept für die Herstellung der HbMP ergänzen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 1. Liste der verwendeten Substanzen.

Substanzen	Bezugsquelle
Ringer-Acetat-Lösung	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Ampuwa (aqua ad iniectabilia)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Humanes Serumalbumin (HSA)	Takeda Pharma Vertrieb GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Peressigsäure (C ₂ H ₄ O ₃)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mangandichlorid (MnCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd (GA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mueller-Hinton II-Bouillon	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Columbia Agar 5 % Schafblut	Thermo Fisher Diagnostics GmbH, Wesel, Deutschland

Staphylococcus epidermidis (eigene Kultivierung) und *Escherichia coli* (ATCC 25922) wurden freundlicherweise vom Bereswill Labor des Instituts für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin (Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Das bovine Hämoglobin (Hb) wurde durch hypotone Hämolyse mit einer niedrig-osmolaren Salzlösung hergestellt [17, 52]. Frisches Rindervollblut (zur Verfügung gestellt von Biophyll GmbH, Dietersburg, Deutschland), welches mit 2 g/L EDTA zur Antikoagulation versetzt wurde, wurde 20 Minuten lang bei 2500 g und 2 – 8 °C zentrifugiert. Die resultierenden gepackten roten Blutzellen (RBZ) wurden mindestens dreimal mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und

über Nacht mit vier bis fünf Volumen (in Bezug auf das Volumen der gepackten RBZ) einer niedrig-osmolaren Natriumchloridlösung (100 mOsmol/kg) lysiert. Das resultierende Lysat wurde bei 5500 g und 2 – 8 °C für 4 h zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mittels einer Tangentialflussfiltration (TFF) behandelt, um eventuelle Zelltrümmer der Erythrozyten zu entfernen. Es wurde ein KrosFlo KR2 System mit einem 500 kDa mPES Hohlfasermodule (Repligen Europe B.V., Breda, Niederlande) verwendet, ähnlich wie in [53] dargestellt. Das aufgereinigte Hämoglobin wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. [54]

2.2 Herstellung der Mikropartikel

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden Hämoglobin- oder BSA-Mikropartikel hergestellt [54, 55]. Dabei wurde das jeweilige Protein entweder in $MnCl_2$ oder $CaCl_2$ mit Na_2CO_3 präzipitiert. Bei den prä-klinischen Untersuchungen sowie den Untersuchungen zur bakteriellen Sicherheit des Partikelproduktionsprozesses kamen ausschließlich Hämoglobin-Mikropartikel (HbMP) zum Einsatz, die mit $MnCl_2$ und Na_2CO_3 präzipitiert wurden. Für die Herstellung der Protein-Mikropartikel wurde die Co-Precipitation-Crosslinking-Dissolution (CCD) Technik verwendet [16]. Dafür wurden 0,25 M Na_2CO_3 und 0,25 M $MnCl_2$ (oder $CaCl_2$) mit 10 mg/ml Hb (oder BSA) und 1 mg/ml HSA bei Raumtemperatur unter schnellem Rühren (200 – 600 rpm, Magnetrührer, Bibby Scientific CB161, Bibby Sterilin Ltd., Stone, UK) gemischt (Co-Präzipitation). Nach der Präzipitation wurden 2,5 mg/ml HSA zugegeben, nach 5 min die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt und dreimal mit 0,9 % NaCl gewaschen. Die gewaschenen Partikel wurden in einer 0,02 % GA-Lösung resuspendiert und 1 h lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert (Vernetzung, Crosslinking). Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Vernetzung durch Zugabe von 0,1 M Glycin abgestoppt, welches mit überschüssigem GA und freien funktionalen Gruppen des Vernetzers reagiert. Anschließend wurde 0,2 M EDTA-Lösung pH 7,4 hinzugefügt, um das $MnCO_3$ (oder $CaCO_3$) Template aufzulösen (Dissolution). Die entstandenen Proteinpartikel wurden mit $NaBH_4$ in 0,1 M NaOH zur Reduktion der freien Aldehydgruppen behandelt. Abschließend wurden die Partikel dreimal mit 0,9 % NaCl gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in Ringer-Acetat resuspendiert.

2.3 Charakterisierung der Mikropartikel

Die Morphologie der Mikropartikel wurde sowohl mittels Rasterelektronenmikroskopie (SEM) als auch per konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) beurteilt [54]. Für die SEM-Aufnahmen wurde ein Tropfen der Probe auf einen Objektträger aufgetragen, über Nacht getrocknet und mit Gold beschichtet. Zur Anwendung kam ein Gemini Leo 1550 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV. CLSM-Aufnahmen wurden mit

einem LSM 510 Meta Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit 100 x Öl-Immersionsobjektiv (numerische Apertur 1,3) angefertigt.

Außerdem wurde die Größe der Mikropartikel durch dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt, wobei ein Zeta Sizer nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK) zum Einsatz kam. Das Zeta Potential der Partikel in 0,9 % NaCl (pH 7,4, Leitfähigkeit $17,2 \pm 0,9$ mS/cm) wurde ebenfalls mit dem Zeta Sizer bestimmt [54].

Um die Protein-Einschluss-Effizienz (EE%) zu bestimmen, wurde die Differenz zwischen dem vor der Präzipitation eingesetzten Proteingehalt (P_t) sowie dem Proteingehalt im Überstand (P_f) nach der Präzipitation untersucht und mit folgender Formel berechnet: $EE\% = (P_t - P_f) * 100/P_t$ [55]. Die Hämoglobinkonzentration wurde bei 415 nm mit einem Mikroplatten-Leser (PowerWave 340, Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt. Die Bestimmung der BSA-Konzentration erfolgte mit einem UV/VIS-Spektralphotometer (Hitachi U2800, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japan) bei 280 nm.

Um die Stabilität der HbMP zu charakterisieren, wurde die Konzentration des freien Hämoglobins im Überstand von HbMP-Suspensionen während der Lagerdauer bestimmt [54]. Dazu wurden Aliquots von drei HbMP-Chargen, die mit 0,02 % GA vernetzt wurden, für sechs Monate bei 2 – 8 °C gelagert. Jeden Monat wurden Proben der entsprechenden Aliquots genommen und bei 20000 g für 30 min zentrifugiert (Hettich Mikro 22R, Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Das freie Hämoglobin im Überstand wurde mit der Standard-Alkalin-Hämatin-(AHD-) Methode bestimmt [56].

2.4 Prä-klinische Untersuchungen

2.4.1 Fließeigenschaften der HbMP

Die dynamische Viskosität wurde mit einem Rheometer MCR 301 (Anton Paar Group AG, Graz, Österreich) unter Verwendung eines Platte-Platte-Systems bestimmt [57]. Das System wurde mit Vollblut oder HbMP (resuspendiert in Blutplasma, Volumenkonzentration 40 %) beschickt und die Viskosität in einem Scherbereich von 0,1 bis 1000 s^{-1} bei 20 °C aufgenommen.

2.4.2 Sauerstoffbindungskurve der HbMP

Die Sauerstoffbindungskurven von bovinem Hb sowie HbMP wurden mit einem Hemox Analyzer (TCS Scientific, New Hope, USA) bei 37 °C aufgenommen [57]. Die Sauerstoff-Sättigung und der Sauerstoff-Halbsättigungsdruck (p_{50}) wurden in einem Sauerstoff-Partialdruckbereich von 150 bis 2 mmHg aufgenommen.

2.4.3 ROS-Produktions-Test

Es sollte überprüft werden, ob die HbMP in Zellkultur zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen [57]. Dazu wurden Cor.4U Kardiomyozyten (Axiogenesis AG, Köln, Deutschland) in BMCC-Medium (serumfrei, Axiogenesis AG, Köln, Deutschland) in einer Dichte von 20000 Zellen/Well in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät und inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Zusätzen versetzt und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Zusätze wurden je 20 µL Ringer-Acetat (Mediumkontrolle, Suspensionsmedium der HbMP), *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP, 500 µM, Positivkontrolle, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder HbMP zu den Zellen gegeben (Tabelle 2). Anschließend wurden die Zusätze im Medium abgenommen und mit Medium, welches 50 µM 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (H₂DCFDA, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) ersetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunklen, in der das H₂DCFDA die Zellmembranen permeiert, wurde das Medium wieder abgenommen und die Zellen mit frischem Medium zweimal gewaschen.

Tabelle 2. Übersicht über die Zusammensetzung der Proben und der Zusätze. (Modifiziert nach Kao et al., 2018, S. 3 [57])

Probe	Zusatz vor 72 h Inkubation	H ₂ DCFDA Zugabe
Negativkontrolle	Nur Zellen	-
Farbstoffkontrolle	Nur Zellen	+
Mediumkontrolle	10 % Ringer-Acetat	+
Positivkontrolle	500 µM TBHP	+
HbMP	10 % HbMP	+

H₂DCFDA wird als Indikator für ROS in Zellen verwendet. Nachdem es durch die Zellmembranen gelangt ist, werden die Acetat Gruppen durch intrazelluläre Prozesse abgespalten und das H₂DCFDA in stark fluoreszierendes Dichlorfluorescein umgewandelt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Pherastar Plattenleser (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bestimmt.

Im Anschluss wurde ein Lumineszenz-basierter Test zur Überprüfung der Vitalität der Zellen durchgeführt (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Madison, USA). Dabei wurde ein Lumineszenz-Signal erzeugt, welches von der ATP-Konzentration in den Zellen abhängig und damit proportional zur Anzahl der lebenden Zellen war.

Die Berechnung des Verhältnisses der ROS-basierten Fluoreszenz und der ATP-basierten Lumineszenz ergab ein ROS-Level, welches unabhängig von der Zellzahl war.

2.5 Herstellung von HbMP mit bakteriell kontaminiertem Hämoglobin

Es wurde der HbMP-Herstellungsprozess in Anwesenheit von Bakterien untersucht (Abbildung 1, [54]). Dazu wurde die Hämoglobinlösung vor der Präzipitation mit *E. coli* bzw. *S. epidermidis* versetzt. Die Bakterien wurden dafür drei Tage vor der Partikelherstellung auf Agarplatten ausgebracht und bei 37 °C bebrütet. Danach wurde etwa ein Drittel einer Bakterienkolonie in Ampuwa überführt, die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gemessen (Spectra Classic, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) und so eingestellt, dass sie $1,5 \cdot 10^8$ KBE/mL (KBE - koloniebildende Einheit) entsprach. Die Bakteriensuspension wurde auf $2,5 \cdot 10^5$ KBE/ml verdünnt und mit der Hämoglobinlösung gemischt. Die Bakterienkonzentration in der Hämoglobinlösung wurde für jede Partikelcharge bestimmt und als Ausgangswert für die Bewertung der Keimbelastung in den verschiedenen Phasen des Partikelherstellungsprozesses verwendet.

Die mit Bakterien versetzte Hb-Lösung wurde mit $MnCl_2$ gemischt und mit Na_2CO_3 präzipitiert. Anschließend wurde der Standard-Partikelproduktionsprozess mit Vernetzung und Auflösung wie unter 2.2 dargestellt durchgeführt (Abbildung 1 – Probe B). In weiteren Versuchsreihen wurden die präzipitierten HbMP ohne Vernetzung nach der Präzipitation aufgelöst (Abbildung 1 – Probe A). An verschiedenen Punkten im Herstellungsprozess wurden Proben genommen und darin die Keimbelastung bestimmt (siehe 2.6.2).

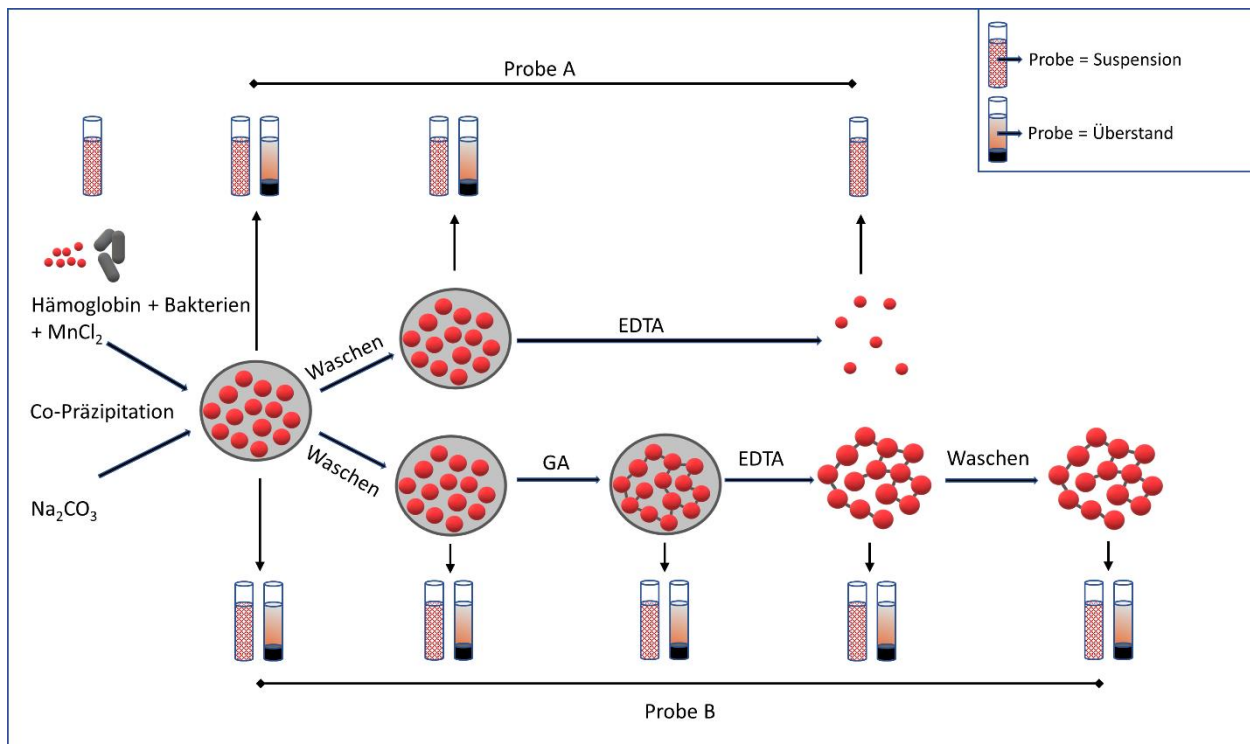


Abbildung 1. Vereinfachtes Schema der experimentellen Herangehensweise. Die Hämoglobin-MnCl₂ Lösung wurde mit *E. coli* bzw. *S. epidermidis* versetzt und mit Na₂CO₃ co-präzipitiert. Die entstandenen Partikel wurden mit NaCl-Lösung gewaschen und entweder wurde das Carbonat-Template direkt aufgelöst (Probe A) oder die Partikel wurden mit Hilfe von Glutaraldehyd vernetzt und erst anschließend mit EDTA aufgelöst (Probe B). An den entsprechenden Punkten des Produktionsprozesses wurden Proben der Suspension und des Überstandes (nach Zentrifugation) genommen und darin die koloniebildenden Einheiten bestimmt. (Modifiziert nach Steffen et al., 2022, S. 121 [54])

2.6 Bestimmung des bakteriellen Wachstums

2.6.1 Einfluss von Glutaraldehyd und EDTA

Die Bakterien in Medium, versetzt mit EDTA oder GA, wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gefüllt. Die Proben enthielten Bakterien in einer Konzentration von etwa $7,5 \cdot 10^5$ KBE/ml sowie 0,2 M EDTA oder 0,02 % GA. Die Positivkontrolle bestand aus Bakterien und Wachstumsmedium (Mueller-Hinton II-Bouillon), die Negativkontrolle aus Bakterien und 0,4 % Peressigsäure und die Sterilkontrolle nur aus Medium. Die Bakterien wurden für 20 h bei 37 °C in Mueller-Hinton II-Bouillon vorinkubiert. Anschließend wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch frische Mueller-Hinton II-Bouillon (Kontrolle) oder Mueller-Hinton II-Bouillon + 0,02 % GA oder 0,2 M EDTA ersetzt. Die Zellen wurden 2,5 h lang bei Raumtemperatur gezüchtet. Zu Beginn und zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt, um das bakterielle Wachstum zu beurteilen. In einem weiteren Versuch wurde eine Mischung aus EDTA und GA gleichzeitig untersucht. [54]

2.6.2 Bestimmung der Keimbelastung während der Partikelherstellung

Zur Bewertung der Anzahl lebensfähiger Bakterien während der Partikelherstellung wurden Proben aus der anfänglichen Hb-MnCl₂-Lösung, nach der Präzipitation, dem Waschen, der Vernetzung, der Auflösung und aus der endgültigen Partikelsuspension entnommen (Abbildung 1 - Probe B). Es wurden zwei Proben zur Bestimmung der Keimbelastung analysiert. Eine aus der Partikelsuspension und eine aus dem Überstand der Suspension nach Zentrifugation (3000 g, 3 min).

Zusätzlich zu diesem Standardprotokoll wurden auch Versuchsreihen durchgeführt, bei denen präzipitierte Partikel mit EDTA ohne vorherige Vernetzung mit Glutaraldehyd aufgelöst wurden. Daher wurde die letzte Probe hier nach Resuspension in EDTA-Lösung genommen (Abbildung 1 - Probe A).

Die jeweiligen Proben wurden seriell verdünnt (unverdünnt bis 1:1000), 100 µl jeder Verdünnung wurden auf Agarplatten aufgetragen und einen Tag bei 37 °C inkubiert. Eventuell wachsende Kolonien wurden gezählt. [54]

3 Ergebnisse

Es wurden Untersuchungen zur Optimierung der Herstellung der Mikropartikel durchgeführt. Dabei wurde neben MnCl_2 auch CaCl_2 als Ausgangsstoff zur Herstellung verschiedener Protein-Partikel verwendet und die Partikelarten miteinander verglichen [55].

Mit Hämoglobin-Mikropartikeln (HbMP), präzipitiert mit MnCl_2 und Na_2CO_3 wurden erste prä-klinische in vitro Sicherheitsuntersuchungen durchgeführt [57].

Außerdem wurden im Rahmen des entwickelten Sicherheitskonzeptes Versuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine eventuell vorhandene bakterielle Kontamination während des HbMP-Herstellungsprozesses unwirksam gemacht werden kann. Dazu wurde zunächst das Wachstum grampositiver (*S. epidermidis*) und gramnegativer (*E. coli*) Bakterien in Anwesenheit von Glutaraldehyd bzw. EDTA untersucht. Außerdem wurden Hämoglobin-Mikropartikel hergestellt, in denen das verwendete Hämoglobin vor der Präzipitation mit Bakterien versetzt wurde [54].

3.1 Untersuchungen zur Partikelformulierung

Es wurden Hämoglobin- bzw. BSA-Mikropartikel hergestellt, bei deren Produktion entweder MnCl_2 oder CaCl_2 mit Na_2CO_3 und dem jeweiligen Protein präzipitiert wurde. Tabelle 3 liefert einen Überblick über die wesentlichen Ergebnisse.

Tabelle 3. Eigenschaften verschiedener Mikropartikel. Es wurden Hb- oder BSA- Partikel hergestellt. Dabei wurden die Proteine entweder mit CaCl_2 oder MnCl_2 mit Na_2CO_3 co-präzipitiert. Die entstandenen CaCO_3 - bzw. MnCO_3 -Hybridpartikel enthielten 10 mg/mL Protein. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei Messungen. ^a nach Präzipitation; ^b Endpartikel nach Auflösung des Templates (Modifiziert nach Xiong et al., 2018, S. 159 [55])

Template	CaCO_3		MnCO_3	
	Hb	BSA	Hb	BSA
EE [%] ^a	15,5 ± 3,1	36,5 ± 3,2	73,0 ± 1,1	66,6 ± 2,0
Zeta Potential [mV] ^b	-12,3 ± 0,9	-10,4 ± 1,5	-4,3 ± 1,5	-9,3 ± 0,3
Größe ^b	2 – 20 µm Abhängig von Prozessbedingungen		< 1 µm Unabhängig von Prozessbedingungen	

Es zeigte sich, dass in den durch Co-Präzipitation mit MnCl_2 und Na_2CO_3 hergestellten Mikropartikeln wesentlich mehr Protein eingeschlossen werden konnte. Dies galt für beide untersuchten Proteine. Außerdem unterschieden sich die Größen der Endpartikel nach Auflösung der Template. Die mit MnCl_2 und Na_2CO_3 hergestellten Partikel hatten nach der Auflösung eine erdnussartige Form und eine Größe im Submikron-Bereich. Die Größe der Fertigpartikel, die mit CaCl_2 und Na_2CO_3 präzipitiert, vernetzt und aufgelöst wurden war hingegen sehr stark von den gewählten Prozessbedingungen, besonders von der Rührgeschwindigkeit bei der Präzipitation

abhängig. Je höher die Rührgeschwindigkeit war, desto kleiner waren die Partikel [55]. Die Fertigpartikel, die auf dem MnCO_3 -Template beruhen, waren hingegen robust gegenüber diesen Bedingungen und zeigten einheitliche Größen. Alle hergestellten Fertigpartikel-Varianten hatten ein negatives Zeta-Potential. Dies führte dazu, dass die Partikel in physiologischer Lösung stabil waren und nicht aggregierten. Allerdings war dieser Effekt bei den MnCO_3 templierten Hb-Partikeln weniger stark ausgeprägt. Das Zeta-Potential war hier weniger negativ und die Partikel in Suspension weniger stabil als die Albumin Partikel [55].

3.2 HbMP – Größe und Morphologie

Für die weiteren Untersuchungen wurden Hämoglobin-Mikropartikel, präzipitiert mit MnCl_2 und Na_2CO_3 und danach weiter zu Fertigpartikeln prozessiert, verwendet. Diese HbMP hatten eine nahezu einheitliche, erdnussartige Form. Die Größenverteilung der HbMP wurde mittels DLS bestimmt und lag bei $759 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$. Dieser Größenbereich wurde durch CLSM- und SEM-Aufnahmen bestätigt (Abbildung 2, [54]).

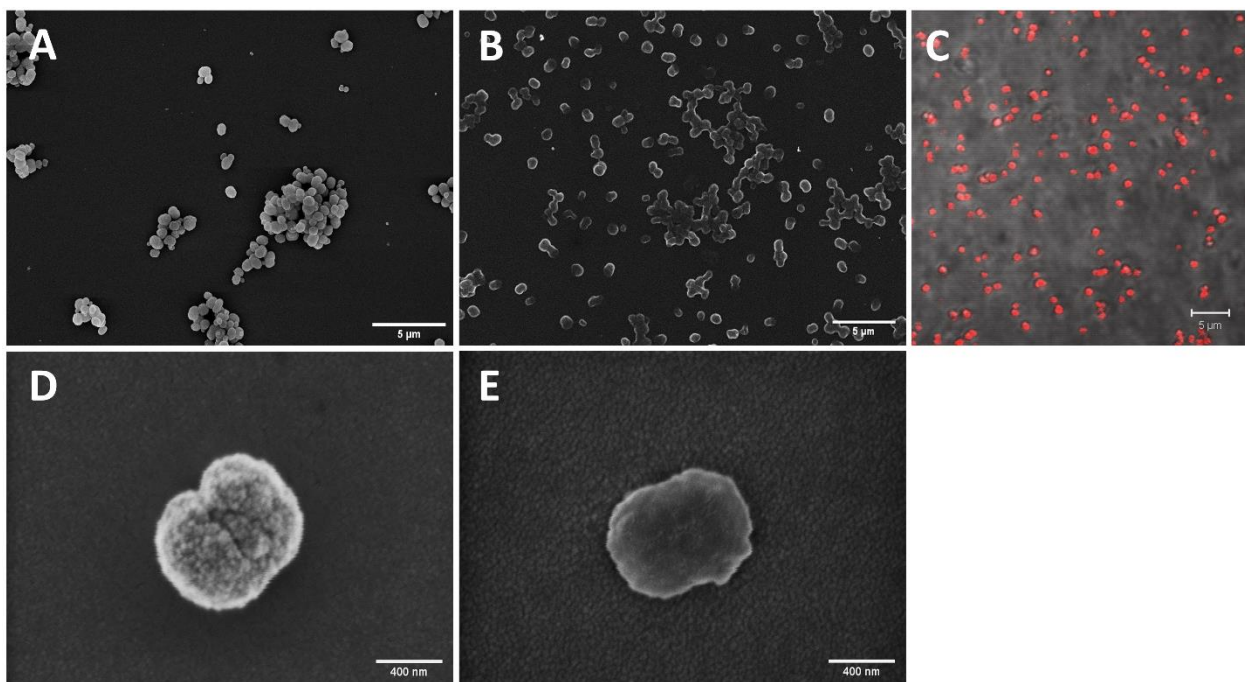


Abbildung 2. Mikroskopische Aufnahmen von HbMP. A, D – SEM Aufnahmen von getrockneten und adhärenen Partikeln nach der Präzipitation im Carbonat-Template. B, E – SEM Aufnahmen von getrockneten und adhärenen finalen HbMP nach Präzipitation, Vernetzung, Auflösung und Waschen. C – CLSM Aufnahme mit autofluoreszierenden HbMP in Suspension. Maßstäbe: A, B, C – $5 \mu\text{m}$, D, E – 400 nm . (Steffen et al., 2022, S. 117 [54])

3.3 HbMP – Stabilität

Über die Lagerdauer von sechs Monaten blieb der Anteil an freiem Hämoglobin im Überstand der HbMP nahezu konstant im Bereich von $1 - 1,5 \text{ mg/mL}$ (Abbildung 3).

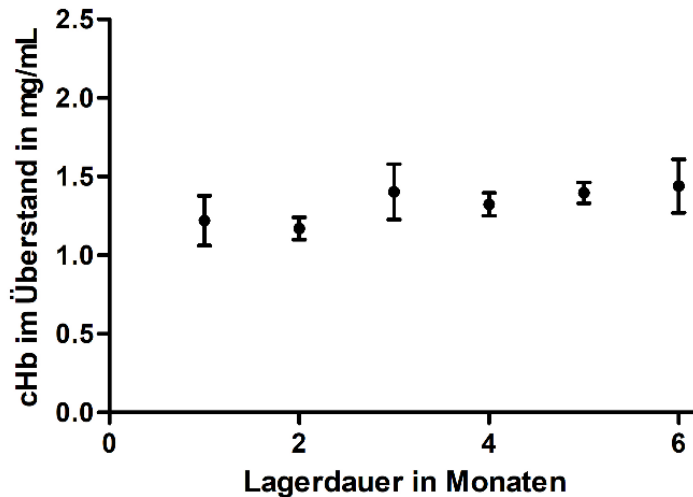


Abbildung 3. Konzentration von freiem Hämoglobin im Überstand von HbMP Suspensionen. Messpunkte sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei HbMP-Chargen. (Modifiziert nach Steffen et al., 2022, S. 118 [54])

3.4 Prä-klinische Untersuchungen

3.4.1 Fließeigenschaften und Sauerstoffaffinität

Die Sauerstoffaffinität der HbMP war im Vergleich zu freiem Hämoglobin etwa doppelt so hoch. Der p50 lag bei den HbMP bei 10,17 mmHg, der des freien bovinen Hämoglobins bei 23,33 mmHg [57].

Die Fließeigenschaften der HbMP ähnelten denen von Vollblut. Die Viskositäten lagen bei den betrachteten Scherraten in einem ähnlichen Bereich (Tabelle 4).

Tabelle 4. Dynamische Viskosität von Vollblut und HbMP (resuspendiert in Plasma) in Abhängigkeit von der Scherrate. Volumenkonzentration: 40 %; T = 20 ± 0,5 °C (Modifiziert nach Kao et al., 2018, S. 5 [57])

Scherrate [s ⁻¹]	Viskosität [mPa*s]	
	Vollblut	HbMP
1,1	53,0 ± 12,1	38,4 ± 0,7
12,7	15,1 ± 2,8	11,4 ± 0,5
143,8	6,1 ± 0,4	7,3 ± 0,0
1000	5,0 ± 0,1	6,2 ± 0,1

Beide Testsubstanzen zeigten das für Blut typische scherverdünnende Verhalten, bei dem die Viskosität bei höheren Scherraten abnimmt.

3.4.2 ROS-Produktions-Test

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur ROS-Induzierung in Zellkultur mit Kardiomyozyten dargestellt. Dabei wurde das Verhältnis aus der ROS-basierten Fluoreszenz und der ATP-basierten Lumineszenz gebildet. Die Werte der Farbstoffkontrolle (Zellen plus Farbstoff) bildeten dabei den Hintergrund und unterschieden sich nicht von den Werten der Mediumkontrolle mit Ringer-Acetat. TBHP diente als Positivkontrolle und induzierte eine starke ROS-Bildung. Die Werte der HbMP waren nur geringfügig höher als in der Farbstoffkontrolle, jedoch um ein Vielfaches geringer als die der Positivkontrolle. Dies ist allerdings kein Hinweis auf eine ROS-Induzierung, sondern darauf zurückzuführen, dass durch es durch eine Interaktion der HbMP zu einer reduzierten ATP-basierten Lumineszenz kam [57].

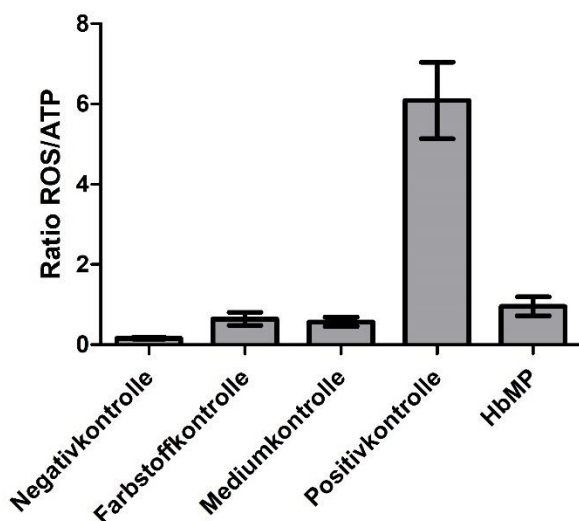


Abbildung 4. ROS-Produktion der HbMP und Kontrollen. Die ROS-basierte Fluoreszenz wurde mittels der ATP-basierten Lumineszenz normalisiert. Kardiomyozyten wurden mit verschiedenen Zusätzen inkubiert: ohne Zusätze (Negativkontrolle), mit 50 μM H_2DCFDA (Farbstoffkontrolle), mit 10 % Ringer-Acetat (Suspensionsmedium der HbMP, Mediumkontrolle), 500 μM TBHP (Positivkontrolle) und 10 % HbMP. (Modifiziert nach Kao et al., 2018, S. 6 [57])

3.5 Bakteriellles Wachstum

In diesen Versuchen wurde der Einfluss von Glutaraldehyd und EDTA auf das Wachstum von Bakterien nach Zugabe in das Wachstumsmedium untersucht. Außerdem wurden Hämoglobin-Mikropartikel hergestellt. Dabei wurde das Hämoglobin vor der Präzipitation mit Bakterien versetzt. Anschließend wurde die bakterielle Belastung an verschiedenen Punkten im Herstellungsprozess untersucht.

3.5.1 Einfluss von Glutaraldehyd auf das bakterielle Wachstum

E. coli Zellen, die mit 0,02 % Glutaraldehyd bei 37 °C kultiviert wurden, wuchsen im Vergleich zur Kontrolle im normalen Wachstumsmedium deutlich geringer (Abbildung 5 A). Das Wachstum der Bakterien war jedoch stärker als bei der Negativkontrolle mit Peressigsäure. Dies bedeutet, dass in gewissem Umfang eine Vermehrung der Bakterien stattfand. Glutaraldehyd hemmt die lebensfähigen Funktionen, so dass sich die Bakterien nicht mehr teilen können, aber es fixiert auch die Zellwandbestandteile. Die Zellen werden also nicht lysiert. Das Vorhandensein von Bakterien wurde in den Versuchen durch Bestimmung der optischen Dichte nachgewiesen. Die fixierten, aber toten Zellen erklären somit das höhere Signal im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Kultivierung von *S. epidermidis* mit Glutaraldehyd bei 37 °C lieferte ähnliche Ergebnisse (Abbildung 5 B). Glutaraldehyd hemmt die Vermehrung von Bakterien unter den gegebenen Bedingungen erheblich.

Bei der Kultivierung von *E. coli* unter Zugabe von Glutaraldehyd bei Raumtemperatur ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede in den Wachstumsraten im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5 C). Nach einem geringen Anstieg der optischen Dichte nach 30 min war kein weiteres Wachstum der Zellen zu beobachten. Im Gegensatz dazu wuchsen die Zellen in der Kontrolle in normalem Wachstumsmedium im Verlauf des Experiments weiterhin stark. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte der optischen Dichte hier auf den jeweiligen Ausgangswert normiert. Ein ähnliches, wenn auch nicht ebenso ausgeprägtes Bild zeigte sich, als *S. epidermidis* bei Raumtemperatur kultiviert wurde (Abbildung 5 D). Auch hier stieg die optische Dichte nach dem Messpunkt bei 30 min fast bis in den Bereich der Kontrolle an. Anschließend blieb sie jedoch auf diesem Niveau, während die Kontrollzellen weiterwuchsen. Der geringere Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit Glutaraldehyd kultivierten Zellen im Vergleich zu den *E. coli*-Wachstumskurven könnte auch auf die längere Generationszeit von *S. epidermidis* zurückzuführen sein.

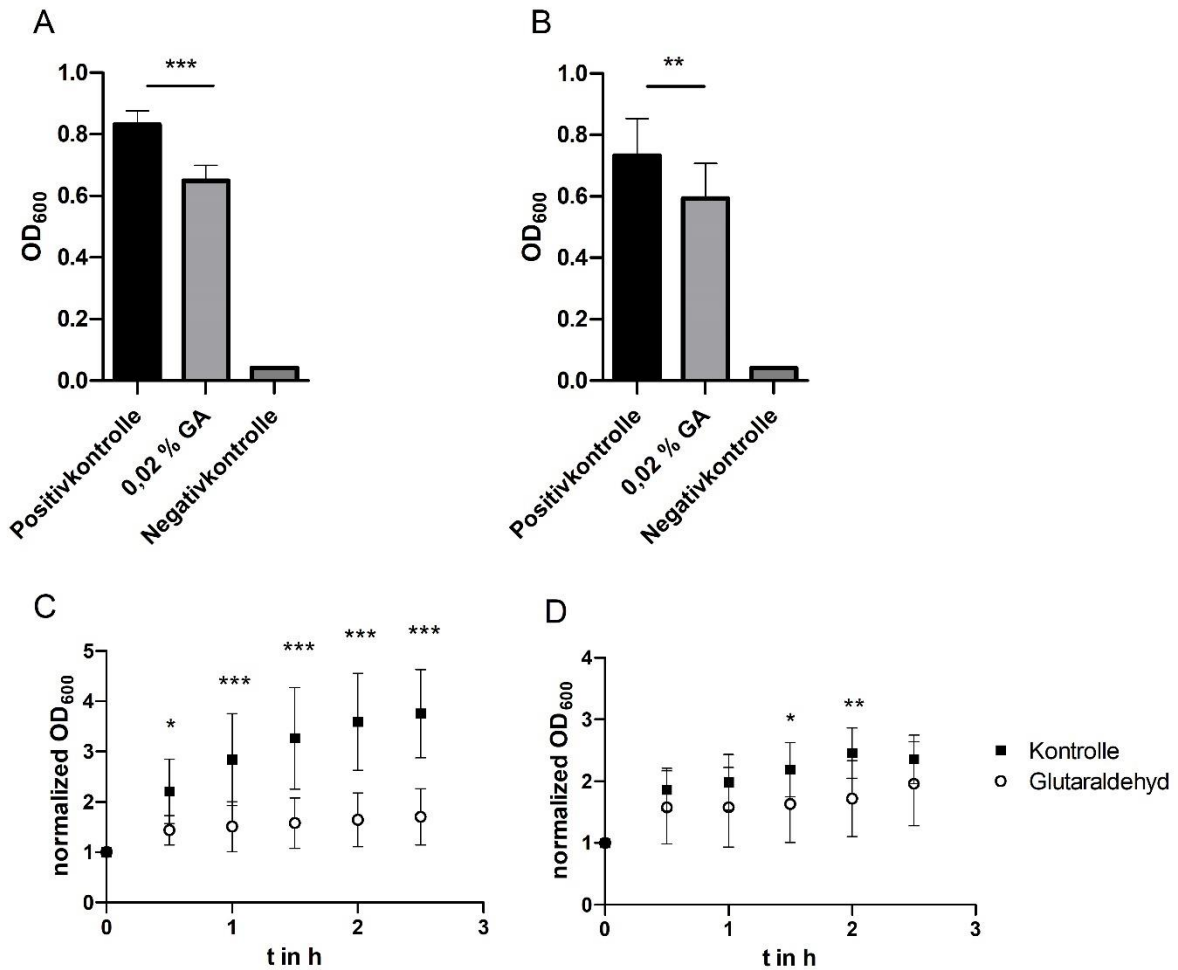


Abbildung 5. Effekt von Glutaraldehyd auf das Wachstum von *E. coli* und *S. epidermidis*. *E. coli* (A) und *S. epidermidis* (B) Zellen wurden für 20 h bei 37 °C in Mueller-Hinton II-Bouillon (Positivkontrolle); Mueller-Hinton II-Bouillon + 0,02 % GA oder Mueller-Hinton II-Bouillon + 0,4 % Peressigsäure (Negativkontrolle) inkubiert. Fehlerbalken sind Standardabweichung (SD) (n = 12 biologische Replikate). Die statistische Analyse wurde mittels einfacher Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. SD für negative Kontrollen < 0,0015. *E. coli* (C) und *S. epidermidis* (D) Zellen wurden für 20 h bei 37 °C in Mueller-Hinton II-Bouillon vorinkubiert. Danach wurde das Wachstumsmedium abgenommen und durch frische Mueller-Hinton II-Bouillon („Kontrolle“) oder Mueller-Hinton II-Bouillon + 0,02 % GA („Glutaraldehyd“) ersetzt. Die Zellen wurden für 2,5 h bei Raumtemperatur kultiviert. Fehlerbalken sind SD (n = 12 biologische Replikate). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; * entspricht p < 0.05; ** entspricht p < 0.01; *** entspricht p < 0.001. (Modifiziert nach Steffen et al., 2022, S. 118 [54])

3.5.2 Einfluss von EDTA auf das bakterielle Wachstum

E. coli (Abbildung 6 A) und *S. epidermidis* (Abbildung 6 B) wurden in Wachstumsmedium mit 0,2 M EDTA bei 37 °C kultiviert. Im Gegensatz zu den Experimenten mit dem Zusatz von Glutaraldehyd, zeigten hier beide Bakterienstämme kein Wachstum im Vergleich zu den Kontrollen in Medium ohne Zusätze. Das Wachstum, bestimmt durch die optische Dichte der Probe, entsprach dem der Negativkontrolle in Peressigsäure. Die Zugabe von EDTA zum Wachstumsmedium führte zu einer vollständigen Hemmung der bakteriellen Vermehrung.

Auch während der Inkubation von *E. coli* mit EDTA-Zusatz bei Raumtemperatur fand kein Wachstum statt (Abbildung 6 C). Die optische Dichte nahm zu keinem Zeitpunkt im Vergleich zum

Ausgangswert zu. Im Gegensatz dazu wuchs die Kontrolle in Mueller-Hinton II-Bouillon ohne weitere Zusätze stark. Auch hier wurden die Werte der optischen Dichte zur besseren Vergleichbarkeit auf den jeweiligen Ausgangswert normiert. Die Zellen der Kontrolle bei der Kultivierung von *S. epidermidis* zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie in dem Experiment mit Glutaraldehyd-Zusatz (Abbildung 6 D). Die Zellen mit EDTA-Zusatz zeigten am Messpunkt nach 30 min einen leichten Anstieg der optischen Dichte. Diese fällt jedoch im weiteren Verlauf des Experiments wieder auf den Ausgangswert zurück. Bei dieser Versuchsanordnung findet demnach kein Wachstum der beiden Bakterienstämme statt.

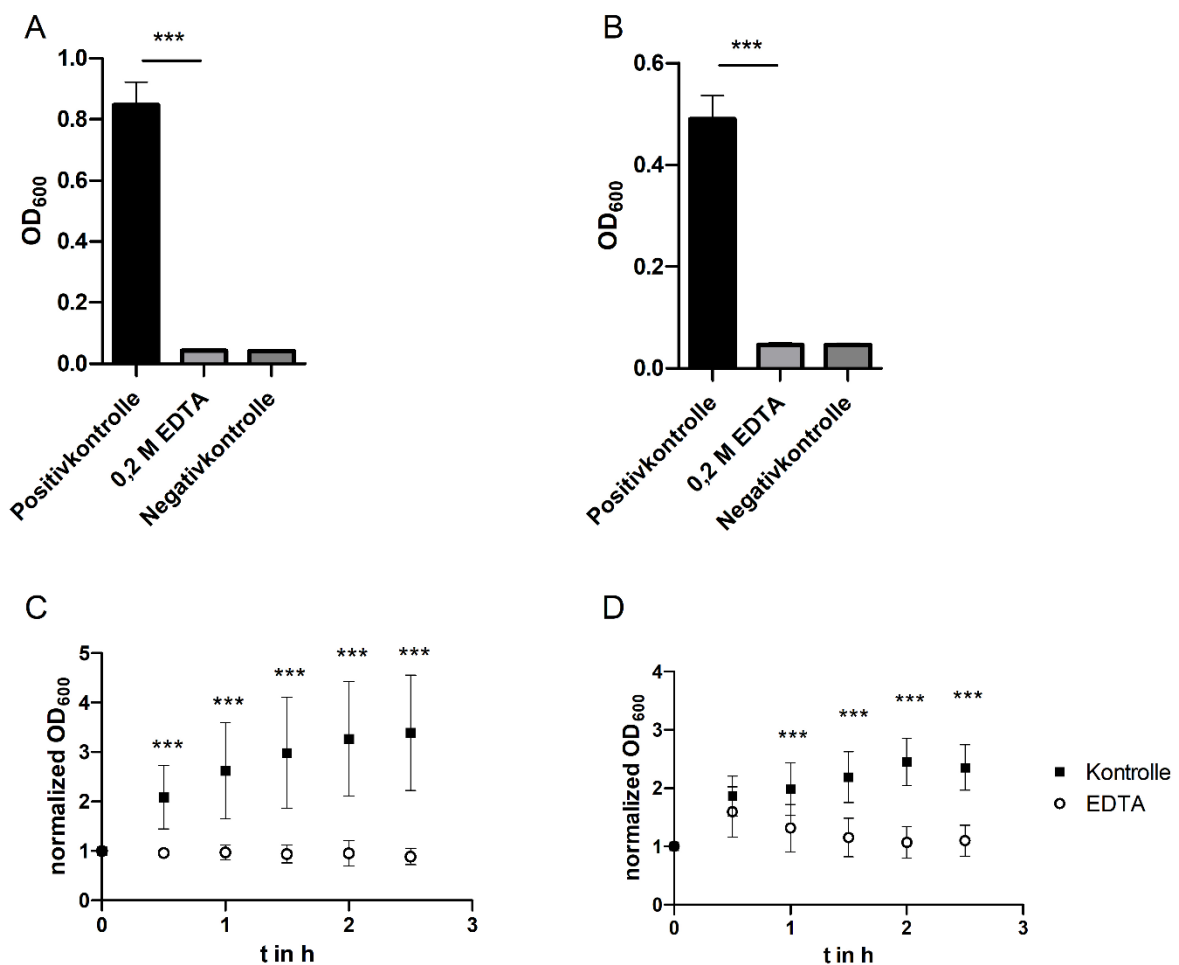


Abbildung 6. Effekt von EDTA auf das Wachstum von *E. coli* und *S. epidermidis*. *E. coli* (A) und *S. epidermidis* (B) Zellen wurden für 20 h bei 37 °C in Mueller-Hinton II-Bouillon (Positivkontrolle); Mueller-Hinton II-Bouillon + 0,2 M EDTA oder Mueller-Hinton II-Bouillon + 0,4 % Peressigsäure (Negativkontrolle) inkubiert. Fehlerbalken sind Standardabweichung (SD) (n = 12 biologische Replikate). Die statistische Analyse wurde mittels einfacher Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. SD für Negativkontrollen und 0,2 M EDTA < 0,005. *E. coli* (C) und *S. epidermidis* (D) Zellen wurden für 20 h bei 37 °C in Mueller-Hinton II-Bouillon vorinkubiert. Danach wurde das Wachstumsmedium abgenommen und durch frische Mueller-Hinton II-Bouillon („Kontrolle“) oder Mueller-Hinton II-Bouillon + 0,2 M EDTA („EDTA“) ersetzt. Die Zellen wurden für 2,5 h bei Raumtemperatur kultiviert. Fehlerbalken sind SD (n = 12 biologische Replikate). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; *** entspricht p < 0,001. (Modifiziert nach Steffen et al., 2022, S. 119 [54])

3.5.3 Kombination von GA und EDTA

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Experimenten, in denen die Wirkung von Glutaraldehyd und EDTA getrennt untersucht wurde, wurden in weiteren Versuchen beide Substanzen miteinander kombiniert. Es sollte untersucht werden, ob sich die Wirkung der beiden Substanzen gegenseitig aufheben oder verstärken kann. Die Konzentrationen von GA und EDTA entsprachen denen, die im HbMP- Herstellungsprozess verwendet werden. In diesen Versuchen konnte weder für *E. coli* noch *S. epidermidis* ein Wachstum nach Zugabe von GA und EDTA zum Medium beobachtet werden [54].

3.5.4 HbMP- Herstellung mit bakteriell kontaminiertem Hämoglobin

Die oben beschriebenen Versuche haben die hemmende Wirkung von Glutaraldehyd und EDTA auf das Wachstum von *E. coli* und *S. epidermidis* gezeigt, wenn die Substanzen dem Wachstumsmedium zugesetzt werden. Im Hinblick auf die Herstellung von HbMP ist es jedoch von besonderem Interesse, ob die bakterielle Kontamination auch während des Herstellungsprozesses entfernt werden kann. Um das Wachstum der beiden Bakterien während des HbMP-Produktionsprozesses zu untersuchen, wurde die ursprüngliche Hämoglobinlösung mit *E. coli*- bzw. *S. epidermidis*- Zellen versetzt und anschließend die Partikelproduktion durchgeführt (Abbildung 1) [54].

Nach jedem Produktionsschritt wurden Proben entnommen und überprüft, ob lebensfähige Bakterien vorhanden waren. Die Proben wurden zentrifugiert und die Bakterienanzahl in der gesamten Probensuspension (vor der Zentrifugation) sowie im Überstand (nach der Zentrifugation) untersucht (Abbildung 7).

Nach der Präzipitation war der größte Teil der ursprünglichen Zellzahl beider Bakterien noch in der Suspension vorhanden. Bei den Versuchen mit *E. coli* war ein geringer Anteil im Überstand der Probe nachweisbar (Abbildung 7, obere Reihe, Probe A). Dies bedeutet, dass sich ein großer Teil der Bakterien im Sediment, d. h. in der Partikelfraktion, befand. Nach dem ersten Waschschrift des Prozesses wurde die nachweisbare Bakterienzahl weiter auf etwa ein Viertel des Ausgangswertes reduziert. In dieser Versuchsreihe wurden die Proteine in den Partikeln nicht vernetzt, sondern die Carbonat-Templates wurden sofort mit EDTA aufgelöst, was zu keiner Partikelbildung führte (siehe Abbildung 1 - Probe A). Nach der Resuspension der Partikel in EDTA waren nur noch wenige der ursprünglich verwendeten Bakterien vorhanden.

Bei der Partikelpräparation mit Hämoglobin, das mit *S. epidermidis* versetzt war, waren die Ergebnisse ähnlich (Abbildung 7, untere Reihe, Probe A). Nach dem letzten Auflösungschrift mit EDTA enthielt die Probe jedoch noch etwa ein Viertel der ursprünglichen Anzahl lebensfähiger Bakterien. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Partikel vor dem Auflösen mit EDTA mit

Glutaraldehyd vernetzt. Dies entsprach dem eigentlichen HbMP-Produktionsprozess (Abbildung 1 - Probe B). Hier zeigte sich, dass nach der Vernetzung mit Glutaraldehyd keine lebensfähigen Bakterien der beiden Stämme nachweisbar waren (Abbildung 7 - Proben B).

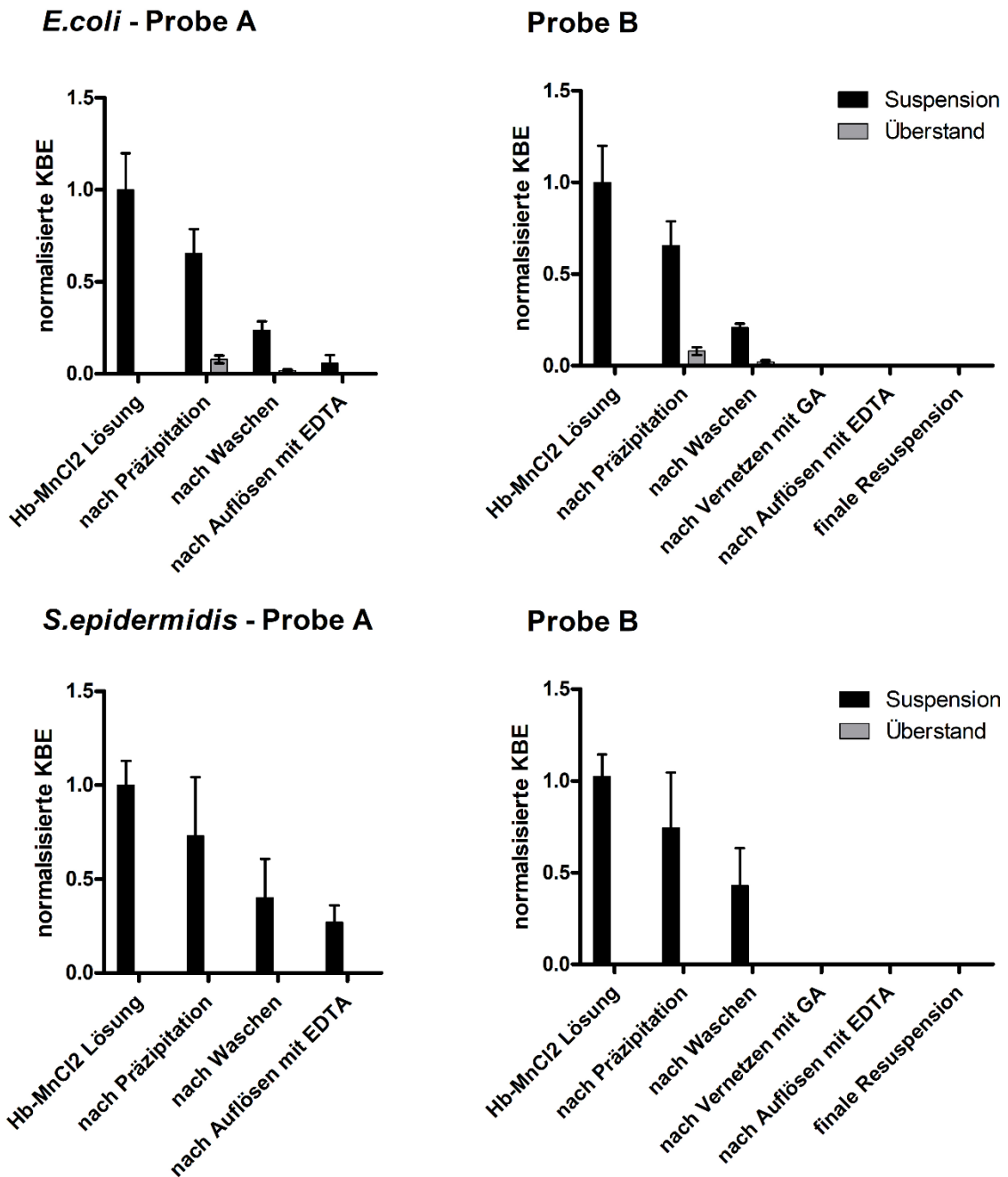


Abbildung 7. Partikelherstellung mit *E. coli* und *S. epidermidis*. Die Hb-MnCl₂ Lösung wurde mit *E. coli* (obere Reihe) oder *S. epidermidis* (untere Reihe) versetzt und mit Na₂CO₃ co-präzipitiert. Die entstandenen Partikel wurden mit NaCl gewaschen, und entweder wurde das Carbonat-Template direkt aufgelöst (Probe A) oder die Partikel wurden mit Glutaraldehyd vernetzt und erst anschließend mit EDTA aufgelöst (Probe B). An den entsprechenden Punkten des Produktionsprozesses wurden Proben des Überstandes und der Suspension genommen und darin die koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Fehlerbalken sind Standardabweichung, n=8 außer für „Hb-MnCl₂ Lösung“ (n = 4). (Modifiziert nach Steffen et al., 2022, S. 122 [54])

4 Diskussion

Es wurden Protein-Mikropartikel unter Verwendung der CCD-Technik hergestellt [17, 16]. Die Eigenschaften dieser Hb- bzw. BSA-Partikel auf Basis der Präzipitation mit MnCl_2 bzw. CaCl_2 mit Na_2CO_3 wurden untersucht. Mit den fertigen Hämoglobin-Mikropartikeln, die durch Präzipitation mit MnCl_2 und Na_2CO_3 (HbMP) hergestellt wurden, wurden erste prä-klinische Untersuchungen durchgeführt. Außerdem wurden Versuche als Teil des biologischen Sicherheitskonzeptes für die Herstellung der HbMP durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die im HbMP-Produktionsprozess verwendeten Chemikalien Glutaraldehyd und EDTA zu einer Abreicherung eventuell vorhandener Bakterien führen.

Es wurden große Unterschiede zwischen den MnCO_3 und CaCO_3 templierten Partikel beobachtet (Tabelle 3). Die Protein- CaCO_3 -Hybridpartikel mit 10 mg/mL BSA oder Hb zeigten eine wesentlich geringere Protein-Einschluss-Effizienz. Es wurden nur 16 % (Hb) bzw. 37 % (BSA) des Proteins in den Partikeln präzipitiert. Bei den Protein- MnCO_3 -Hybridpartikeln war die EE% mit 73 % (Hb) bzw. 67 % (BSA) wesentlich höher. Dieser Unterschied liegt wahrscheinlich darin begründet, dass Mn^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen unterschiedliche Bindungsfähigkeiten gegenüber Proteinen haben. Mn^{2+} -Ionen können stärker an Proteine binden als Ca^{2+} -Ionen. Die Bindungskonstante für die feste Bindung eines Albumin-Moleküls an ein Mn^{2+} -Ion beträgt $2,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, die für eine schwächere Bindung mit fünf Mn^{2+} -Ionen etwa $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [58]. Ein BSA-Molekül kann hingegen bis zu 12 Ca^{2+} -Ionen binden. Die Bindungskonstante ist dabei allerdings wesentlich schwächer und beträgt etwa $90 - 100 \text{ M}^{-1}$ [59].

Die CaCO_3 templierten Fertigpartikel hatten außerdem eine variable Größe von 2 bis 20 μm , abhängig von den Bedingungen bei der Präzipitation, besonders der Rührgeschwindigkeit. Je schneller die Lösungen während der Präzipitation gerührt wurden, desto kleiner war die Größe dieser Partikel [55]. Die mit MnCl_2 und Na_2CO_3 präzipitierten und fertig prozessierten Partikel waren hingegen kleiner ($< 1 \mu\text{m}$) bei einer engen Größenverteilung, unabhängig von der gewählten Rührgeschwindigkeit. Die mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmte Partikelgröße lag hier bei etwa 750 nm bei einer engen Größenverteilung und konnte auch mikroskopisch bestätigt werden (Abbildung 2). Außerdem zeigte sich bei diesen Partikeln eine erdnussartige Form und eine relativ glatte Oberfläche. Die Größe der HbMP liegt damit in dem bevorzugten Bereich von mehr als 100 nm (Vermeidung der Durchdringung der Lücken des Endothels durch die Partikel), aber weniger als 1 μm (Vermeidung erhöhter Phagozytose oder Behinderung der Mikrozirkulation) [28, 29].

Für die weiteren Untersuchungen wurden daher nur die Hämoglobin-Fertigpartikel verwendet, die mit Hb in MnCl_2 mit Na_2CO_3 präzipitiert, vernetzt und aufgelöst wurden (HbMP). Mit diesen Partikeln wurden auch Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Dabei sollte überprüft werden, ob

die Vernetzung mit 0,02 % GA ausreichend ist oder ob über die Lagerzeit Hämoglobin aus den Partikeln in den Überstand der HbMP-Suspensionen freigesetzt wird. Es zeigte sich, dass der Anteil an freiem Hämoglobin über die Lagerdauer von sechs Monaten konstant bei 1 - 1,5 mg/mL lag und damit in einem ähnlichen Bereich, der auch für freies Hämoglobin in Erythrozyten-Konzentraten erlaubt ist [60, 61]. Die HbMP sind in dieser Formulierung also für mindestens sechs Monate stabil. Eine höhere Konzentration von GA wurde nicht verwendet, da dies eine höhere Phagozytose-Rate der HbMP verursachte sowie zu einem erhöhten Gehalt an Methämoglobin führte [16].

Bei den Untersuchungen zur Sauerstoffaffinität der HbMP zeigte sich, dass diese bei den Partikeln etwa doppelt so hoch war wie die von freiem bovinem Hämoglobin (3.4.1). Der p50 der HbMP lag bei 10,17 mmHg (Hb: 23,33 mmHg). Die höhere Sauerstoffaffinität führt dazu, dass der transportierte Sauerstoff erst in unterversorgten Geweben abgegeben wird und vermindert eine vorzeitige Abgabe und damit eine Sauerstoffübersorgung in Geweben, die ausreichend mit Sauerstoff versorgt sind. Ein geringerer p50 - und damit eine höhere Sauerstoffaffinität - wird als vorteilhaft in der Entwicklung von hämoglobin-basierten Sauerstoffträgern angesehen [3]. Auch die Fließeigenschaften der HbMP zeigten sich in den Versuchen vielversprechend. Die Viskositäten von 40 % HbMP bei Scherraten von 1 bis 1000 s⁻¹ ähnelten denen von Vollblut (Tabelle 4). Beide Proben zeigten das für Blut typische scherverdünnende Verhalten. Weiterhin zeigten die HbMP bei der Inkubation mit Kardiomyozyten keine ROS-Aktivierung. Die oft mit freiem Hämoglobin bzw. Hämoglobin-basierten Sauerstoffträgern in Verbindung gebrachte Induzierung von oxidativem Stress, scheint für die HbMP nicht zutreffend zu sein [27]. Weitere durchgeführte in vitro und in vivo Tests zur Genotoxizität der Partikel zeigten, dass die HbMP bzw. der Überstand der HbMP-Suspension in diesen Untersuchungen nicht mutagen sind [57]. Zusammenfassend lieferten diese ersten prä-klinischen Untersuchungen also ermutigende Resultate, die für die weitere Entwicklung der HbMP wertvoll sind.

Glutaraldehyd wird in höheren Konzentrationen (2 % und höher) häufig als Biozid verwendet. Es dient hauptsächlich zur Desinfektion von Oberflächen oder medizinischen Instrumenten [62–64]. Bei der Herstellung der HbMP wird Glutaraldehyd in einer geringen Konzentration von 0,02 % dazu genutzt, die Hämoglobinmoleküle zu vernetzen. Diese Quervernetzung ist auch der Hauptgrund für die biozide Wirkung. Glutaraldehyd reagiert stark mit Proteinen und kann die DNA-Synthese in Bakterien hemmen, ähnliche Wirkungen werden auch bei der RNA- und Proteinsynthese beobachtet [65, 66]. Darüber hinaus wirkt Glutaraldehyd besonders auf die äußeren Schichten von *E. coli* und vernetzt auch dort Lipoproteine und Proteine. Diese Fixierung der Bakterien verhindert die Vermehrung der Bakterienzellen. Eine Permeabilisierung der Zellwand und ein Austritt von intrazellulärem Material findet dadurch nicht statt [67]. Ähnliche Effekte wurden auch für *S. epidermidis* nachgewiesen. Glutaraldehyd kann auch hier die

Bakterien abtöten, führt aber nicht zu einer Permeabilisierung der Zellwand [68, 69]. Diese Betrachtungen stehen im Einklang mit den hier durchgeführten Versuchen (Abbildung 5). Glutaraldehyd vermindert das Wachstum der Bakterien unter den betrachteten Bedingungen.

In den Wachstumsversuchen unter Zugabe von EDTA zeigte sich ein noch ausgeprägterer Effekt. Beide Bakterienstämme zeigten kein Wachstum verglichen mit den Zellen der Kontrolle (Abbildung 6). EDTA bindet als Chelatbildner zweiwertige Kationen. Insbesondere die Chelation von Mg^{2+} -Ionen führt zu einer Destabilisierung der negativen Ladungen der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien [66]. Die Zellen werden dadurch durchlässig. Dieser Effekt kann ausgenutzt werden, um die Zellen empfänglicher für Antibiotika, Biozide oder andere Substanzen zu machen [40, 70]. Je nach EDTA-Konzentration und Bakterienstamm kommt es zu einer Freisetzung von Membranbestandteilen, Proteinen und schließlich zur Lyse der Zelle [71–73]. Die Behandlung von gramnegativen Zellen mit EDTA kann zu einer Freisetzung von bis zu 50 % des LPS aus der Zellwand des Bakteriums führen [74, 75], was insbesondere für *E. coli* nachgewiesen wurde [41, 76]. EDTA kann jedoch auch bei grampositiven Bakterien zu einer Wachstumshemmung und Zelllyse führen [77, 78].

In weiteren Versuchsreihen zum Bakterienwachstum nach Zugabe einer Kombination von GA und EDTA kam es zu keinem Wachstum der Bakterien. Wenn beide Stoffe also in den Konzentrationen zum Wachstumsmedium gegeben werden, in denen sie im HbMP-Produktionsprozess verwendet werden, führen sie zu einer vollständigen Abreicherung der Bakterien.

In weiteren Experimenten wurden HbMP produziert, wobei das für die Präzipitation verwendete Hämoglobin mit Bakterien versetzt war. Es sollte überprüft werden, ob die verwendeten Chemikalien auch im Produktionsprozess zu einer Abreicherung der Bakterien führen (Abbildung 1). In diesen Versuchen konnten die oben beschriebenen Beobachtungen bestätigt werden. Die im CCD-Verfahren verwendeten Konzentrationen von GA und EDTA reichen aus, um die Hämoglobinmoleküle zu vernetzen und das Carbonat-Template aufzulösen. Außerdem waren am Ende des Partikelproduktionsprozesses keine lebensfähigen Bakterien mehr nachweisbar. Im obigen Experiment reichte die für das CCD-Verfahren optimierte EDTA-Konzentration allein allerdings nicht aus (ohne GA-Vernetzung), um alle Bakterien zu entfernen. EDTA bildet Chelatkomplexe mit Metallionen, die dadurch in einer Ringstruktur koordinativ gebunden werden. Die gebildeten Komplexe mit Manganionen sind stabiler als die mit Magnesiumionen gebildeten Komplexe [79]. Bei diesem Versuch ist zu beachten, dass das EDTA hier sowohl Manganionen aus dem Mangancarbonat-Template der Partikel als auch Magnesiumionen aus der Zellwand der Bakterien komplexiert. Ersteres führt zur Auflösung des Carbonat-Templates, während letzteres die bakterielle Vermehrung reduziert. Es ist möglich, dass die stärkere Bindung von EDTA an Manganionen dazu führt, dass nicht genügend EDTA zur ausreichenden, wachstumshemmenden

Komplexierung der Magnesiumionen in den Zellwänden der Bakterien vorhanden ist. Wurde jedoch der eigentliche Herstellungsprozess der HbMP durchgeführt, d. h. einschließlich der Vernetzung mit Glutaraldehyd, waren nach dem Vernetzungsschritt keine Bakterien mehr nachweisbar (Abbildung 7).

Somit kann die Verwendung von GA und EDTA zusammen mit den Wascheffekten während der Partikelherstellung ein Teil eines umfassenden biologischen Sicherheitskonzepts für die Herstellung von HbMP für die potenzielle Verwendung als künstlicher Sauerstoffträger und Blutersatz sein.

5 Literatur

1. Sen Gupta, A. *Shock (Augusta, Ga.)* **2019**, 52 (1S Suppl 1), 70–83. doi:10.1097/SHK.0000000000001009
2. Coll-Satue, C.; Bishnoi, S.; Chen, J.; Hosta-Rigau, L. *Biomaterials science* **2021**, 9 (4), 1135–1152. doi:10.1039/d0bm01767a
3. Winslow, R. M. *Vox sanguinis* **2006**, 91 (2), 102–110. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00789.x
4. Bäumlér, H.; Georgieva, R. *Biomacromolecules* **2010**, 11 (6), 1480–1487. doi:10.1021/bm1001125
5. Zhang, Y.; Chan, H. F.; Leong, K. W. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 (1), 104–120. doi:10.1016/j.addr.2012.10.003
6. Prapan, A.; Suwannasom, N.; Kloypan, C.; Chaiwaree, S.; Steffen, A.; Xiong, Y.; Kao, I.; Pruß, A.; Georgieva, R.; Bäumlér, H. *Coatings* **2019**, 9 (7), 454. doi:10.3390/coatings9070454
7. Suwannasom, N.; Smuda, K.; Kloypan, C.; Kaewprayoon, W.; Baisaeng, N.; Prapan, A.; Chaiwaree, S.; Georgieva, R.; Bäumlér, H. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2019**, 9 (3), 482. doi:10.3390/nano9030482
8. Chaiwaree, S.; Prapan, A.; Suwannasom, N.; Laporte, T.; Neumann, T.; Pruß, A.; Georgieva, R.; Bäumlér, H. *Pharmaceutics* **2020**, 12 (3), 224. doi:10.3390/pharmaceutics12030224
9. Sukhorukov, G. B.; Volodkin, D. V.; Günther, A. M.; Petrov, A. I.; Shenoy, D. B.; Möhwald, H. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14 (14), 2073–2081. doi:10.1039/B402617A
10. Yashchenok, A.; Parakhonskiy, B.; Donatan, S.; Kohler, D.; Skirtach, A.; Möhwald, H. *Journal of materials chemistry. B* **2013**, 1 (9), 1223–1228. doi:10.1039/c2tb00416j
11. Zhu, H.; Stein, E. W.; Lu, Z.; Lvov, Y. M.; McShane, M. J. *Chem. Mater.* **2005**, 17 (9), 2323–2328. doi:10.1021/cm048229r
12. Volodkin, D. *Advances in colloid and interface science* **2014**, 207, 306–324. doi:10.1016/j.cis.2014.04.001
13. Antipov, A. A.; Shchukin, D.; Fedutik, Y.; Petrov, A. I.; Sukhorukov, G. B.; Möhwald, H. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, 224 (1-3), 175–183. doi:10.1016/S0927-7757(03)00195-X
14. Petrov, A. I.; Volodkin, D. V.; Sukhorukov, G. B. *Biotechnol Progress* **2005**, 21 (3), 918–925. doi:10.1021/bp0495825
15. Bäumlér, H.; Xiong, Y.; Liu, Z. Z.; Patzak, A.; Georgieva, R. *Artificial organs* **2014**, 38 (8), 708–714. doi:10.1111/aor.12331
16. Xiong, Y.; Steffen, A.; Andreas, K.; Müller, S.; Sternberg, N.; Georgieva, R.; Bäumlér, H. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (10), 3292–3300. doi:10.1021/bm301085x
17. Xiong, Y.; Liu, Z. Z.; Georgieva, R.; Smuda, K.; Steffen, A.; Sendeski, M.; Voigt, A.; Patzak, A.; Bäumlér, H. *ACS nano* **2013**, 7 (9), 7454–7461. doi:10.1021/nn402073n

18. "Resolution No. 17 - Recognition of the Bovine Spongiform Encephalopathy Risk Status of Members". <https://www.oie.int/app/uploads/2021/05/a-r17-2021-bse.pdf> (accessed November 18, 2021).
19. "Freiheit von Tierseuchen - KVG". <https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/tiere/krankheiten/freiheiten/freiheit.html> (accessed November 18, 2021).
20. Baeumler, H.; Georgieva, R.; Bäuml, H. Micro-particles, blood-substitute and method for forming same. EP20070112474 20070713, Jul 13, 2007.
21. Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84* (24), 9265–9269. doi:10.1073/pnas.84.24.9265
22. Cabrales, P.; Sun, G.; Zhou, Y.; Harris, D. R.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M.; Palmer, A. F. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **2009**, *107* (5), 1548–1558. doi:10.1152/jappphysiol.00622.2009
23. Sakai, H.; Hara, H.; Yuasa, M.; Tsai, A. G.; Takeoka, S.; Tsuchida, E.; Intaglietta, M. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2000**, *279* (3), H908-15. doi:10.1152/ajpheart.2000.279.3.H908
24. Buehler, P. W.; D'Agnillo, F.; Schaer, D. J. *Trends in molecular medicine* **2010**, *16* (10), 447–457. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.006
25. Silverman, T. A.; Weiskopf, R. B. *Anesthesiology* **2009**, *111* (5), 946–963. doi:10.1097/ALN.0b013e3181ba3c2c
26. Alayash, A. I. *Trends in biotechnology* **2014**, *32* (4), 177–185. doi:10.1016/j.tibtech.2014.02.006
27. Rentsendorj, O.; Zhang, X.; Williams, M. C.; Buehler, P. W.; D'Agnillo, F. *Toxics* **2016**, *4* (1). doi:10.3390/toxics4010006
28. Champion, J. A.; Walker, A.; Mitragotri, S. *Pharmaceutical research* **2008**, *25* (8), 1815–1821. doi:10.1007/s11095-008-9562-y
29. Rudt, S.; Müller, R. H. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1993**, *1* (1), 31–39. doi:10.1016/0928-0987(93)90015-3
30. Mansouri, A. *The American Journal of the Medical Sciences* **1985**, *289* (5), 200–209. doi:10.1097/00000441-198505000-00004
31. WHITE, J. C.; BEAVER, G. H. *Journal of clinical pathology* **1954**, *7* (3), 175–200. doi:10.1136/jcp.7.3.175
32. Buehler, P. W.; Boykins, R. A.; Jia, Y.; Norris, S.; Freedberg, D. I.; Alayash, A. I. *Analytical chemistry* **2005**, *77* (11), 3466–3478. doi:10.1021/ac050064y
33. Habeeb, A.F.S.A.; Hiramoto, R. *Archives of biochemistry and biophysics* **1968**, *126* (1), 16–26. doi:10.1016/0003-9861(68)90554-7

34. Matei, A.; Puscas, C.; Patrascu, I.; Lehene, M.; Ziebro, J.; Scurtu, F.; Baia, M.; Porumb, D.; Totos, R.; Silaghi-Dumitrescu, R. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21* (9). doi:10.3390/ijms21093372
35. Ballantyne, B.; Jordan, S. L. *Journal of applied toxicology : JAT* **2001**, *21* (2), 131–151. doi:10.1002/jat.741
36. GORMAN, S. P.; Scott, E. M.; RUSSELL, A. D. *Journal of Applied Bacteriology* **1980**, *48* (2), 161–190. doi:10.1111/j.1365-2672.1980.tb01217.x
37. SABATINI, D. D.; BENSCH, K.; BARNETT, R. J. *The Journal of cell biology* **1963**, *17*, 19–58. doi:10.1083/jcb.17.1.19
38. RUSSELL, A. D.; Hopwood, D. The Biological Uses and Importance of Glutaraldehyde. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis, G. P., West, G. B., Eds.; Elsevier, 1976; pp 271–301.
39. Banfi, G.; Salvagno, G. L.; Lippi, G. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **2007**, *45* (5), 565–576. doi:10.1515/CCLM.2007.110
40. LEIVE, L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1965**, *53*, 745–750. doi:10.1073/pnas.53.4.745
41. Haque, H.; RUSSELL, A. D. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1974**, *5* (5), 447–452. doi:10.1128/aac.5.5.447
42. Root, J. L.; McIntyre, O. R.; Jacobs, N. J.; Daghljan, C. P. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1988**, *32* (11), 1627–1631. doi:10.1128/aac.32.11.1627
43. Gangan, M. S.; Athale, C. A. *Royal Society open science* **2017**, *4* (2), 160417. doi:10.1098/rsos.160417
44. Otto, M. *Nature reviews. Microbiology* **2009**, *7* (8), 555–567. doi:10.1038/nrmicro2182
45. Miragaia, M.; Thomas, J. C.; Couto, I.; Enright, M. C.; Lencastre, H. de. *Journal of Bacteriology* **2007**, *189* (6), 2540–2552. doi:10.1128/JB.01484-06
46. *Atlas of oral microbiology. From healthy microflora to disease*; Academic Press: London, UK, 2015.
47. Ramírez-Arcos, S.; Goldman, M. Bacterial Contamination. In *Practical transfusion medicine*, Fifth edition; Murphy, M. F., Roberts, D. J., Yazer, M. H., Eds.; John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, 2013; pp 168–175.
48. Levy, J. H.; Neal, M. D.; Herman, J. H. *Crit Care* **2018**, *22* (1), 271. doi:10.1186/s13054-018-2212-9
49. Stramer, S. L.; Dodd, R. Y. Transfusion-Transmitted Diseases. In *Hematology: Basic principles and practice*, 7th edition; Hoffman, R., Heslop, H., Weitz, J. I., Anastasi, J., Silberstein, L. E., Salama, M. E., Abutalib, S. A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, PA, 2018; 1803-1820.e2.
50. Wilson-Nieuwenhuis, J. S. T.; Dempsey-Hibbert, N.; Liauw, C. M.; Whitehead, K. A. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2017**, *160*, 126–135. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.019

51. Perrotta, P. L.; Snyder, E. L. Platelet Storage and Transfusion. In *Platelets*, 2nd ed.; Michelson, A. D., Ed.; Elsevier Science: Burlington, 2011; pp 1265–1295.
52. Haney, C. R.; Buehler, P. W.; Gulati, A. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *40* (3), 153–169. doi:10.1016/S0169-409X(99)00047-2
53. Palmer, A. F.; Sun, G.; Harris, D. R. *Biotechnol Progress* **2009**, *25* (1), 189–199. doi:10.1002/btpr.119
54. Steffen, A.; Xiong, Y.; Georgieva, R.; Kalus, U.; Bäumlner, H. *Beilstein J. Nanotechnol* **2022** (13), 114-126. doi:10.3762/bxiv.2021.81.v1
55. Xiong, Y.; Georgieva, R.; Steffen, A.; Smuda, K.; Bäumlner, H. *Journal of colloid and interface science* **2018**, *514*, 156–164. doi:10.1016/j.jcis.2017.12.030
56. Kloypan, C.; Prapan, A.; Suwannasom, N.; Chaiwaree, S.; Kaewprayoon, W.; Steffen, A.; Xiong, Y.; Baisaeng, N.; Georgieva, R.; Bäumlner, H. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2018**, *46* (sup3), S964-S972. doi:10.1080/21691401.2018.1521819
57. Kao, I.; Xiong, Y.; Steffen, A.; Smuda, K.; Zhao, L.; Georgieva, R.; Pruss, A.; Bäumlner, H. *Artificial organs* **2018**, *42* (5), 549–559. doi:10.1111/aor.13071
58. MILDVAN, A. S.; COHN, M. *Biochemistry* **1963**, *2*, 910–919. doi:10.1021/bi00905a003
59. Pedersen, K. O. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **1971**, *28* (4), 459–469. doi:10.3109/00365517109095724
60. Sawant, R. B.; Jathar, S. K.; Rajadhyaksha, S. B.; Kadam, P. T. *Asian journal of transfusion science* **2007**, *1* (2), 47–51. doi:10.4103/0973-6247.33446
61. Sowemimo-Coker, S. O. *Transfusion medicine reviews* **2002**, *16* (1), 46–60. doi:10.1053/tmrv.2002.29404
62. Maillard, J.-Y. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **2005**, *1* (4), 307–320.
63. RUSSELL, A. D. *The Journal of hospital infection* **1999**, *43*, S57-S68. doi:10.1016/s0195-6701(99)90066-x
64. McDonnell, G.; RUSSELL, A. D. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12* (1), 147–179.
65. McGucken, P. V.; Woodside, W. *Journal of Applied Bacteriology* **1973**, *36* (3), 419–426. doi:10.1111/j.1365-2672.1973.tb04123.x
66. Maillard, J.-Y. *Journal of Applied Microbiology* **2002**, *92*, 16S-27S. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x
67. Munton, T. J.; RUSSELL, A. D. *Journal of Applied Bacteriology* **1972**, *35* (2), 193–199. doi:10.1111/j.1365-2672.1972.tb03690.x
68. Hill, S. D.; Berry, C. W.; Seale, N. S.; Kaga, M. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **1991**, *71* (1), 89–95. doi:10.1016/0030-4220(91)90530-P
69. Davison, W. M.; Pitts, B.; Stewart, P. S. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2010**, *54* (7), 2920–2927. doi:10.1128/AAC.01734-09

70. Walsh, S. E.; Maillard, J.-Y.; RUSSELL, A. D.; Catrenich, C. E.; Charbonneau, D. L.; Bartolo, R. G. *Journal of Applied Microbiology* **2003**, *94* (2), 240–247. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x
71. Umerska, A.; Strandh, M.; Cassisa, V.; Matougui, N.; Eveillard, M.; Saulnier, P. *Biomolecules* **2018**, *8* (4). doi:10.3390/biom8040122
72. Schnaitman, C. A. *Journal of Bacteriology* **1971**, *108* (1), 553–563. doi:10.1128/JB.108.1.553-563.1971
73. Prachayasittikul, V.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Tantimongcolwat, T.; Nantasenamat, C.; Galla, H.-J. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2007**, *39* (11), 901–913. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00350.x
74. Leive, L. *Biochemical and biophysical research communications* **1965**, *21* (4), 290–296. doi:10.1016/0006-291x(65)90191-9
75. Levy, S. B.; LEIVE, L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1968**, *61* (4), 1435–1439. doi:10.1073/pnas.61.4.1435
76. Gray, G. W.; Wilkinson, S. G. *Journal of general microbiology* **1965**, *39* (3), 385–399. doi:10.1099/00221287-39-3-385
77. RUSSELL, A. D. *Journal of Applied Bacteriology* **1967**, *30* (2), 395–401. doi:10.1111/j.1365-2672.1967.tb00314.x
78. Chew, B. P.; Tjoelker, L. W.; Tanaka, T. S. *Journal of Dairy Science* **1985**, *68* (11), 3037–3046. doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)81199-1
79. Hart, J. R. Ethylenediaminetetraacetic Acid and Related Chelating Agents. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, 7. edition, release 2015; Wiley-VCH: Weinheim, Wiley online library, 2010.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Axel Steffen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Sicherheit von Hämoglobin-Mikropartikeln für deren Verwendung als künstliche Sauerstoffträger“/“ Studies on the safety of hemoglobin microparticles for their use as artificial oxygen carriers“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Axel Steffen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Steffen, A.; Xiong, Y.; Georgieva, R.; Kalus, U.; Bäuml. H., Bacterial safety study of the production process of hemoglobin-based oxygen carriers, Beilstein Journal of Nanotechnology, 2022, <https://doi.org/10.3762/bjnano.13.8>

IF: 3.649 (2020)

Beitrag im Einzelnen (bitte ausführlich ausführen):

70 %, Zusammenstellung aller für die Publikation relevanten Daten einschließlich deren Überprüfung und Bewertung. Teilweise Durchführung der Versuche (Ergebnisse in Abbildung 2 und 3). Datenanalyse und Interpretation zusammen mit den Co-Autoren. Das betrifft insbesondere die in den Abbildungen 1 bis 3 sowie 5 bis 7 dargestellten Ergebnisse. Erstellung des Publikationsmanuskripts.

Publikation 2: Xiong, Y.; Georgieva, R.; Steffen, A.; Smuda, K.; Bäuml. H., Structure and properties of hybrid biopolymer particles fabricated by coprecipitation cross-linking dissolution procedure, Journal of Colloid and Interface Science, 2018, 514, 156–164, doi:10.1016/j.jcis.2017.12.030

IF: 5.091 (2018)

Beitrag im Einzelnen (bitte ausführlich ausführen):

20 %, Gewinnung der Hämoglobinlösungen und Prüfung der Reinheit. Bestimmung der Partikelgrößen und Zeta Potentiale (Tab. 3).

Publikation 3: Kao, I.; Xiong, Y.; Steffen, A.; Smuda, K.; Zhao, L.; Georgieva, R.; Pruss, A.; Bäuml. H., Preclinical In Vitro Safety Investigations of Submicron Sized Hemoglobin Based Oxygen Carrier HbMP-700, Artificial organs, 2018, 42 (5), 549–559. doi:10.1111/aor.13071

IF: 2.379 (2018)

Beitrag im Einzelnen (bitte ausführlich ausführen):

10 %, Gewinnung der Hämoglobinlösungen und Prüfung der Reinheit. Beteiligung bei der Herstellung der Prüfmuster. Datenanalyse und Interpretation insbesondere der Experimente zu den Reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 4) zusammen mit den Co-Autoren.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1

Steffen, A.; Xiong, Y.; Georgieva, R.; Kalus, U.; Bäuml, H., Bacterial safety study of the production process of hemoglobin-based oxygen carriers, Beilstein Journal of Nanotechnology, 2022, 13, 114-126, <https://doi.org/10.3762/bjnano.13.8>

Seiten 35 - 47



Bacterial safety study of the production process of hemoglobin-based oxygen carriers

Axel Steffen¹, Yu Xiong¹, Radostina Georgieva^{1,2}, Ulrich Kalus¹ and Hans Bäuml^{1*}

Full Research Paper

Open Access

Address:

¹Institute of Transfusion Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany and ²Department of Medical Physics, Biophysics and Radiology, Faculty of Medicine, Trakia University, 6000 Stara Zagora, Bulgaria

Email:

Hans Bäuml^{*} - hans.baeumler@charite.de

* Corresponding author

Keywords:

bacterial safety; EDTA; glutaraldehyde; hemoglobin; microparticles

Beilstein J. Nanotechnol. **2022**, *13*, 114–126.

<https://doi.org/10.3762/bjnano.13.8>

Received: 23 November 2021

Accepted: 07 January 2022

Published: 24 January 2022

Associate Editor: J. Lahann

© 2022 Steffen et al.; licensee Beilstein-Institut.

License and terms: see end of document.

Abstract

Hemoglobin microparticles (HbMP) produced with a three-step procedure, including coprecipitation of hemoglobin with manganese carbonate, protein cross-linking, and dissolution of the carbonate template were shown to be suitable for application as artificial oxygen carriers. First preclinical safety investigations delivered promising results. Bacterial safety plays a decisive role during the production of HbMP. Therefore, the bioburden and endotoxin content of the starting materials (especially hemoglobin) and the final particle suspension are intensively tested. However, some bacteria may not be detected by standard tests due to low concentration. The aim of this study was to investigate how these bacteria would behave in the fabrication process. Biocidal effects are known for glutaraldehyde and for ethylenediaminetetraacetic acid, chemicals that are used in the fabrication process of HbMP. It was shown that both chemicals prevent bacterial growth at the concentrations used during HbMP fabrication. In addition, the particle production was carried out with hemoglobin solutions spiked with *Escherichia coli* or *Staphylococcus epidermidis*. No living bacteria could be detected in the final particle suspensions. Therefore, we conclude that the HbMP fabrication procedure is safe in respect of bacterial contamination.

Introduction

Artificial oxygen carriers used as red blood cell (RBC) substitutes have attracted particular attention in the last years. Many of the different approaches are using hemoglobin as a starting material to produce hemoglobin-based oxygen carriers

(HBOC). Thus, hemoglobin from human and animal (especially bovine) sources or recombinant hemoglobin is used, which can then be chemically modified, cross-linked, polymerized, or encapsulated by various methods [1-3]. We produce

biopolymer microparticles as HBOC with the simple coprecipitation–cross-linking–dissolution (CCD) technique while utilizing hemoglobin. Depending on the biopolymer used, there are also various other possible applications for these microparticles. For example, enzyme particles have been produced to be used as microreactors or biosensors [4]. This method can also represent a promising approach to the production of drug carriers by the precipitation of favorable biopolymers and corresponding surface modifications [5,6]. Thus, it was possible to immobilize vitamin B2 (riboflavin) in these particles together with human serum albumin (HSA). This resulted in a drug delivery system with good hemocompatibility and release of riboflavin over a prolonged period [7]. In addition, HSA microparticles could be loaded with doxorubicin, a cytostatic drug used in chemotherapy for cancer treatment. These particles showed higher efficacy in inhibiting metabolic activity in cell culture in comparison to free doxorubicin [8]. To be used as an artificial oxygen carrier, hemoglobin is isolated from bovine blood. Compared to human hemoglobin, it is available in large quantities and free of human pathogens. A comprehensive concept for the biosafety of the bovine hemoglobin as a pharmaceutical starting material has been developed considering the recommendations from the local authorities (Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Germany). Among other things, the focus is on the origin and traceability of bovine blood back to the individual animal. It is derived in Tyrol, Austria, an area that is free from bovine spongiform encephalopathy (BSE) according to the World Organization for Animal Health (OIE) [9]. In addition, the animals are declared fit for human consumption after a post-mortem inspection. In the geographical area where the blood is collected, many critical viral pathogens do not occur [10]. Nevertheless, the blood is tested for viral contamination. In terms of bacterial safety, the blood and the hemoglobin obtained from it are tested for bacterial load. In addition, the hemoglobin is tested for endotoxins before its use as a starting material. Only if all specifications are met, the hemoglobin is used for the fabrication of hemoglobin microparticles (HbMP) by the means of the CCD technique [11,12]. During the first step (i.e., coprecipitation) two salt solutions and hemoglobin are mixed. A salt template is created in which hemoglobin is trapped. In the next main step (i.e., cross-linking) the individual hemoglobin molecules are polymerized in the salt template. The third step is dissolution. Dissolving of the salt template by adding ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) results in submicrometer hemoglobin particles. The resulting particles have an advantageous oxygen affinity and show a narrow size distribution of approx. 700 nm. In the first pre-clinical investigations it was shown that HbMP meet the requirements as a novel artificial oxygen carrier for application as a blood substitute and are considered nonmutagenic by different *in vitro* and *in vivo* studies [13].

Although all substances used to produce HbMP are either of pharmaceutical grade or approved drugs (HSA), except for hemoglobin, the sterility of the final product is not guaranteed. Terminal sterilization of hemoglobin as well as particle suspension with standard methods of heat inactivation, UV-C irradiation, or gamma irradiation all led to a denaturation of the hemoglobin or to an enormous formation of methemoglobin due to the oxidation of iron in the heme group. Methemoglobin is not able to release oxygen [14,15]. It is, therefore, not suitable for the use in the production of HbMP applied as an artificial oxygen carrier. Since the aforementioned sterilization methods cannot be used, the solution to obtain sterile hemoglobin is to sterile filter it after production and test it for endotoxin content and bioburden. This way, bacterial contamination is relatively unlikely. Nevertheless, it is conceivable that a minimal amount of bacteria will not be detected by the tests. In this case, it would be advantageous if any additional bacterial depletion could be achieved by steps in the production process. In comparison with the manufacturing of human blood products, it should be noted that the starting materials can be tested or are declared by the manufacturer to be sterile or endotoxin-free. The subsequent manufacturing process for human blood products is so safe that random testing of the products is sufficient. By adopting this principle, each batch is tested, but not every single product.

Endotoxins or the lipopolysaccharide (LPS) of the outer membrane of Gram-negative bacteria is another important point regarding safety. Endotoxins could potentially be introduced into the production process by the starting substances. Also, the depletion of any bacteria potentially present in the process could also cause the LPS to be released. One *Escherichia coli* cell has approximately 10–50 fg of LPS [16,17]. One endotoxin unit (EU) corresponds to 100 pg of *E.coli* LPS or a bacterial count in the range of 10^4 cells/mL [18,19]. According to the US and European Pharmacopoeia, the endotoxin limit for intravenous administration of a drug is 5 EU/kg. Taking an example of a hypothetical human body of 70 kg, this leads to a dose of 350 EU per administration. If one wants to administer a quantity of 250 mL of HbMP, the suspension must not contain more than 1.4 EU/mL, for an administration of 500 mL, which corresponds to 0.7 EU/mL. Our limit for endotoxin load is 0.5 EU/mL and this limit is tested before the release of the product.

The production process includes several washing steps that could contribute to the depletion of a potential bacterial load. Glutaraldehyde (GA) is used for the inter- and, to a certain extent, intramolecular cross-linking of the hemoglobin molecules at a concentration of 0.02% [20,21]. It is known to have an antibacterial effect and it is used as a disinfectant or for cold

sterilization of medical instruments in hospitals at higher concentrations [22–24]. Glutaraldehyde is also widely used in biochemical applications and as a fixative for electron microscopy [25,26].

EDTA is used in the HbMP fabrication process to dissolve the manganese carbonate template to produce pure protein particles. EDTA is widely utilized in medical and biological applications. Because of its chelating properties, it is used as an anticoagulant in blood samples [27]. It has also long been used to permeabilize the cell wall of Gram-negative cells [28,29]. A certain inhibitory effect of EDTA on the growth of *Staphylococcus epidermidis* could also be shown [30].

Therefore, the aim of this work was to investigate whether the steps of cross-linking with GA or dissolution with EDTA, in addition to the washing steps in the particle production process, can contribute to the reduction of a potential contamination with Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* were selected as model organisms for this purpose. Both bacteria have been intensively studied. *E. coli* is mainly found in the intestines of humans and animals, is Gram-negative, and has an approximate length of 2 μm with a diameter of 1 μm and a cylindrical shape [31]. *S. epidermidis* lives on human skin but is also frequently responsible for infections of immunocompromised patients in hospitals [32,33]. This Gram-positive bacterium has a spherical shape and a diameter of 0.5–1.5 μm [34]. In addition, both bacteria play a role in adverse transfusion reactions [35]. Due to storage conditions at room temperature, mainly platelet concentrates are affected [36,37]. Here, contamination with *S. epidermidis* occurs in particular due to the colonization of the skin and inadequate disinfection of the puncture site during blood donation [38,39]. As a result, bacterial contamination that is not detected by testing could occur during the preparation of blood products as well as during the production of HbMP.

To investigate the possible inhibitory effects of the chemicals used in the CCD process, we assessed the growth of bacteria upon the addition of GA and EDTA to the growth medium. In addition, HbMP fabricated with bacteria-spiked hemoglobin were produced and the bacterial load was examined at every step of the particle production process.

Results and Discussion

Various tests were carried out to find out whether any possible bacterial contamination was removed during the HbMP production process. For this purpose, the influence of the chemicals glutaraldehyde and EDTA on Gram-negative and Gram-positive bacteria was investigated in preliminary experiments. Glutaraldehyde is used in the HbMP manufacturing process to

cross-link proteins. EDTA is used to dissolve the carbonate template.

In order to check whether glutaraldehyde and EDTA have an influence on the bacterial safety of HbMP, growth tests were first carried out with Gram-positive and Gram-negative bacterial cultures in the presence of these substances. The model organism *Escherichia coli* was chosen as a representative of Gram-negative bacteria, and *Staphylococcus epidermidis* served as an example of a Gram-positive bacterium.

Additionally, HbMP were prepared with a spiked hemoglobin solution as well as under standard process conditions as a control.

Hemoglobin microparticles – size, zeta potential, morphology

In addition to particle preparation with spiked hemoglobin, particles were also prepared using the standard protocol. The CCD method produces nearly uniform, peanut-shaped particles. The size distribution determined by dynamic light scattering (DLS) was 759 ± 25 nm. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images confirmed this size range (Figure 1C). Scanning electron microscopy (SEM) images of particles produced with the CCD method after precipitation, as well as after cross-linking, dissolution, and final washing steps are shown in Figure 1.

The zeta potential of HbMP in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, was -8.51 ± 0.9 mV. The zeta potential in PBS, pH 7.0, of *E. coli* was -16 mV, that of *S. epidermidis*, -8 mV [40]. Thus, both the HbMP and the bacteria showed a negative zeta potential and strong aggregation due to different charges seems unlikely. In the CCD process there are some centrifugation steps in the preparation of the HbMP. After centrifugation, both the particles and the majority of the bacteria were found in the fraction of the sediment.

Influence of glutaraldehyde on bacterial growth

E. coli cells cultivated with 0.02% glutaraldehyde at 37 °C showed a significantly reduced growth compared to the control group in normal growth medium (Figure 2A). However, the growth of bacteria was stronger than that in the negative control with peracetic acid. This means that the multiplication of bacteria still occurred to some degree. Glutaraldehyde inhibits viable functions so that the bacteria are subsequently unable to proliferate, but it also fixes the cell wall components. Thus, the cells are not lysed. The presence of bacteria was detected in the experiments by determining the optical density. The fixed but dead cells thus explain the higher signal compared to the negative control. The cultivation of *S. epidermidis* with glutaraldehyde

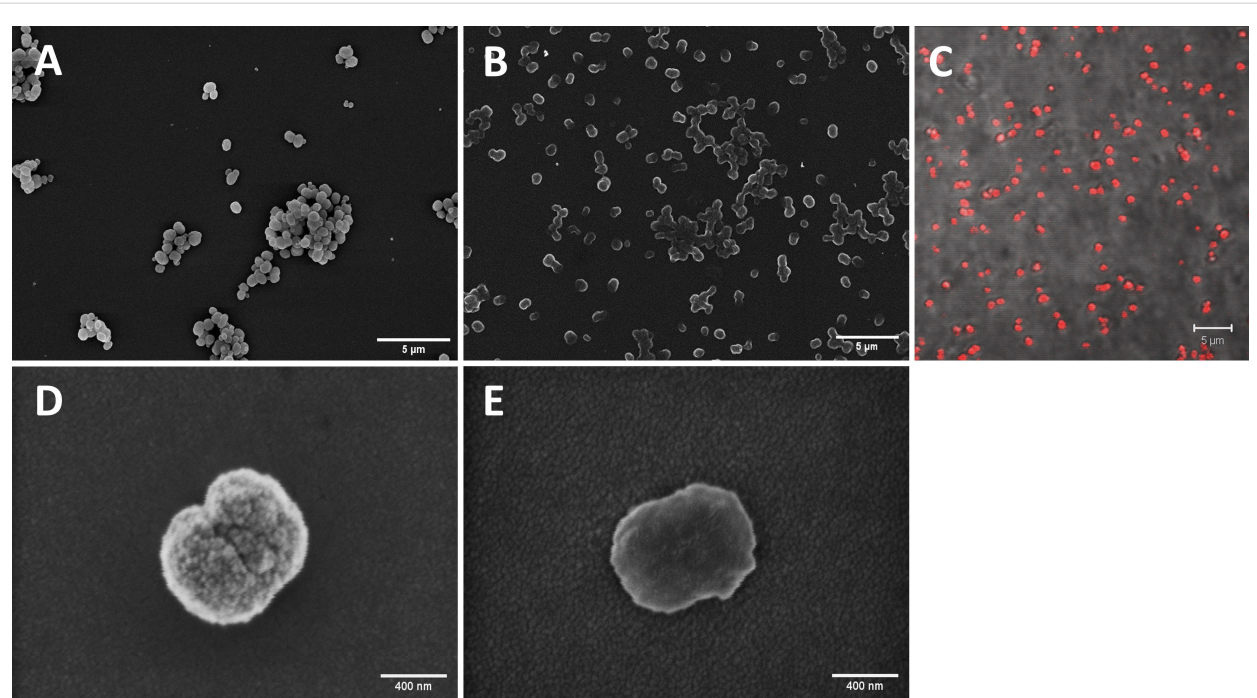


Figure 1: Microscopic images of HbMP. (A, D) SEM images of dried and adherent particles after precipitation with carbonate template. (B, E) SEM images of dried and adherent final HbMP after precipitation, cross-linking, dissolution, and washing. (C) CLSM image with autofluorescent HbMP in suspension. Scale bars: A, B, C = 5 μm , D, E = 400 nm.

hyde at 37 °C delivered similar results (Figure 2B). Glutaraldehyde significantly inhibits the proliferation of bacteria under the given conditions.

During cultivation of *E. coli* with the addition of glutaraldehyde at room temperature, there were also significant differences in growth rates compared to the control (Figure 2C). After a small increase in the optical density after the measurement point at 30 min, there was no further growth of the cells. In contrast, the cells in the control group (in normal growth medium) continued to strongly grow over the course of the experiment. For better comparability, the optical density values here were normalized to the respective initial value. A similar, albeit not as pronounced, scenario emerged when *S. epidermidis* was cultivated at room temperature (Figure 2D). Here too, the optical density increased after the measuring point at 30 min, almost to the range of the control. However, it subsequently remained at this level while the control cells continued to grow. The smaller difference between the control group and cells cultured with glutaraldehyde compared to the *E. coli* growth curves could also be due to the longer generation time of *S. epidermidis*.

Glutaraldehyde in higher concentrations is widely used as a biocide. It is mainly applied to disinfect surfaces or medical instruments [41–43]. Glutaraldehyde is applied in the manufac-

turing process of HbMP to cross-link hemoglobin molecules. This cross-linking is also the main reason for the biocidal effect. Glutaraldehyde strongly reacts with proteins and can inhibit DNA synthesis in bacteria, and similar effects are also seen on RNA and protein syntheses [44,45]. In addition, glutaraldehyde particularly acts on the outer layers of *E. coli* and cross-links lipoproteins and proteins there as well. This fixation of bacteria prevents the bacterial cells from multiplying. Permeabilization of the cell wall and leakage of intracellular material thereby do not take place [46]. Similar effects have also been shown for *S. epidermidis*. Glutaraldehyde can also kill the bacteria in this case but does not permeabilize the cell wall [47,48]. In the manufacturing process of HbMP, a GA concentration of 0.02% was used. A study of stability testing was carried out to confirm that this GA concentration was sufficient for the production of HbMP. Three batches of HbMP (20% (v/v) particle concentration, hemoglobin content: 24.5 ± 1.2 mg/mL) were aliquoted (10 mL) and stored at 2–8 °C. Every month an aliquot per batch was analyzed for the amount of released hemoglobin. As shown in Figure 3, the concentration of free hemoglobin remained almost constant over the measurement period in the range of 1 to 1.5 mg/mL and, thus, in a similar range as the amount of free hemoglobin allowed for erythrocyte concentrates during their storage period [49,50]. No additional release of hemoglobin was observed; therefore, the particles prepared with 0.02% GA are stable for at least six months. A higher concen-

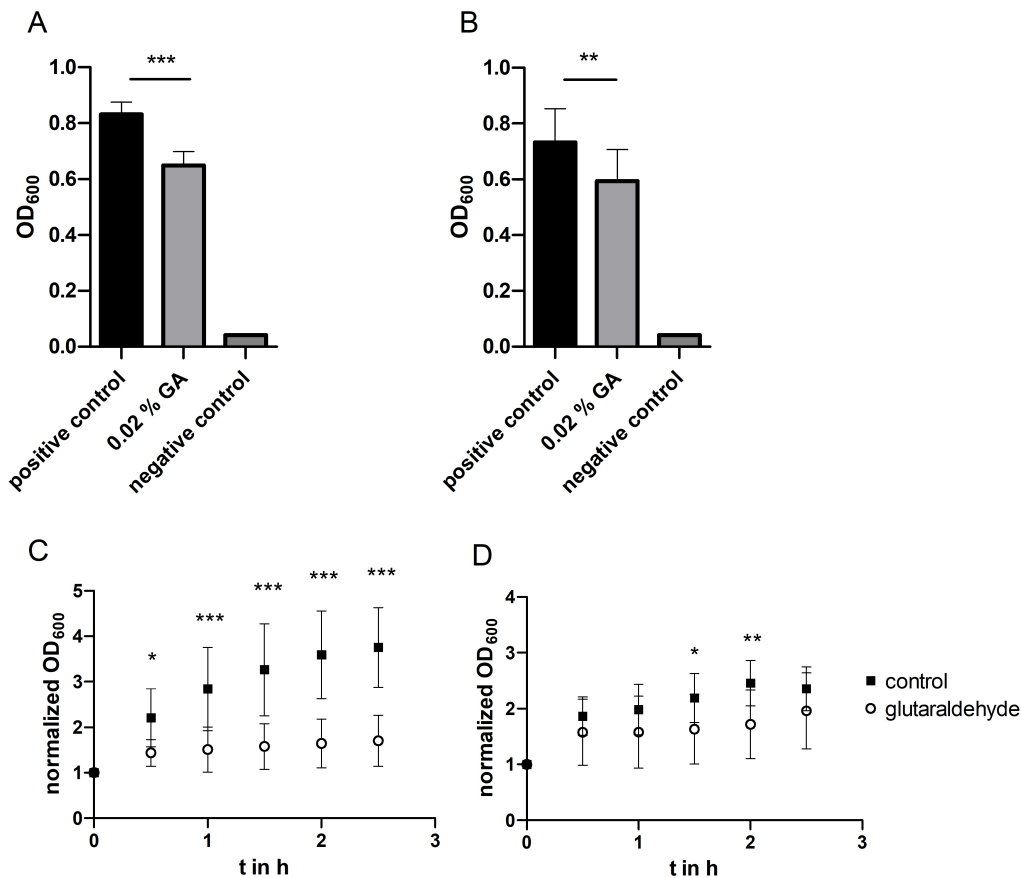


Figure 2: Effect of glutaraldehyde on bacterial growth of *E. coli* and *S. epidermidis*. *E. coli* (A) and *S. epidermidis* (B) cells were incubated for 20 h at 37 °C in Mueller–Hinton II Bouillon (positive control), Mueller–Hinton II Bouillon + 0.02% GA, or Mueller–Hinton II Bouillon + 0.4% peracetic acid (negative control). Error bars represent standard deviation (SD, $n = 12$ biological replicates). The statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, SD for negative controls < 0.0015 . *E. coli* (C) and *S. epidermidis* (D) cells were preincubated for 20 h at 37 °C in Mueller–Hinton II Bouillon. Afterwards the growth medium was removed and replaced with fresh Mueller–Hinton II Bouillon ("control") or Mueller–Hinton II Bouillon + 0.02% GA ("glutaraldehyde"). Cells were grown for 2.5 h at room temperature. Error bars are SD ($n = 12$ biological replicates). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test; * corresponds to $p < 0.05$; ** corresponds to $p < 0.01$; *** corresponds to $p < 0.001$.

tration of GA was not used in the particle fabrication process since it caused a higher phagocytosis rate of HbMP and led to an increased amount of methemoglobin [51].

Effect of EDTA on bacterial growth

E. coli (Figure 4A) and *S. epidermidis* (Figure 4B) were cultivated in growth medium containing 0.2 M of EDTA at 37 °C. In contrast to the experiments in which glutaraldehyde was added, here both bacterial strains showed no growth compared to controls in media without additives. The bacterial growth, as determined by the optical density of the sample, was equivalent to that of the negative control in peracetic acid. The addition of EDTA to the growth medium led to a complete inhibition of bacterial proliferation.

There was also no growth during incubation of *E. coli* upon addition of EDTA at room temperature (Figure 4C). The optical

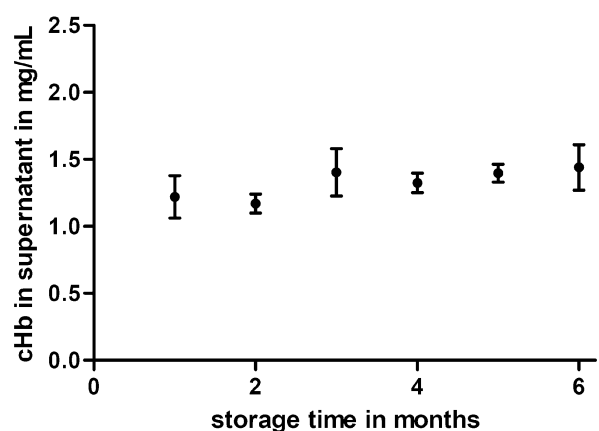


Figure 3: Concentration of free hemoglobin in the supernatant of HbMP suspensions. Measuring points are means with SD from three batches of HbMP.

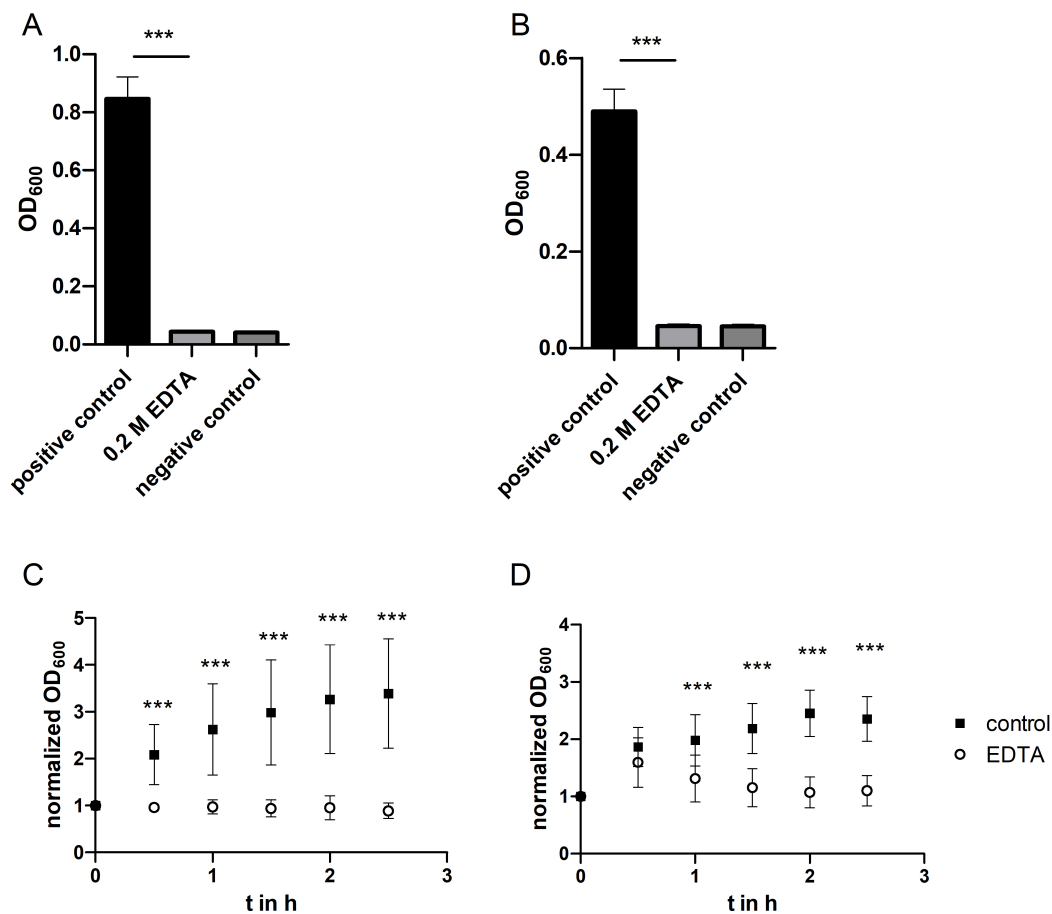


Figure 4: Effect of EDTA on bacterial growth of *E. coli* and *S. epidermidis*. *E. coli* (A) and *S. epidermidis* (B) cells were incubated for 20 h at 37 °C in Mueller–Hinton II Bouillon (positive control), Mueller–Hinton II Bouillon + 0.2 M EDTA, or Mueller–Hinton II Bouillon + 0.4% peracetic acid (negative control). Error bars are SD ($n = 12$ biological replicates). SD for negative controls and 0.2 M EDTA < 0.005 . *E. coli* (C) and *S. epidermidis* (D) cells were preincubated for 20 h at 37 °C in Mueller–Hinton II Bouillon. Afterwards, the growth medium was removed and replaced with fresh Mueller–Hinton II Bouillon (“control”) or Mueller–Hinton II Bouillon + 0.2 M EDTA (“EDTA”). Cells were grown for 2.5 h at room temperature. Error bars are SD ($n = 12$ biological replicates). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA Bonferroni’s multiple comparison test; *** corresponds to $p < 0.001$.

density did not increase at any time point compared to the initial value. In contrast, the bacteria in the control group, in normal medium, grew strongly. Again, optical density values were normalized to the respective initial value for better comparability. The *S. epidermidis* cells of the control group showed a similar growth behavior as in the experimental group with glutaraldehyde addition (Figure 4D). The cells incubated with EDTA showed some increase in optical density at the measurement point after 30 min. However, this drops back to the initial value in the further course of the experiment. Thus, there is no growth of either bacterial strains in this experimental arrangement.

EDTA as a chelating agent is known to bind divalent cations. Especially the chelation of Mg^{2+} results in a destabilization of the negative charges of the outer membrane of Gram-negative

bacteria [45]. The cells thus become permeable. This effect can be exploited to make the cells more receptive to antibiotics, biocides, or other substances [28,52]. Depending on the concentration of EDTA and the bacterial strain, there is a release of membrane components, proteins, and finally cell lysis [53–55]. The treatment of Gram-negative cells with EDTA can lead to a release of up to 50% of the LPS from the cell wall of a bacterium [56,57]. These effects have been demonstrated for Gram-negative bacteria, especially *E. coli* [29,58]. However, EDTA can also lead to inhibition of growth and cell lysis in Gram-positive bacteria [59,60].

In the study presented here, EDTA is used to dissolve the carbonate template during particle preparation at a concentration of 0.2 M. The results of our experiments (Figure 4) are in agreement with the abovementioned literature.

Combination of glutaraldehyde and EDTA according to the particle preparation routine

In addition to the experiments described above, in which the effect of glutaraldehyde and EDTA was separately examined, both substances were combined with one another in further experiments. It should be investigated whether the effect of the two substances can cancel or strengthen each other. The concentrations of GA and EDTA corresponded to those used in the fabrication process. The results are shown in Figure 5.

When *E. coli* bacteria were cultured with the addition of EDTA and GA at room temperature for 1 h, there was no increase in optical density and thus no growth of bacteria (Figure 5A). In contrast, control cells grew normally. In the corresponding growth experiments with *S. epidermidis*, there was also no increase in optical density after addition of EDTA and GA (Figure 5B). The cells of the control group did not grow as much here, but the differences in growth were significant during the experiment compared to the cells cultured with additives.

There was also no detectable growth of *E. coli* after the addition of EDTA and GA and cultivation at 37 °C (Figure 5C). The optical density remained almost constant during the experiment compared to the initial value. The control cells grew strongly, so there were significant differences in growth at each measurement time point in this experiment. When culturing *S. epidermidis* after the addition of EDTA and GA, no growth was seen either. However, again, the control cells did not grow as much. Nevertheless, at the end of the experiment, the difference in growth compared to the control was significant (Figure 5D).

These experiments also confirm the growth-inhibiting effect of EDTA and GA, also in combination, in the concentrations used in the HbMP manufacturing process routine.

Particle preparation with the addition of bacteria

The experiments described above have shown the inhibitory effect of glutaraldehyde and EDTA on the growth of *E. coli* and

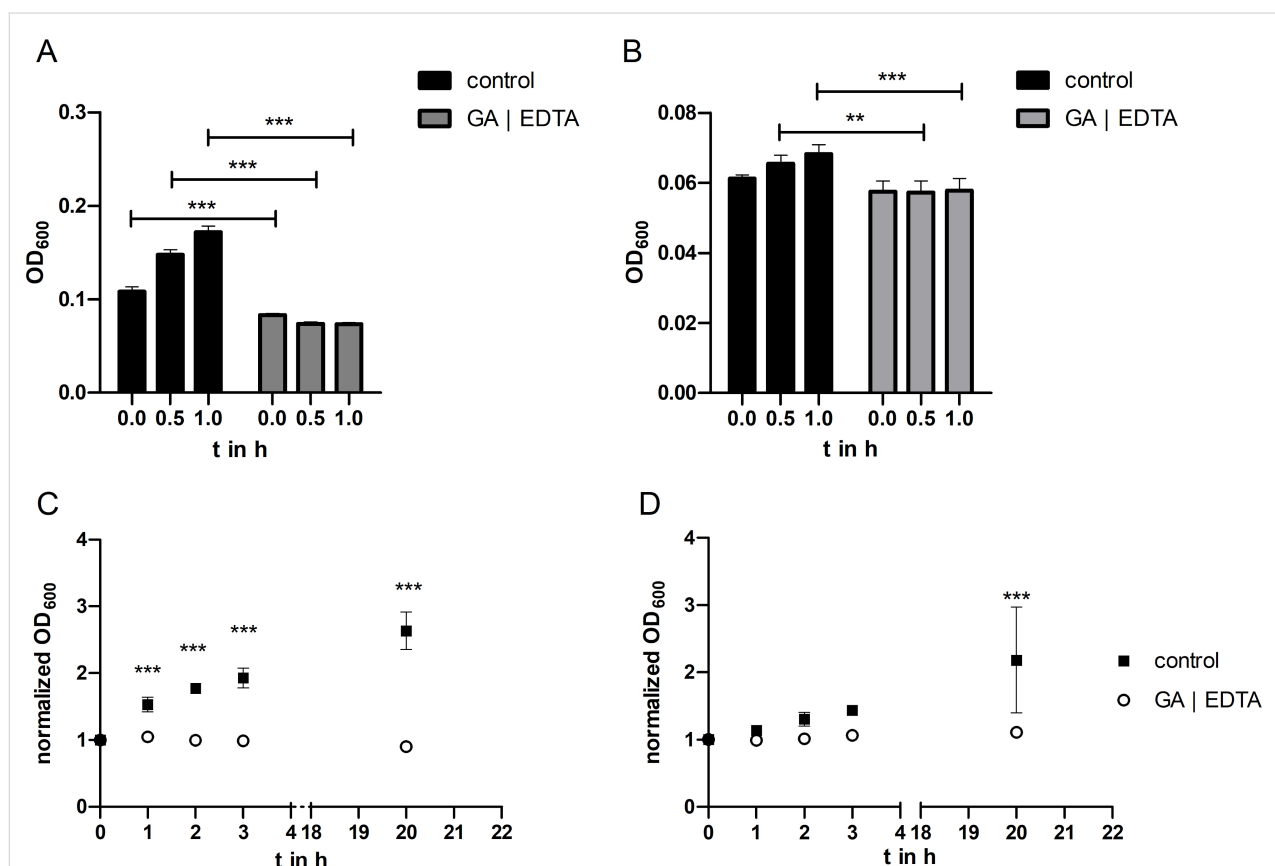


Figure 5: Effect of a combination of glutaraldehyde and EDTA on *E. coli* and *S. epidermidis*. *E. coli* (A) and *S. epidermidis* (B) cells were grown in Mueller–Hinton II Bouillon (“control”) and Mueller–Hinton II Bouillon supplemented with 0.02% glutaraldehyde and 0.2 M EDTA (“GA | EDTA”) for one hour at room temperature. SD for GA | EDTA in (A) is 0.005. (C, D) Cells grown as described in (A) and (B) were subsequently incubated at 37 °C for 20 h. Error bars are SD ($n = 4$ biological replicates). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA with Bonferroni’s multiple comparison test; ** corresponds to $p < 0.01$; *** corresponds to $p < 0.001$.

S. epidermidis when the substances were added to the growth medium. Regarding the production of HbMP, however, it is of particular interest whether bacterial contamination can also be removed during the production process. To investigate the growth of both bacteria during the HbMP production process, the initial hemoglobin solution was spiked with *E. coli* and *S. epidermidis*, respectively, and particle production was performed (Figure 6).

The samples were taken after each production step and checked to see if viable bacteria were still present. The samples were centrifuged and the amount of bacteria in the total sample suspension (before centrifugation) as well as in the supernatant (after centrifugation) was examined (Figure 7).

After precipitation, most of the original bacterial count of both bacterial strains was still present in the suspension. In the experiment with *E. coli*, a small proportion was detectable in the supernatant of the sample (Figure 7, upper row, sample A). This means that a large part of the bacteria was in the sediment (i.e., in the particle fraction). After the first washing step in the process, the detectable bacterial count was further reduced to about one quarter of the initial value. In this series of experiments, the proteins in the particles were not cross-linked, but the carbonate templates were immediately dissolved with EDTA resulting in no particle formation (see Figure 6 – sample A). After resuspension of the particles in EDTA, only a

few of the originally used bacteria were still present. The results were similar for particle preparation with hemoglobin spiked with *S. epidermidis* (Figure 7, lower row, sample A). However, after the final dissolution step with EDTA, the sample still contained about a quarter of the initial number of viable bacteria. In another series of experiments, the particles were cross-linked with glutaraldehyde before dissolution with EDTA. This corresponded to the actual HbMP production process (Figure 6 – sample B). Here it could be seen that after cross-linking with glutaraldehyde, no viable bacteria of either strain were detectable (Figure 7 – samples B).

In these experiments, the above observations could be confirmed. The concentrations of GA and EDTA used in the CCD process were sufficient to cross-link the hemoglobin molecules and dissolve the carbonate template. Furthermore, both chemicals resulted in no detectable viable bacteria at the end of the particle production process. In the above experiment, the EDTA concentration optimized for the CCD process alone was not sufficient to remove all bacteria from the solution without cross-linking the particles with GA. EDTA forms chelate complexes with metal ions, which are thereby incorporated into a ring structure. The formed complexes with manganese ions are stronger than the complexes formed with magnesium [61]. For this experiment, it should be noted that EDTA complexes both the manganese from the manganese carbonate template and magnesium ions from the cell wall of the bacteria. The

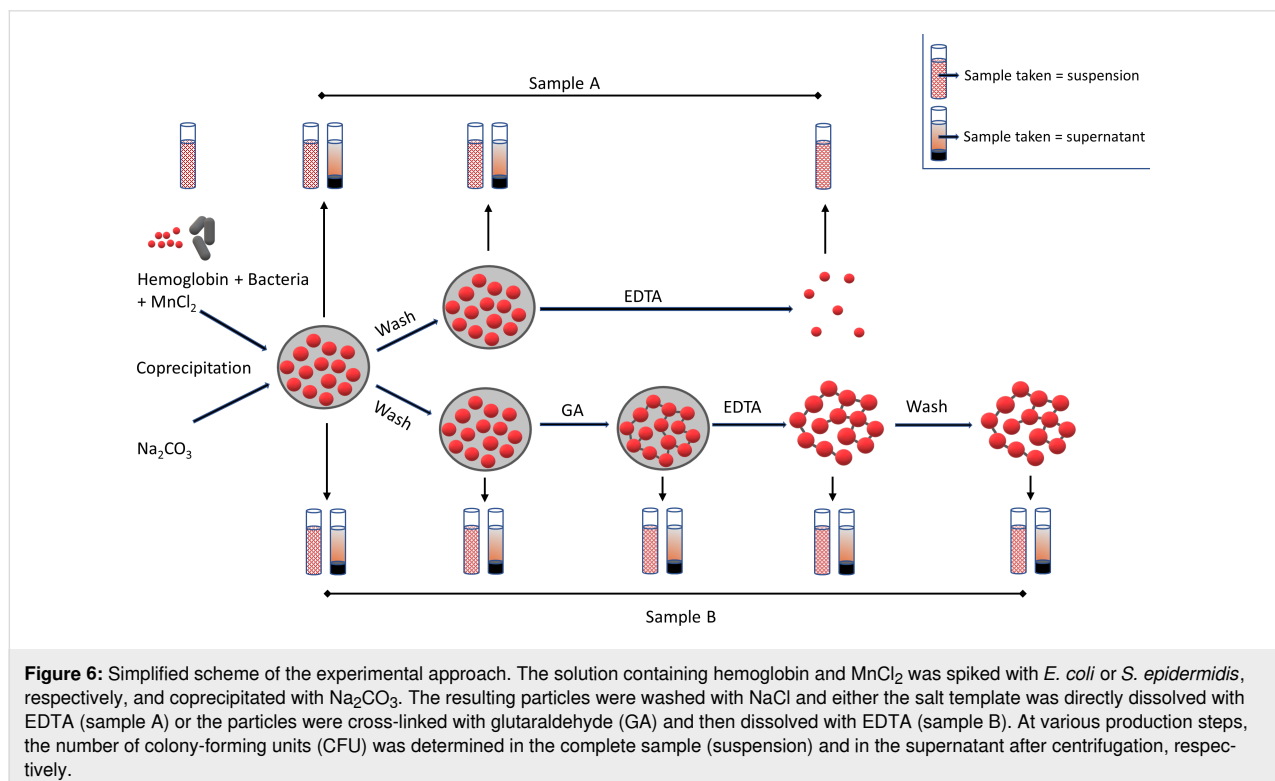
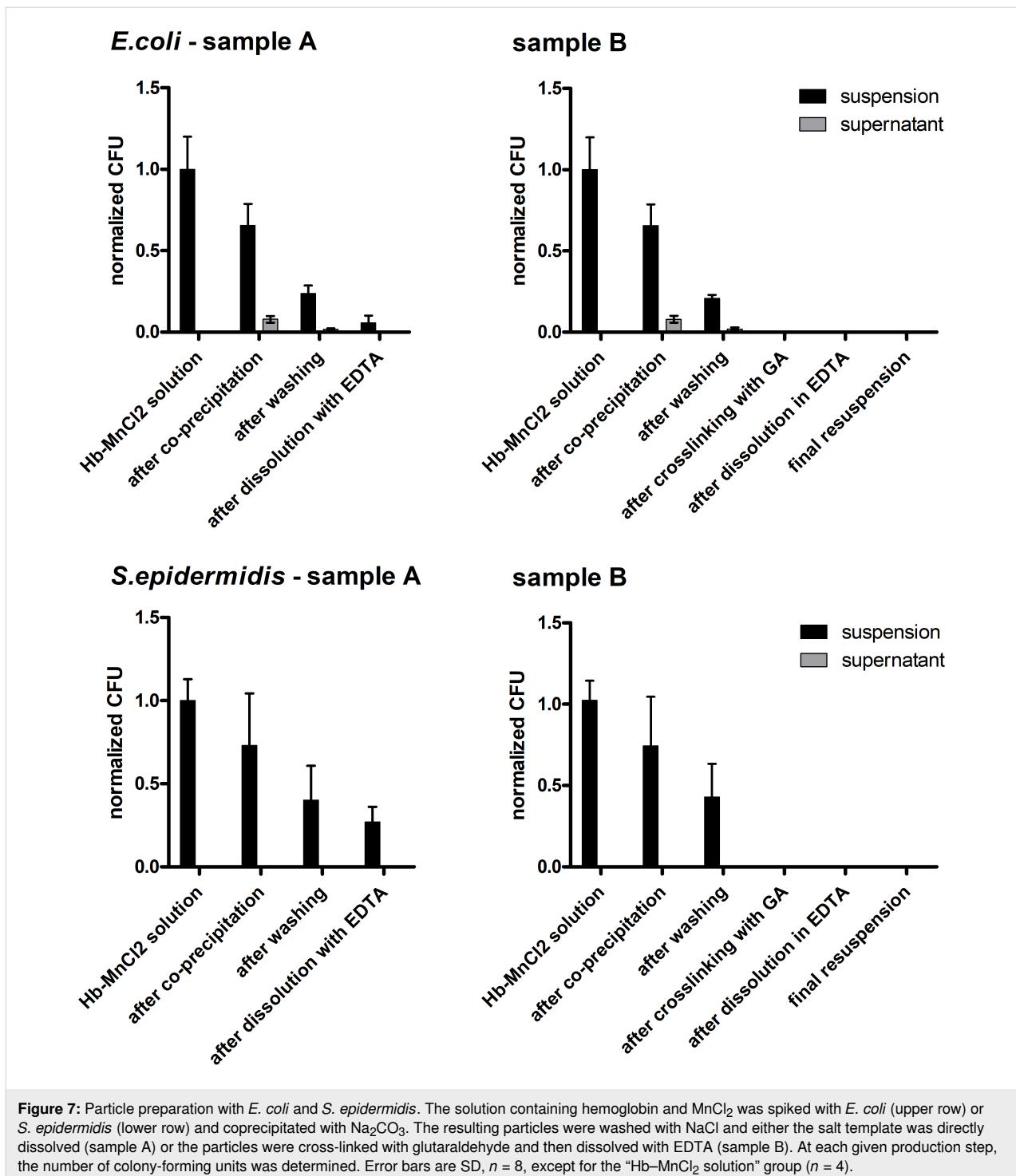


Figure 6: Simplified scheme of the experimental approach. The solution containing hemoglobin and MnCl₂ was spiked with *E. coli* or *S. epidermidis*, respectively, and coprecipitated with Na₂CO₃. The resulting particles were washed with NaCl and either the salt template was directly dissolved with EDTA (sample A) or the particles were cross-linked with glutaraldehyde (GA) and then dissolved with EDTA (sample B). At various production steps, the number of colony-forming units (CFU) was determined in the complete sample (suspension) and in the supernatant after centrifugation, respectively.



former leads to dissolution of the carbonate template of the particles, while the latter leads to prevention of bacterial proliferation. It is possible that the stronger binding of EDTA to manganese results in insufficient EDTA to bind to all the magnesium from the cell walls of the bacteria. However, if the actual production process of the HbMP was performed, (i.e., including the cross-linking with glutaraldehyde)

no more bacteria would be detectable after the cross-linking step.

Thus, the use of GA and EDTA together with washing effects may be part of a comprehensive biological safety concept for the production of HbMP for the potential use as an artificial oxygen carrier and blood substitute.

Conclusion

In conclusion, we could show that HbMP can be safely produced with respect to bacterial contamination. Biopolymer particles can be produced with the simple CCD technique and promise a wide range of biomedical applications, depending on the biopolymer used. The application of HbMP as artificial oxygen carriers came into focus. Initial preclinical studies yielded promising results. In these particles (i.e., HbMP), hemoglobin is used for particle production and EDTA and glutaraldehyde are applied in the standard production process. The effect of these chemicals in the concentration range used, together with washing effects during production, ensure that any previously undetected bacterial contamination is removed. After production and final determination of the bioburden and endotoxin content (and of course if all other quality control parameters are met) the produced batch of HbMP can be released for further use. These findings are an important part of our extensive safety concept.

Experimental

Materials

Ringer's acetate solution was purchased from Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Germany; aqua ad iniectabilia (Ampuwa) from Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Germany, and sodium chloride (NaCl) from B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany. Human serum albumin, 200 g/L, Baxalta was obtained from Takeda Pharma Vertrieb GmbH & Co. KG, Berlin, Germany. EDTA, PBS, and glycine were obtained from AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany. Manganese dichloride (MnCl_2), sodium carbonate (Na_2CO_3), glutaraldehyde, sodium borohydride (NaBH_4), sodium hydroxide (NaOH), and Mueller–Hinton II Bouillon were purchased from Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Staphylococcus epidermidis (own cultivation) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) were kindly provided by the Bereswill Lab, Institute of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. Columbia agar with 5% of sheep blood was purchased from Thermo Fisher Diagnostics GmbH Microbiology, Wesel, Germany.

Hemoglobin was prepared by hypotonic hemolysis as described earlier [62,63] with slight adjustments. Briefly, fresh bovine whole blood (anticoagulated with 2 g/L of EDTA, provided by Biophyll GmbH, Dietersburg, Germany) was centrifuged for 20 min at 2500g at 2–8 °C. The resulting packed red blood cells (RBC) were washed at least three times with sterile 0.9% NaCl and lysed overnight with four to five volumes of a low osmotic sodium chloride solution (100 mOsmol/kg). The lysate was centrifuged at 5500g at 2–8 °C for 4 h and the supernatant was

processed by means of tangential flow filtration (TFF). A KrosFlo KR2 system with a 500 kDa mPES hollow fiber module (Repligen Europe B.V., Breda, Netherlands) was used similarly to the process described earlier [64]. The processed Hb was stored at –80 °C until use.

Preparation and characterization of hemoglobin microparticles

Hemoglobin microparticles (HbMP) were fabricated by the CCD technique [51,65]. Shortly, 0.25 M of Na_2CO_3 and 0.25 M of MnCl_2 including 10 mg/mL of Hb and 1 mg/mL of HSA were rapidly mixed at room temperature (coprecipitation). After coprecipitation, 2.5 mg/mL of HSA was added and after 5 min the particles were separated by centrifugation and washed three times with 0.9% NaCl. The particles were resuspended in a 0.02% GA solution and incubated for 1 h at room temperature on a shaker (cross-linking). After another centrifugation, the excess GA was quenched with 0.1 M of glycine. A solution of 0.2 M of EDTA pH 7.4 was added to dissolve the MnCO_3 template (dissolution) and the resulting protein particles were treated with NaBH_4 in 0.1 M of NaOH. Lastly, the particles were washed three times with 0.9% NaCl and resuspended in Ringer's acetate until further use.

Characterization of hemoglobin microparticles

For the SEM analysis, one drop of the sample was applied to a glass slide, dried overnight, and sputtered with gold. A Gemini Leo 1550 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) instrument was utilized for the measurements at an operation voltage of 10 kV.

The particle size was measured by DLS applying a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, U.K.). Additionally, CLSM images were taken with a LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) confocal microscope and the size was measured from the images. The microscope was used with a 100× oil-immersion objective (numerical aperture 1.3) while utilizing an excitation wavelength of 488 nm and a 505 nm long-pass emission filter.

The zeta potential of HbMP in 0.9% NaCl (pH 7.4, conductivity 17.2 ± 0.9 mS/cm) was measured using the Zetasizer Nano ZS instrument.

For the determination of the concentration of free hemoglobin in the HbMP suspension, aliquots of three batches of HbMP, produced with 0.02% GA were stored at 2–8 °C for up to six months. Every month an aliquot was taken and centrifuged at 20 000g for 30 min (Hettich Mikro 22R, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany). The hemoglobin released in the

supernatant was measured with a standard alkaline haematin detergent (AHD) [66].

Preparation of hemoglobin microparticles spiked with bacteria

Hemoglobin microparticles spiked with bacteria were produced by adding *E. coli* or *S. epidermidis*, respectively, to the hemoglobin solution (see Figure 6). The bacteria were spread on agar plates three days prior to particle preparation and incubated at 37 °C. Then, about one third of a bacterial colony was transferred into sterile injection water (Ampuwa), the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was measured (Spectra Classic, Tecan Group Ltd., Maennedorf, Switzerland) and adjusted to 1.5×10^8 CFU/mL. The bacterial suspension was diluted to 2.5×10^5 CFU/mL and mixed with the hemoglobin solution. The concentration of bacteria in the hemoglobin solution was determined for every particle batch and used as an initial value to evaluate bioburden at different steps in the particle preparation process.

Determination of bacterial growth Influence of glutaraldehyde and EDTA

The bacteria plus EDTA (0.2 M) or GA (0.02%) were filled in the wells of a microtiter plate. The samples contained bacteria at a concentration of approximately 7.5×10^5 CFU/mL. The positive control consisted of bacteria and growth medium (Mueller–Hinton II Bouillon), the negative control of bacteria and 0.4% peracetic acid, and the sterile control consisted of medium only. The bacteria were preincubated for 20 h at 37 °C in Mueller–Hinton II Bouillon. Afterwards, the growth medium was removed and replaced with fresh Mueller–Hinton II Bouillon (control), Mueller–Hinton II Bouillon + 0.02% GA, or 0.2 M of EDTA. Cells were grown for 2.5 h at room temperature. At the start and at different time points, the optical density at 600 nm was determined to assess bacterial growth. In a further experiment, a mixture of EDTA and GA was simultaneously examined.

Determination of bioburden during preparation of hemoglobin microparticles

To assess the amount of viable bacteria, samples were taken from the initial Hb–MnCl₂ solution. After coprecipitation, washing, cross-linking, and dissolution, samples were also taken from the final particle suspension (Figure 6 – sample B). To determine the bioburden, two samples were analyzed: one from the particle suspension and one from the supernatant after centrifuging the suspension (3000g, 3 min).

In addition to this standard protocol, test series were also carried out in which coprecipitated particles were dissolved

with EDTA without prior cross-linking with glutaraldehyde. Therefore, the last sample here was taken after resuspension in EDTA solution (Figure 6 – sample A).

The respective samples were serially diluted (undiluted to 1:1000), 100 µL of each dilution was spread on agar plates and incubated for one day at 37 °C. Possibly growing colonies were counted.

Acknowledgements

We thank Ms. Josephine Müller for technical assistance in carrying out the experiments. We also thank Prof. Stefan Bereswill and his staff (Institute of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany) for their support in the work with microorganisms and Dr. Dimitriya Borisova (Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces, Golm, Germany) for SEM imaging.

Funding

We acknowledge the financial support from the European Community (EFRE-ProFIT 10139827, 10169193).

ORCID® iDs

Axel Steffen - <https://orcid.org/0000-0002-9791-9851>

Yu Xiong - <https://orcid.org/0000-0002-2445-8185>

Radostina Georgieva - <https://orcid.org/0000-0003-1546-5540>

Hans Bäumlér - <https://orcid.org/0000-0002-2573-2289>

Preprint

A non-peer-reviewed version of this article has been previously published as a preprint: <https://doi.org/10.3762/bxiv.2021.81.v1>

References

- Sen Gupta, A. *Shock* **2019**, *52*, 70–83. doi:10.1097/shk.0000000000001009
- Coll-Satue, C.; Bishnoi, S.; Chen, J.; Hosta-Rigau, L. *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 1135–1152. doi:10.1039/d0bm01767a
- Winslow, R. M. *Vox Sang.* **2006**, *91*, 102–110. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00789.x
- Bäumlér, H.; Georgieva, R. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1480–1487. doi:10.1021/bm1001125
- Zhang, Y.; Chan, H. F.; Leong, K. W. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 104–120. doi:10.1016/j.addr.2012.10.003
- Prapan, A.; Suwannasom, N.; Kloypan, C.; Chaiwaree, S.; Steffen, A.; Xiong, Y.; Kao, I.; Pruß, A.; Georgieva, R.; Bäumlér, H. *Coatings* **2019**, *9*, 454. doi:10.3390/coatings9070454
- Suwannasom, N.; Smuda, K.; Kloypan, C.; Kaewprayoon, W.; Baisaeng, N.; Prapan, A.; Chaiwaree, S.; Georgieva, R.; Bäumlér, H. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 482. doi:10.3390/nano9030482
- Chaiwaree, S.; Prapan, A.; Suwannasom, N.; Laporte, T.; Neumann, T.; Pruß, A.; Georgieva, R.; Bäumlér, H. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 224. doi:10.3390/pharmaceutics12030224

9. Resolution No. 17 - Recognition of the Bovine Spongiform Encephalopathy Risk Status of Members.
<https://www.oie.int/app/uploads/2021/05/a-r17-2021-bse.pdf> (accessed Nov 18, 2021).
10. Freiheit von Tierseuchen - KVG.
<https://www.verbrauchergesundheits.at/tiere/krankheiten/freiheiten/freiheit.html> (accessed Nov 18, 2021).
11. Bäumler, H.; Xiong, Y.; Liu, Z. Z.; Patzak, A.; Georgieva, R. *Artif. Organs* **2014**, *38*, 708–714. doi:10.1111/aor.12331
12. Bäumler, H.; Georgieva, R.; Bäumler, H. Micro-particles, blood-substitute and method for forming same. EP20070112474, July 13, 2007.
13. Kao, I.; Xiong, Y.; Steffen, A.; Smuda, K.; Zhao, L.; Georgieva, R.; Pruss, A.; Bäumler, H. *Artif. Organs* **2018**, *42*, 549–559. doi:10.1111/aor.13071
14. Mansouri, A. *Am. J. Med. Sci.* **1985**, *289*, 200–209. doi:10.1097/00000441-198505000-00004
15. White, J. C.; Beaven, G. H. *J. Clin. Pathol.* **1954**, *7*, 175–200. doi:10.1136/jcp.7.3.175
16. Watson, S. W.; Novitsky, T. J.; Quinby, H. L.; Valois, F. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *33*, 940–946. doi:10.1128/aem.33.4.940-946.1977
17. Caroff, M.; Novikov, A. *OCL: Oilseeds Fats, Crops Lipids* **2020**, *27*, 31. doi:10.1051/ocl/2020025
18. Schwarz, H.; Schmittner, M.; Duschl, A.; Horejs-Hoek, J. *PLoS One* **2014**, *9*, e113840. doi:10.1371/journal.pone.0113840
19. Fung, F. M.; Su, M.; Feng, H.-t.; Li, S. F. Y. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10774. doi:10.1038/s41598-017-11232-x
20. Buehler, P. W.; Boykins, R. A.; Jia, Y.; Norris, S.; Freedberg, D. I.; Alayash, A. I. *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2005**, *77*, 3466–3478. doi:10.1021/ac050064y
21. Habeeb, A. F. S. A.; Hiramoto, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 16–26. doi:10.1016/0003-9861(68)90554-7
22. Matei, A.; Puscas, C.; Patrascu, I.; Lehene, M.; Ziebro, J.; Scurtu, F.; Baia, M.; Porumb, D.; Totos, R.; Silaghi-Dumitrescu, R. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3372. doi:10.3390/ijms21093372
23. Ballantyne, B.; Jordan, S. L. *J. Appl. Toxicol.* **2001**, *21*, 131–151. doi:10.1002/jat.741
24. Gorman, S. P.; Scott, E. M.; Russell, A. D. *J. Appl. Bacteriol.* **1980**, *48*, 161–190. doi:10.1111/j.1365-2672.1980.tb01217.x
25. Sabatini, D. D.; Bensch, K.; Barnett, R. J. *J. Cell Biol.* **1963**, *17*, 19–58. doi:10.1083/jcb.17.1.19
26. Russell, A. D.; Hopwood, D. The Biological Uses and Importance of Glutaraldehyde. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis, G. P.; West, G. B., Eds.; Elsevier, 1976; pp 271–301. doi:10.1016/s0079-6468(08)70140-1
27. Banfi, G.; Salvagno, G. L.; Lippi, G. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2007**, *45*, 565–576. doi:10.1515/ccim.2007.110
28. Leive, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1965**, *53*, 745–750. doi:10.1073/pnas.53.4.745
29. Haque, H.; Russell, A. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *5*, 447–452. doi:10.1128/aac.5.5.447
30. Root, J. L.; McIntyre, O. R.; Jacobs, N. J.; Daghljan, C. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1627–1631. doi:10.1128/aac.32.11.1627
31. Gangan, M. S.; Athale, C. A. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 160417. doi:10.1098/rsos.160417
32. Otto, M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 555–567. doi:10.1038/nrmicro2182
33. Miragaia, M.; Thomas, J. C.; Couto, I.; Enright, M. C.; de Lencastre, H. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2540–2552. doi:10.1128/jb.01484-06
34. Supragingival Microbes. *Atlas of Oral Microbiology*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2015; pp 41–65. doi:10.1016/b978-0-12-802234-4.00003-3
35. Ramírez-Arcos, S.; Goldman, M. Bacterial Contamination. In *Practical transfusion medicine*, 5th ed.; Murphy, M. F.; Roberts, D. J.; Yazer, M. H., Eds.; John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, 2017; pp 168–175. doi:10.1002/9781119129431.ch16
36. Levy, J. H.; Neal, M. D.; Herman, J. H. *Crit. Care* **2018**, *22*, 271. doi:10.1186/s13054-018-2212-9
37. Stramer, S. L.; Dodd, R. Y. Transfusion-Transmitted Diseases. In *Hematology: Basic principles and practice*, 7th ed.; Hoffman, R.; Heslop, H.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Silberstein, L. E.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, PA, 2018; pp 1803–1820.e2. doi:10.1016/b978-0-323-35762-3.00120-7
38. Wilson-Nieuwenhuis, J. S. T.; Dempsey-Hibbert, N.; Liauw, C. M.; Whitehead, K. A. *Colloids Surf., B* **2017**, *160*, 126–135. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.019
39. Perrotta, P. L.; Snyder, E. L. Platelet Storage and Transfusion. In *Platelets*, 2nd ed.; Michelson, A. D., Ed.; Elsevier Science: Burlington, 2011; pp 1265–1295. doi:10.1016/b978-0-12369367-9/50831-4
40. Gottenbos, B.; Grijpma, D. W.; van der Mei, H. C.; Feijen, J.; Busscher, H. J. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 7–13. doi:10.1093/jac/48.1.7
41. Maillard, J.-Y. *Ther. Clin. Risk Manage.* **2005**, *1*, 307–320.
42. Russell, A. D. *J. Hosp. Infect.* **1999**, *43* (Suppl. 1), S57–S68. doi:10.1016/s0195-6701(99)90066-x
43. McDonnell, G.; Russell, A. D. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 147–179. doi:10.1128/cmr.12.1.147
44. McGucken, P. V.; Woodside, W. *J. Appl. Bacteriol.* **1973**, *36*, 419–426. doi:10.1111/j.1365-2672.1973.tb04123.x
45. Maillard, J.-Y. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 16S–27S. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x
46. Munton, T. J.; Russell, A. D. *J. Appl. Bacteriol.* **1972**, *35*, 193–199. doi:10.1111/j.1365-2672.1972.tb03690.x
47. Hill, S. D.; Berry, C. W.; Seale, N. S.; Kaga, M. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.* **1991**, *71*, 89–95. doi:10.1016/0030-4220(91)90530-p
48. Davison, W. M.; Pitts, B.; Stewart, P. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2920–2927. doi:10.1128/aac.01734-09
49. Sawant, R. B.; Jathar, S. K.; Rajadhyaksha, S. B.; Kadam, P. T. *Asian J. Transfus. Sci.* **2007**, *1*, 47–51. doi:10.4103/0973-6247.33446
50. Sowemimo-Coker, S. O. *Transfus. Med. Rev.* **2002**, *16*, 46–60. doi:10.1053/tmrv.2002.29404
51. Xiong, Y.; Steffen, A.; Andreas, K.; Müller, S.; Sternberg, N.; Georgieva, R.; Bäumler, H. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3292–3300. doi:10.1021/bm301085x
52. Walsh, S. E.; Maillard, J.-Y.; Russell, A. D.; Catrenich, C. E.; Charbonneau, D. L.; Bartolo, R. G. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 240–247. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x
53. Umerska, A.; Strandh, M.; Cassisa, V.; Matougui, N.; Eveillard, M.; Saulnier, P. *Biomolecules* **2018**, *8*, 122. doi:10.3390/biom8040122
54. Schnaitman, C. A. *J. Bacteriol.* **1971**, *108*, 553–563. doi:10.1128/jb.108.1.553-563.1971
55. Prachayasittikul, V.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Tantimongcolwat, T.; Nantasenamat, C.; Galla, H.-J. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 901–913. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00350.x
56. Leive, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *21*, 290–296. doi:10.1016/0006-291x(65)90191-9

57. Levy, S. B.; Leive, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *61*, 1435–1439. doi:10.1073/pnas.61.4.1435
58. Gray, G. W.; Wilkinson, S. G. *J. Gen. Microbiol.* **1965**, *39*, 385–399. doi:10.1099/00221287-39-3-385
59. Russell, A. D. *J. Appl. Bacteriol.* **1967**, *30*, 395–401. doi:10.1111/j.1365-2672.1967.tb00314.x
60. Chew, B. P.; Tjoelker, L. W.; Tanaka, T. S. *J. Dairy Sci.* **1985**, *68*, 3037–3046. doi:10.3168/jds.s0022-0302(85)81199-1
61. Hart, J. R. Ethylenediaminetetraacetic Acid and Related Chelating Agents. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2000. doi:10.1002/14356007.a10_095.pub2
62. Haney, C. R.; Buehler, P. W.; Gulati, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000**, *40*, 153–169. doi:10.1016/s0169-409x(99)00047-2
63. Xiong, Y.; Liu, Z. Z.; Georgieva, R.; Smuda, K.; Steffen, A.; Sendeski, M.; Voigt, A.; Patzak, A.; Bäuml, H. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7454–7461. doi:10.1021/nn402073n
64. Palmer, A. F.; Sun, G.; Harris, D. R. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 189–199. doi:10.1002/btpr.119
65. Xiong, Y.; Georgieva, R.; Steffen, A.; Smuda, K.; Bäuml, H. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *514*, 156–164. doi:10.1016/j.jcis.2017.12.030
66. Kloypan, C.; Prapan, A.; Suwannasom, N.; Chaiwaree, S.; Kaewprayoon, W.; Steffen, A.; Xiong, Y.; Baisaeng, N.; Georgieva, R.; Bäuml, H. *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.* **2018**, *46*, S964–S972. doi:10.1080/21691401.2018.1521819

License and Terms

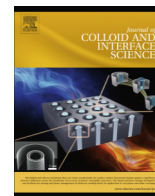
This is an open access article licensed under the terms of the Beilstein-Institut Open Access License Agreement (<https://www.beilstein-journals.org/bjnano/terms>), which is identical to the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). The reuse of material under this license requires that the author(s), source and license are credited. Third-party material in this article could be subject to other licenses (typically indicated in the credit line), and in this case, users are required to obtain permission from the license holder to reuse the material.

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at:
<https://doi.org/10.3762/bjnano.13.8>

Publikation 2

Xiong, Y.; Georgieva, R.; Steffen, A.; Smuda, K.; Bäuml, H., Structure and properties of hybrid biopolymer particles fabricated by coprecipitation cross-linking dissolution procedure, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018, 514, 156–164, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.12.030>

Seiten: 49 - 57

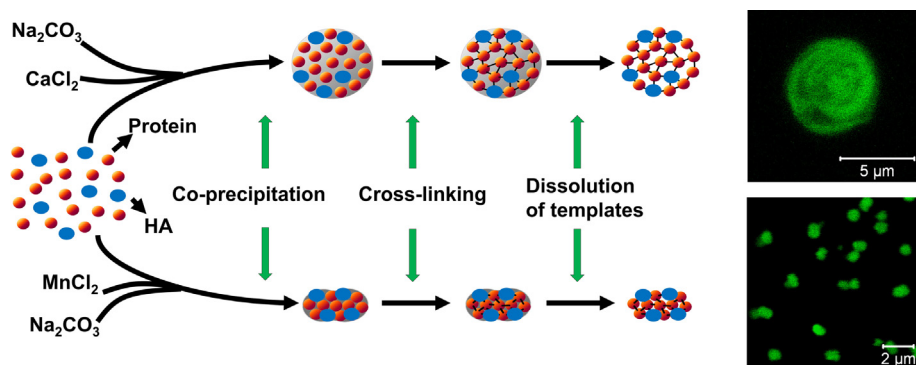


Structure and properties of hybrid biopolymer particles fabricated by co-precipitation cross-linking dissolution procedure

Yu Xiong*, Radostina Georgieva, Axel Steffen, Kathrin Smuda, Hans Bäumlér*

Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Institute of Transfusion Medicine, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2017

Revised 6 December 2017

Accepted 11 December 2017

Available online 12 December 2017

Keywords:

Co-precipitation
Composite materials
Microstructures
Calcium carbonate
Manganese carbonate
Hyaluronic acid

ABSTRACT

The Co-precipitation Crosslinking Dissolution technique (CCD-technique) allows a few-steps fabrication of particles composed of different biopolymers and bioactive agents under mild conditions. Morphology and properties of the fabricated biopolymer particles depend on the fabrication conditions, the nature of the biopolymers and additives, but also on the choice of the inorganic templates for co-precipitation. Here, we investigate the influence of an acidic biopolymer, hyaluronic acid (HA), on the formation of particles from bovine hemoglobin and bovine serum albumin applying co-precipitation with CaCO_3 and MnCO_3 . CaCO_3 templated biopolymer particles are almost spherical with particle size from 2 to 20 μm and protein entrapment efficiency from 13 to 77%. Presence of HA causes significant structural changes of the particles and decreasing protein entrapment efficiency. In contrast, MnCO_3 templated particles exhibit uniform peanut shape and submicron size with remarkably high protein entrapment efficiency of nearly 100%. Addition of HA has no influence on the protein entrapment efficiency or on morphology and size of the particles. These effects can be attributed to the strong interaction of Mn^{2+} with proteins and much weaker interaction with HA. Therefore, entrapment efficiency, size and structure of biopolymer particles can be optimized by varying the mineral templates and additives.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Colloidal systems offer numerous biological, medical and pharmaceutical applications as biosensors, bioreactors, diagnostic tools and drug delivery systems [1–4]. In particular, biopolymer based

* Corresponding authors.

E-mail addresses: yu.xiong@charite.de (Y. Xiong), hans.baemler@charite.de (H. Bäumlér).

particles have attracted considerable attention for medical applications. For the preparation of protein based particles or capsules, several methods exist including desolvation technique, double emulsion technique, spray drying, liposome encapsulation, or layer-by-layer (LBL) polyelectrolyte encapsulation [5–11].

Inspired by studies on biomineralization processes inorganic calcium carbonate (CaCO_3) and manganese carbonate (MnCO_3) particles have been intensively investigated as entrapment tools for biomolecules. These inorganic particles are easily synthesized by simple procedures at mild fabrication conditions usually via precipitation reactions by mixing two salt solutions [11–16] and have been observed to have a high absorption capacity for polymers and biomacromolecules [3,11,12,16]. Several applications have been reported in diverse scientific publications, for example as templates for fabrication of polyelectrolyte multilayer capsules [3,11,12].

In mineralized tissues, such as bone, cartilage, etc. calcium phosphate or carbonate crystalline or amorphous structures are formed through interactions with biomacromolecules. In fact, precipitation of CaCO_3 in the presence of biopolymers has become interesting as biopolymers can be captured more effectively than by simple adsorption onto preformed CaCO_3 particles [17]. Such biopolymer- CaCO_3 hybrid particles provide a suitable platform for fabrication of Lbl-microcapsules containing encapsulated proteins [17–19].

A more facile and effective method for the fabrication of biopolymer particles [20], which is also based on co-precipitation of carbonates with biopolymers was developed in our department [21–24]. The co-precipitated biopolymers form insoluble biopolymer-carbonate hybrid particles with the metal carbonates and are intermolecularly cross-linked. Subsequently, the metal carbonate templates are dissolved to yield high density pure biopolymer particles. We call this method CCD-technique according to the three key steps, namely Co-precipitation, Cross-linking (of the biopolymers) and Dissolution of the templates [25].

Previously we reported the potential biomedical application of hemoglobin particles prepared by the CCD technique using CaCO_3 and MnCO_3 templates as artificial oxygen carriers [23,24].

The remarkable differences between the hemoglobin particles fabricated using CaCO_3 and MnCO_3 in terms of particle morphology, size and in particular of the protein entrapment efficiency attracted our attention. While the protein capture mechanism during protein/ CaCO_3 co-precipitation is well documented [17], the mechanism of the high protein entrapment efficiency by protein co-precipitation with MnCO_3 is less investigated. The morphology and the size of carbonate microparticles strongly depend on the precipitation conditions and on the presence of additives [26–31]. The crystallization process of CaCO_3 is influenced by the presence of some polymers, especially acidic polymers [27–29,32,33]. However, the influence of such acidic polymers mixed with proteins on the formation of particles via the CCD-technique is unknown. Since multifunctional nano- and microparticles for medical applications or diagnostic purposes contain more than one compound and can be composed by different polymers, it is important to investigate how the different polymers influence the formation and structure of particles.

In the current study, we applied the CCD technique to prepare particles made of hemoglobin or bovine serum albumin using CaCO_3 or MnCO_3 . Hyaluronic acid, an acidic biopolymer [34], was applied as an additive to the proteins to investigate its influences on the morphology of the particles and on the protein entrapment efficiency. Hyaluronic acid was used in the past for the fabrication of Layer by Layer polyelectrolyte microcapsules templated on CaCO_3 [12,35]. Recently, a paper about hyaluronic acid templated CaCO_3 using another technique (Sc CO_2 process) without crosslinking and dissolution was published by Ramalapa et al. [36]. To our

best knowledge, there are no other reports about the hyaluronic acid mediated formation of CaCO_3 , MnCO_3 or other types of mineral particles.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Hemoglobin (Hb) was extracted from bovine red blood cells by hypotonic hemolysis [24,37]. Bovine serum albumin (BSA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-BSA, hyaluronic acid sodium salt (HA) with the molecular weight of approximately $1.5\text{--}1.8 \times 10^6$ Dalton, glutaraldehyde (GA), divinyl sulfone (DVS), rhodamine 6G, calcium chloride (CaCl_2), manganese chloride (MnCl_2) tetrahydrate, sodium carbonate (Na_2CO_3), phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), sodium hydroxide (NaOH), glycine and sodium borohydride (NaBH_4) were purchased from Sigma-Aldrich; Ampuwa® (aqua ad injectable) and sterile 0.9% NaCl solution were purchased from Fresenius Kabi Deutschland GmbH.

2.2. Preparation of particles

Pure protein particles were fabricated as previously described [21,23,24]. Briefly, equal volumes of 0.25 M Na_2CO_3 and 0.25 M CaCl_2 or 0.25 M MnCl_2 containing $2.5\text{--}15 \text{ mg mL}^{-1}$ Hb or BSA were mixed in a beaker under stirring (stirring speed from 200 to 600 RPM) at room temperature. For fluorescence labelling, FITC-BSA (weight ratio to Hb or BSA = 1:50) was added to CaCl_2 or MnCl_2 . The obtained protein-metal carbonate hybrid particles were separated by centrifugation and washed three times with Ampuwa®. The particles were suspended in GA solution (0.01–0.1%) and incubated at room temperature for 1 h, followed by centrifugation and quenching of remaining GA with glycine. The CaCO_3 or MnCO_3 templates were dissolved by adding EDTA solution (0.2 M, pH 7.4) and the particles were treated with NaBH_4 . Finally, the resulting particles were centrifuged, washed three times and resuspended in Ampuwa® until further use.

For preparation of protein-HA particles, HA (weight ratio to protein = 1:10 or 1:20) was added to the CaCl_2 or MnCl_2 solution and the cross-linking step was performed with 0.1% GA containing 50 mM DVS at room temperature. For pure HA particles, co-precipitation was carried out under fast stirring by mixing equal volumes of 0.25 M Na_2CO_3 containing 2.5 mg mL^{-1} HA and 0.25 M CaCl_2 at 600 RPM on a magnetic stirrer. The cross-linking step was performed with 100 mM DVS in 0.1 M NaOH over 18 h at room temperature.

2.3. Protein entrapment efficiency (EE)

EE of MnCO_3 or CaCO_3 particles was determined as the difference between the total protein amount applied (PAT) and the protein amount determined in the supernatant (PAF) after co-precipitation and after each washing step. The EE% was calculated according to the following equation $\text{EE}\% = (\text{PAT} - \text{PAF}) \times 100\%/\text{PAT}$. The measurements of Hb concentration were performed with a microplate reader (PowerWave 340, BioTek Instruments GmbH) at 415 nm and the measurements of BSA concentration were performed with UV-VIS-spectrophotometer (Hitachi U2800, Hitachi High-Technologies Corporation) at 280 nm.

2.4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

CLSM images were taken with a confocal microscope LSM 510 Meta (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) equipped

with a 100 × oil-immersion objective (numerical aperture 1.3) applying excitation wavelength of 488 nm and a long pass emission filter 505 nm.

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

Samples were prepared by applying a drop of the particle suspension to a glass slide followed by drying and sputtering with gold. Measurements were conducted using a Gemini Leo 1550 instrument at an operation voltage of 3 kV or 10 kV.

2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

TEM images were obtained with a Zeiss EM 912 Omega microscope at an acceleration voltage of 120 kV.

2.7. Particle size

The particle size in the dry state was measured from SEM images using ImageJ 1.44p software. Additionally, the particle size in aqueous salt solution was measured from CLSM images and by dynamic light scattering using a Zetasizer nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., U.K.).

2.8. Zeta potential

Zeta potential was measured in 0.9% NaCl solution with a pH value of 7.0 and conductivity of 18.5 mS/cm using the Zetasizer nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., U.K.).

3. Results and discussion

For the description of different particle types, the following terminology (Table 1) is used.

3.1. Protein entrapment efficiency (EE)

The protein entrapment efficiency of the CaCO₃ and MnCO₃ particles was investigated in dependency on the concentration of Hb or BSA during the co-precipitation. The protein EE of the particles increased with decreasing initial protein concentration. The EE of Hb ranged from 13% to 38% for CaCO₃ particles and from 54% to 99.6% for MnCO₃ particles, respectively. The EE of BSA ranged from 29% to 77% for CaCO₃ and from 53% to 97% for MnCO₃ particles, respectively (Fig. 1A). The protein content in particles (absolute amount of the entrapped protein in protein-metal carbonate hybrid particles) increased with increasing initial protein concentration (Fig. 1B). At 15 mg mL⁻¹ a protein concentration in MnCl₂ solution of more than 32 g Hb or BSA per mol MnCO₃ can be achieved. The capture efficiency of protein by MnCO₃ particles

was clearly more effective than it was by CaCO₃ microparticles (nearly 5-fold for Hb and more than 2-fold for BSA, respectively).

Co-precipitation of proteins with CaCO₃ or MnCO₃ have been proved as an effective tool to encapsulate the proteins [17,21,23,24]. Generally, in crystal growth processes, nuclei form initially in supersaturated solution and grow to nano sized primary particles which convert to microparticles by a mesoscale assembly process [28,38,39]. By co-precipitation, proteins can be both adsorbed onto the surface of primary nanoparticles and mechanically captured into the inner cavities during the colloidal aggregation of nanoparticles resulting in high entrapment efficiency [17]. It was found that the protein capture by co-precipitation of proteins with CaCO₃ is about five times more effective than protein adsorption onto preformed CaCO₃ microparticles [17]. As demonstrated here, the protein capture efficiency by co-precipitation of protein with MnCO₃ particles was clearly much higher than it was by co-precipitation with CaCO₃ particles. This difference is very likely based on the different binding abilities of Mn²⁺ and Ca²⁺ with proteins. Mn²⁺ binds protein stronger than Ca²⁺. One albumin molecule binds one Mn²⁺ tightly with a binding constant of about 2.7 × 10⁴ M⁻¹ and around five Mn²⁺ weakly with a binding constant of nearly 3 × 10³ M⁻¹ [40]. In contrast, one albumin molecule can bind up to approximately 12 Ca²⁺ with a clearly weaker binding constant of only 90–100 M⁻¹ [41]. Due to the strong binding of Mn²⁺ with proteins, the proteins are probably involved in the early stages of the particle formation process: they participate in the formation of nuclei or primary nanoparticles during the co-precipitation with MnCO₃. Thus, the protein capture by MnCO₃ during the co-precipitation would be an “active” capture process. In contrast, the protein capture during co-precipitation of proteins with CaCO₃ via adsorption occurs mainly after primary nanoparticle formation step. This is a more “passive” process. Therefore, the protein capture is more effective by using MnCO₃ templates. In addition, the MnCO₃ particles show slightly positive zeta potential of 5.2 mV in contrast to the CaCO₃ particles with zeta potential of -3.4 mV (Table 2). During the co-precipitation, the pH is in the range between 7 and 8, which is above the isoelectric point of Hb as well as BSA. Therefore, the net charge of both proteins is negative, due to the electrostatic interaction with the negative charged proteins the MnCO₃ particles can capture more protein.

3.2. Size control

The size of protein-CaCO₃-MP depends on the stirring speed during the co-precipitation. The faster the reaction solutions are mixed, the smaller the particles are (Fig. 2A-C). Typically, protein-CaCO₃-MP exhibit a particle size between 2 and 10 μm. In the literature, it was found that the morphology and size of insoluble carbonate microparticles depend on the precipitation conditions such as the type and the concentration of salt used for precipitation, temperature, pH, mixing speed, reaction time and some additives [10,13,15,26,27,31,42–46]. In general, the size of CaCO₃ particles decreased with increased mixing speed, which is also proved by our experiments.

In contrast, co-precipitation of proteins with MnCO₃ provides always small particle sizes in the submicron range with narrow size distribution independent of the stirring rate during co-precipitation (Fig. 2D-F). There is no literature on MnCO₃ particles which are precipitated by mixing of MnCl₂ and Na₂CO₃ prior to our last report.

Other published preparation procedures of MnCO₃ particles are using MnSO₄ and NH₄HCO₃ at different ratios, very low concentrations and long precipitation times [15,16,47]. In our procedure the precipitation is performed at high salt concentrations and completed very fast, which is probably responsible to the formation

Table 1
Terminology of different particles.

Particle type	Abbreviation
Hb/BSA-CaCO ₃ hybrid particles	Hb/BSA-CaCO ₃ -MP
Hb/BSA-MnCO ₃ hybrid particles	Hb/BSA-MnCO ₃ -MP
CaCO ₃ templated Hb/BSA particles after dissolution of CaCO ₃	Hb/BSA-MP _{Ca}
CaCO ₃ templated Hb/BSA-HA particles after dissolution of CaCO ₃	Hb/BSA-HA-MP _{Ca}
MnCO ₃ templated Hb/BSA particles after dissolution of MnCO ₃	Hb/BSA-MP _{Mn}
MnCO ₃ templated Hb/BSA-HA particles after dissolution of MnCO ₃	Hb/BSA-HA-MP _{Mn}

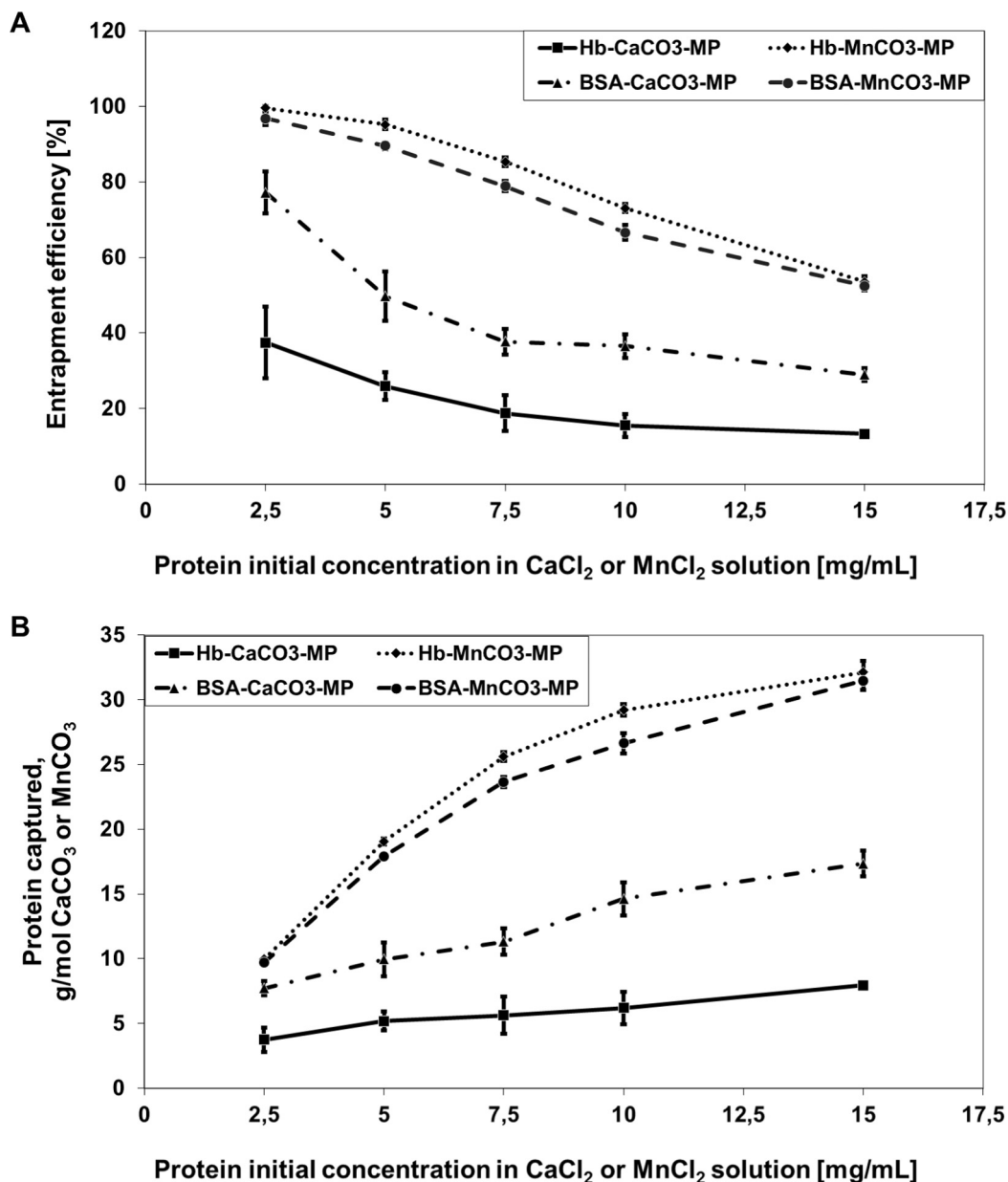


Fig. 1. Protein entrapment during co-precipitation: (A) Hb and BSA entrapment efficiency of CaCO₃ and MnCO₃; (B) absolute amount of entrapped Hb or BSA (gram per mol carbonate) for different protein initial concentrations. The concentrations of CaCl₂, MnCl₂ and Na₂CO₃ are 0.25 M.

Table 2

Zeta potential of different particles.

Biopolymer	Zeta potential [mV] of particles templated by	
	CaCO ₃	MnCO ₃
No ^a	-3.4 ± 3.0	5.2 ± 1.6
BSA ^b	-10.4 ± 1.5	-9.3 ± 0.3
Hb ^b	-12.3 ± 0.9	-4.3 ± 1.5
BSA/HA ^b	-20.1 ± 1.4	-19.3 ± 0.8
Hb/HA ^b	-21.1 ± 0.9	-19.7 ± 2.1

^a Pure metal carbonate particles.

^b After dissolution of metal carbonate.

of almost uniform peanut shaped particles independently of the stirring speed.

For further investigation, we used the stirring speed of 600 RPM at the co-precipitation step for both particle types.

3.3. Characterization of particles

SEM images of the obtained metal carbonate particles, protein-metal carbonate hybrid particles, SEM and CLSM images of particles after dissolution of metal carbonate were shown in Fig. 3. Additional SEM images of overview of CaCO₃ and MnCO₃ microparticles are shown in Figs. S1 and S2. The particles templated with CaCO₃ are almost spherical. The pronounced roughness of the surface of CaCO₃ microparticles is easily visible (Fig. 3A). As mentioned above, these particles are formed by ordered colloidal aggregation of primary CaCO₃ nanoparticles [28,38,39,48]. The nano sized primary particles on the surface of the CaCO₃ microparticles are between 60 and 120 nm in size (Fig. 3A). Compared to the pure CaCO₃ microparticles, the protein-CaCO₃-MP consist of smaller primary nanoparticles with size of 30–50 nm (Fig. 3B). Since the proteins can be adsorbed onto the surface of primary CaCO₃ nanoparticles during the co-precipitation [17], the primary

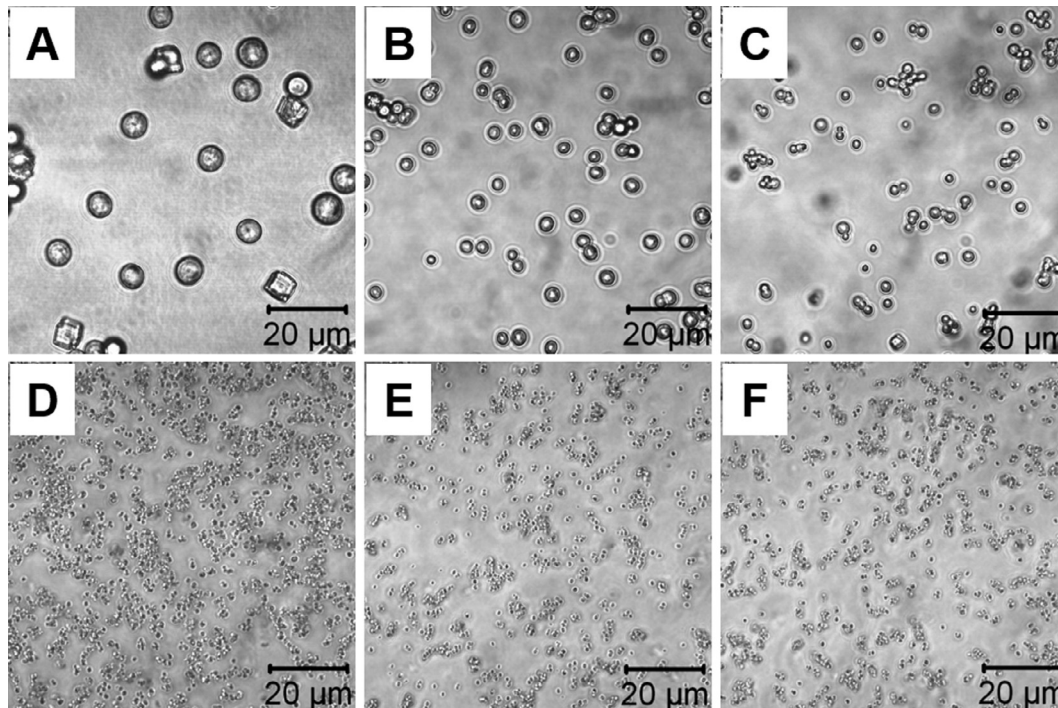


Fig. 2. Optical microscopy images of Hb-metal carbonate hybrid particles. (A, B, C) Hb-CaCO₃-MP, (D, E, F) Hb-MnCO₃-MP. Mixing speed of (A, D) 200 RPM, (B, E) 400 RPM and (C, F) 600 RPM were used for precipitation.

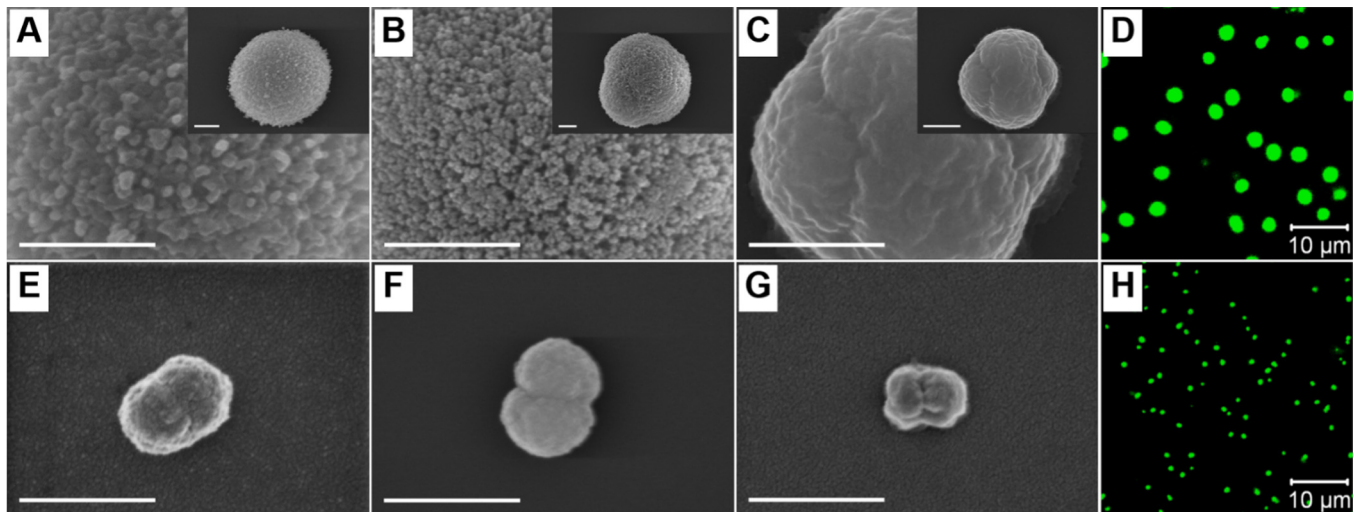


Fig. 3. Images of particles. (A) SEM image of CaCO₃ particle prior protein co-precipitation, (B) SEM image of Hb-CaCO₃-MP, (C) SEM and (D) CLSM images of Hb-MP_{Ca} (particles after CaCO₃ template removal), (E) SEM image of MnCO₃ submicron particle prior protein co-precipitation, (F) SEM image of Hb-MnCO₃-MP, (G) SEM and (H) CLSM images of Hb-MP_{Mn} (particles after MnCO₃ template removal). For CLSM imaging, the particles were labeled with FITC-BSA. Scale bars: (A, B, C, E, F and G) 1 μm, (D, H) 10 μm.

nanoparticles can be thereby stabilized. After cross-linking of proteins within the CaCO₃ template and subsequent dissolution of CaCO₃, the protein particles remain and kept their spherical form. Their surface is smoother (Fig. 3C) compared to the original hybrid particle (Fig. 3B). The pure protein particles are shrunken under SEM measurements due to the removal of the carbonate template and drying upon sample preparation for SEM imaging (Fig. 3C). As observed under confocal microscope the spherical CaCO₃ templated protein particles (stirring speed of 600 RPM during co-precipitation) exhibit a particle size distribution between 2 and 4.5 μm (Fig. 3D). For a better CLSM imaging FITC-BSA with weight

ratio to protein of 1:50 was added to protein solution prior co-precipitation.

In contrast, peanut shaped submicron particles were obtained by templating with MnCO₃ instead of CaCO₃ (Fig. 3E-H). The surface of MnCO₃ particles appears less rough than the surface of CaCO₃ particles (Fig. 3E). The primary nanoparticles were not recognizable in the SEM measurements. Both MnCO₃ particles and protein-MnCO₃-MP appeared more compact and less porous compared to the CaCO₃ templated particles (Fig. 3E and F). MnCO₃ templated protein particles after cross-linking and dissolution steps also kept their peanut shaped form and are also shrunken under SEM measurements (Fig. 3G). Fig. 3H shows the confocal image

of MnCO_3 templated and FITC-BSA labeled Hb submicron particles. These peanut shaped protein submicron particles templated by MnCO_3 exhibit an average longest and shortest diameter of around 850 nm and 600 nm, respectively. The apparent average size of MnCO_3 templated protein particles after dissolution is around 700 nm measured by dynamic light scattering.

The metal carbonate particles and protein particles after dissolution of the inorganic templates were additionally investigated with TEM (Fig. 4). The inner cavities in the CaCO_3 microparticles are clearly visible, which indicates the porous structure of CaCO_3 microparticles (Fig. 4A and B). The protein particles after CaCO_3 template removal showed uniform distribution of proteins within the particle (Fig. 4C). Unlike CaCO_3 particles, MnCO_3 particles are more compact (Fig. 4D and E). The primary MnCO_3 nanoparticles are clearly smaller (Fig. 4E). Proteins are also uniformly distributed in the whole volume of the MnCO_3 templated protein particles after dissolution (Fig. 4F). Additional TEM overview images of CaCO_3 and MnCO_3 microparticles are shown in Figs. S3 and S4.

The zeta potential of metal carbonate particles and protein particles after dissolution of metal carbonate were measured in physiological saline (0.9% NaCl). In physiological saline, the zeta potential was slightly negative for CaCO_3 particles and slightly positive for MnCO_3 particles. The pure protein particles after preparation with CCD technique exhibited a negative zeta potential (Table 2). In physiological saline, the BSA-MP, BSA-HA-MP and Hb-HA-MP are stable and did not aggregate. The CaCO_3 and MnCO_3 particles without protein are not stable as suspension. They aggregate in hours and recrystallize. Pure Hb particles templated on MnCO_3 are less stable than albumin and mixed particles due to their low zeta potential.

3.4. The influence of HA

Protein-HA-MP using the CCD technique were also prepared. GA and DVS are used as cross-linking agents. GA is widely used cross-linker for proteins. During the cross-linking the aldehyde groups

react with e.g. amino groups of proteins to form imine (Schiff base) [49]. DVS reacts with the OH groups of HA to give sulfonyl bis-ethyl crosslinks [50]. DVS can also reacts with amino groups of proteins [51]. In our case, GA is not able to crosslink HA to form microparticles. DVS alone did not give us sufficient cross-linking with retained protein (Hb) function of oxygen release (Data not shown). Therefore GA and DVS both were used together for cross-linking. A very interesting morphology of Hb-HA particles templated by CaCO_3 was observed. Non-uniform distribution of Hb was found in these rose shaped particles (Fig. 5A and B). The size of these Hb-HA particles was usually more than 5 μm .

As mentioned above, the morphology and size of CaCO_3 particles strongly depend on the precipitation conditions [10,13,15,26,27,31,42–46]. It is known that the crystallization process of CaCO_3 is influenced by the presence of some polymers, especially acidic polymers [26–28,32,52]. The carboxyl groups of acidic polymers can bind Ca^{2+} coordinatively [26,53–55]. HA is an acidic polysaccharide with high water binding capacity [34]. Cross-linked HA is also able to bind large quantities of water and to swell [50,56]. Hb is a globular protein having an isoelectric point of pH 6.8 [57]. It is not an acidic polymer. It is very likely that segregation takes place during the co-precipitation of Hb and HA with CaCO_3 . During the co-precipitation, the Hb entrapment efficiency was strongly influenced by HA, the amount of captured Hb was reduced under presence of HA (Table 3). Furthermore, the cross-linked HA in particles can swell during the washing steps after carbonate template dissolution and replace the Hb, which resulted in the interesting rose like structure of CaCO_3 templated Hb-HA particles. In the CLSM image of rose like Hb-HA-MP_{Ca} (Fig. 5A), the Hb has green auto fluorescence due to the GA cross-linking, while the HA has no auto fluorescence after DVS cross-linking. This phenomenon, however, was not observed in CaCO_3 templated BSA-HA Particles (Fig. 5C). BSA has a similar size as Hb but a lower isoelectric point (pH 4.8) [57] which means there are more anionic compounds. BSA has a more hydrophilic character compared to Hb [57]. Probably due to these properties of BSA unlike Hb, the

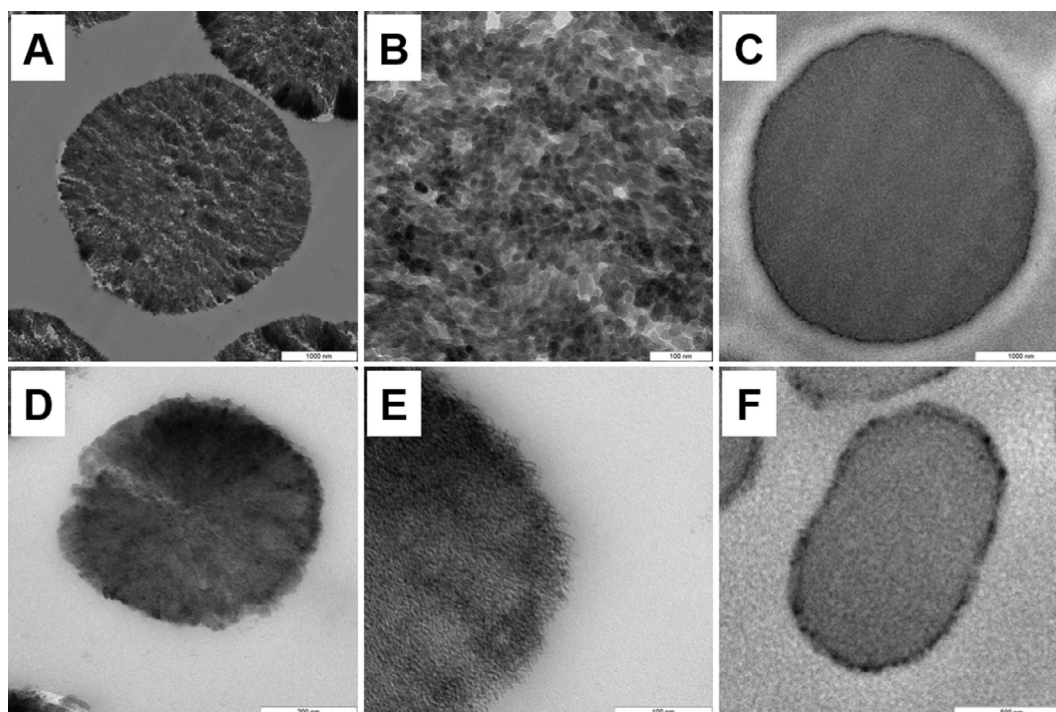


Fig. 4. TEM images of (A) CaCO_3 particles, (B) magnified image of (A), (C) Hb-MP_{Ca}, (D) MnCO_3 particle, (E) magnified image of (D), (F) Hb-MP_{Mn}. Scale bars: (A, C) 1000 nm, (B, E) 100 nm, (D) 200 nm, (F) 500 nm.

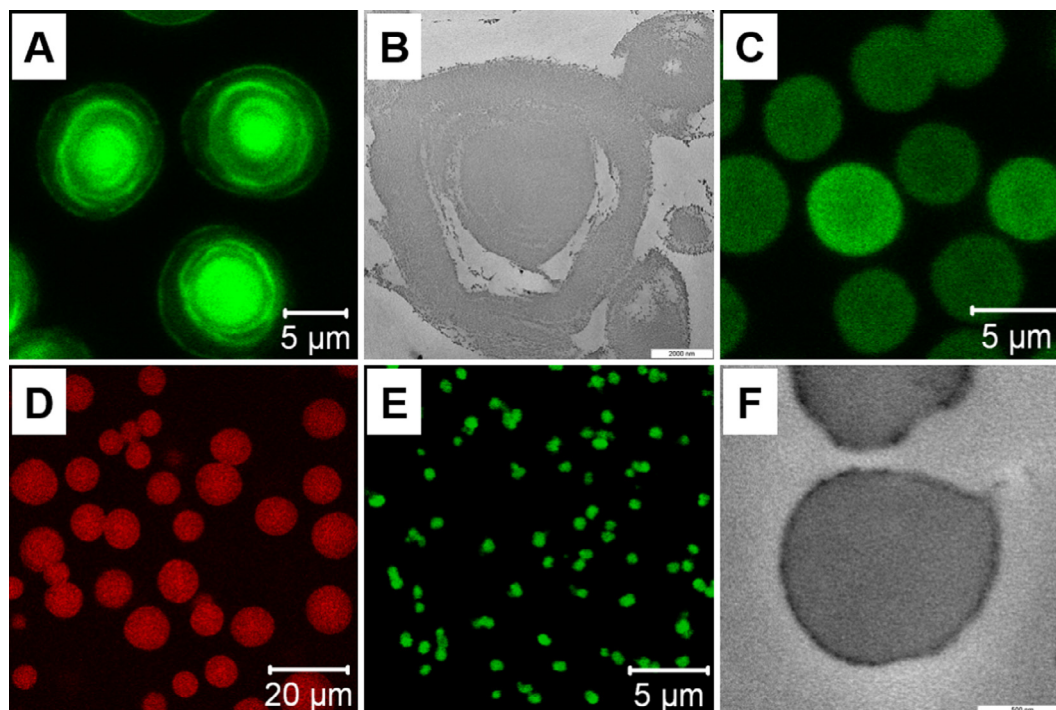


Fig. 5. Influence of HA on particle formation. (A) Confocal images of Hb-HA-MP_{Ca}; (B) TEM image of Hb-HA-MP_{Ca}; (C) confocal images of BSA-HA-MP_{Ca}; (D) confocal images of CaCO₃ templated pure HA particles, the particles were stained with rhodamine 6G; (E) confocal images of Hb-HA-MP_{Mn}; (F) TEM image of Hb-HA-MP_{Mn}. Micrographs show images after dissolution of carbonate templates, HA weight ratio to protein of 1:10 was used for precipitation step. The fluorescence of A, C and E were auto fluorescence due to the GA cross-linking of proteins. The different fluorescent distribution in C was due to the auto fluorescence bleaching during the observation.

Table 3
Influence of HA on Hb^a entrapment efficiency in CaCO₃ and MnCO₃ particles.

Samples	Hb captured [g/mol carbonate]
Hb with CaCO ₃	8.0 ± 0.2
Hb-HA (20:1) with CaCO ₃	6.3 ± 0.6
Hb-HA (10:1) with CaCO ₃	3.8 ± 0.7
Hb with MnCO ₃	32.1 ± 0.9
Hb-HA (20:1) with MnCO ₃	30.6 ± 0.5
Hb-HA (10:1) with MnCO ₃	29.6 ± 0.7

^a Initial concentration of Hb in 0.25 M MnCl₂ or CaCl₂ was 15 mg mL⁻¹.

BSA and HA were homogeneously co-precipitated with CaCO₃. The pure HA particles can only be obtained by CaCO₃ templating with a broad size distribution from 5 to 20 μm (Fig. 5d) due to the interaction of Ca²⁺ with HA. In the presence of protein, HA can also be captured by MnCO₃ (Fig. 5E). The Hb-MP_{Mn} had a zeta potential of about -4.3 mV in physiological saline (Table 2). The zeta potential of Hb-HA-MP_{Mn} was around -20 mV (Table 2), which indicates that at least a part of HA was adsorbed on the particle surface, since HA is a negative charged polysaccharide [34]. Unlike Hb-HA-MP_{Ca}, Hb was homogeneously distributed in Hb-HA-MP_{Mn} (Fig. 5D and F). The Hb entrapment efficiency of MnCO₃ was only slightly influenced by HA (Table 3). The HA interacts with Mn²⁺ weaker than with Ca²⁺ [58]. Due to the strong binding of Mn²⁺ with protein the protein was most likely first co-precipitated and the HA was only partly adsorbed on the particle surface. The formation of MnCO₃ templated protein particles (by co-precipitation of proteins with MnCl₂ and Na₂CO₃) is more robust and more resistant against HA compared to CaCO₃ templated protein particles.

Due to the different binding abilities of metal ions with proteins and HA, different particles with different properties e.g. size, shape, protein capture efficiency can be obtained by means of the CCD technique. Generally, protein particle fabrication using MnCO₃

templates by mixing MnCl₂ and Na₂CO₃ is more robust in terms of preparation process and provides a higher protein entrapment efficiency because of higher binding abilities of Mn²⁺ with protein compared to using CaCO₃ templates. In the presence of HA, protein particle fabrication using MnCO₃ templates was less influenced in terms of size, shape and protein entrapment due to the weak interaction of Mn²⁺ with HA; protein particle fabrication using CaCO₃ templates was strongly influenced in terms of size, shape and protein entrapment due to the strong interaction of Ca²⁺ with HA.

4. Conclusions

On the basis of previous reports [23,24], protein/biopolymer particles have been fabricated by simple CCD technique using different templates. The particles were investigated in terms of their morphological and physicochemical properties. Particle properties exhibit huge differences between co-precipitation with CaCO₃ and co-precipitation with MnCO₃ due to the different binding abilities of metal ions with polymers. Particle fabrication using MnCO₃ templates by mixing MnCl₂ and Na₂CO₃ is more robust and results in almost uniform peanut shaped submicron particles independent of the stirring rate in the range from 200 RPM to 600 RPM during the co-precipitation and especially high protein entrapment due to the strong interaction of Mn²⁺ with proteins. Particle fabrication using CaCO₃ templates is more sensitive to co-precipitation conditions and has more flexibility. The particle size using CaCO₃ templates varies from 2 to 20 μm depending on precipitation conditions. The protein capture by co-precipitation with CaCO₃ is lower than it is with MnCO₃. HA influences the properties of CaCO₃ templated particles stronger due to the stronger binding ability of Ca²⁺ with HA [26,53–55]. In the case of Hb-HA-MP_{Ca} rose shaped particles can be made. Both particle types are promising colloidal carrier systems for pharmaceutical and biomedical applications.

Funding

EFRE-ProFIT 10139827.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment

We thank Dr. Dimitriya Borisova for SEM imaging and Ms. Rona Pitschke (Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces, Golm, Germany) for TEM imaging. We acknowledge the financial support of the European Community (EFRE-ProFIT 10139827).

Appendix A. Supplementary material

Additional SEM and TEM images of CaCO₃ and MnCO₃ microparticles. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.12.030>.

References

- [1] D.S. Kohane, Microparticles and nanoparticles for drug delivery, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 203–209, <https://doi.org/10.1002/bit.21301>.
- [2] D.F. Emerich, C.G. Thanos, Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis, *J. Drug Target.* 15 (2007) 163–183, <https://doi.org/10.1080/10611860701231810>.
- [3] W. Tong, X. Song, C. Gao, Layer-by-layer assembly of microcapsules and their biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 6103, <https://doi.org/10.1039/c2cs35088b>.
- [4] D. Lensen, D.M. Vriezema, J.C.M. van Hest, Polymeric microcapsules for synthetic applications, *Macromol. Biosci.* 8 (2008) 991–1005, <https://doi.org/10.1002/mabi.200800112>.
- [5] L. Li, X. Zhao, C. Yang, H. Hu, M. Qiao, D. Chen, Preparation and optimization of doxorubicin-loaded albumin nanoparticles using response surface methodology, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37 (2011) 1170–1180, <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.563781>.
- [6] B. von Storp, A. Engel, A. Boeker, M. Ploeger, K. Langer, Albumin nanoparticles with predictable size by desolvation procedure, *J. Microencapsul.* 29 (2012) 138–146, <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.635218>.
- [7] M. Rawat, D. Singh, S. Saraf, S. Saraf, Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides, *Yakugaku Zasshi* 128 (2008) 269–280, <https://doi.org/10.1248/yakushi.128.269>.
- [8] R. Vehring, Pharmaceutical particle engineering via spray drying, *Pharm. Res.* 25 (2008) 999–1022, <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9475-1>.
- [9] J. Zhao, C.-S. Liu, Y. Yuan, X.-Y. Tao, X.-Q. Shan, Y. Sheng, F. Wu, Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers, *Biomaterials* 28 (2007) 1414–1422, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.012>.
- [10] D.V. Volodkin, N.I. Larionova, G.B. Sukhorukov, Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1962–1972, <https://doi.org/10.1021/bm049669e>.
- [11] B.V. Parakhonskiy, A.M. Yashchenok, M. Konrad, A.G. Skirtach, Colloidal micro- and nano-particles as templates for polyelectrolyte multilayer capsules, *Adv. Colloid Interface Sci.* 207C (2014) 253–264, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.01.022>.
- [12] D. Volodkin, CaCO₃ templated micro-beads and -capsules for bioapplications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 207C (2014) 306–324, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.04.001>.
- [13] G.B. Sukhorukov, D.V. Volodkin, A.M. Günther, A.I. Petrov, D.B. Shenoy, H. Möhwald, Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2073–2081, <https://doi.org/10.1039/b402617a>.
- [14] A. Yashchenok, B. Parakhonskiy, S. Donatan, D. Kohler, A. Skirtach, H. Möhwald, Polyelectrolyte multilayer microcapsules templated on spherical, elliptical and square calcium carbonate particles, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 1223–1228, <https://doi.org/10.1039/c2tb00416j>.
- [15] H. Zhu, E.W. Stein, Z. Lu, Y.M. Lvov, M.J. McShane, Synthesis of size-controlled monodisperse manganese carbonate microparticles as templates for uniform polyelectrolyte microcapsule formation, *Chem. Mater.* 17 (2005) 2323–2328, <https://doi.org/10.1021/cm048229r>.
- [16] A.A. Antipov, D. Shchukin, Y. Fedutik, A.I. Petrov, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald, Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 224 (2003) 175–183, [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00195-X).
- [17] A.I. Petrov, D.V. Volodkin, G.B. Sukhorukov, Protein-calcium carbonate coprecipitation: a tool for protein encapsulation, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 918–925, <https://doi.org/10.1021/bp0495825>.
- [18] X. Song, H. Li, W. Tong, C. Gao, Fabrication of triple-labeled polyelectrolyte microcapsules for localized ratiometric pH sensing, *J. Colloid Interface Sci.* 416 (2014) 252–257, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.11.008>.
- [19] W. Tong, S. She, L. Xie, C. Gao, High efficient loading and controlled release of low-molecular-weight drugs by combination of spontaneous deposition and heat-induced shrinkage of multilayer capsules, *Soft Matter* 7 (2011) 8258, <https://doi.org/10.1039/c1sm05171g>.
- [20] H. Bäuml, R. Georgieva, Micro-particles, Blood-substitute and Method for Forming Same, EP 2014280A1, 2007. <<https://register.epo.org/application?number=EP07112474>> (accessed May 3, 2013).
- [21] H. Bäuml, R. Georgieva, Coupled enzyme reactions in multicompartment microparticles, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1480–1487, <https://doi.org/10.1021/bm1001125>.
- [22] W.C. Mak, R. Georgieva, R. Renneberg, H. Bäuml, Protein particles formed by protein activation and spontaneous self-assembly, *Adv. Funct. Mater.* 20 (2010) 4139–4144, <https://doi.org/10.1002/adfm.201001205>.
- [23] Y. Xiong, A. Steffen, K. Andreas, S. Müller, N. Sternberg, R. Georgieva, H. Bäuml, Hemoglobin-based oxygen carrier microparticles: synthesis, properties, and in vitro and in vivo investigations, *Biomacromolecules* 13 (2012) 3292–3300, <https://doi.org/10.1021/bm301085x>.
- [24] Y. Xiong, Z.Z. Liu, R. Georgieva, K. Smuda, A. Steffen, M. Sendeski, A. Voigt, A. Patzak, H. Bäuml, Nonvasoconstrictive hemoglobin particles as oxygen carriers, *ACS Nano* 7 (2013) 7454–7461, <https://doi.org/10.1021/nn402073n>.
- [25] H. Bäuml, Y. Xiong, Z.Z. Liu, A. Patzak, R. Georgieva, Novel hemoglobin particles-promising new-generation hemoglobin-based oxygen carriers, *Artif. Organs.* 38 (2014) 708–714, <https://doi.org/10.1111/aor.12331>.
- [26] H. Cölfen, Precipitation of carbonates: recent progress in controlled production of complex shapes, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 23–31, <https://doi.org/10.1016/S1359-0294>.
- [27] F.C. Meldrum, H. Cölfen, Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4332–4432, <https://doi.org/10.1021/cr8002856>.
- [28] H. Cölfen, M. Antonietti, Mesocrystals: inorganic superstructures made by highly parallel crystallization and controlled alignment, *Angew. Chemie Int. Ed.* 44 (2005) 5576–5591, <https://doi.org/10.1002/anie.200500496>.
- [29] D. Gebauer, H. Cölfen, A. Verch, M. Antonietti, The multiple roles of additives in CaCO₃ crystallization: a quantitative case study, *Adv. Mater.* 21 (2009) 435–439, <https://doi.org/10.1002/adma.200801614>.
- [30] D. Gebauer, A. Verch, H.G. Börner, H. Cölfen, Influence of selected artificial peptides on calcium carbonate precipitation – a quantitative study, *Cryst. Growth Des.* 9 (2009) 2398–2403, <https://doi.org/10.1021/cg801292p>.
- [31] N. Koga, Y. Nakagoe, H. Tanaka, Crystallization of amorphous calcium carbonate, *Thermochim. Acta* 318 (1998) 239–244, [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(98\)00348-7](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(98)00348-7).
- [32] M.A. Bewernitz, D. Gebauer, J. Long, H. Cölfen, L.B. Gower, A metastable liquid precursor phase of calcium carbonate and its interactions with polyspartate, *Faraday Discuss.* 159 (2012) 291–312, <https://doi.org/10.1039/c2fd20080e>.
- [33] C. Zhong, C.C. Chu, Acid polysaccharide-induced amorphous calcium carbonate (ACC) films: colloidal nanoparticle self-organization process, *Langmuir* 25 (2009) 3045–3049, <https://doi.org/10.1021/la803541m>.
- [34] T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, Hyaluronan, *FASEB J.* 6 (1992) 2397–2404 (accessed June 15, 2012) <<http://www.fasebj.org/content/6/7/2397.short>>.
- [35] A. Szarpak, D. Cui, F. Dubreuil, B.G. De Geest, L.J. De Cock, C. Picart, R. Auzély-Velty, Designing hyaluronic acid-based layer-by-layer capsules as a carrier for intracellular drug delivery, *Biomacromolecules* 11 (2010) 713–720, <https://doi.org/10.1021/bm9012937>.
- [36] B. Ramalapa, O. Crasson, M. Vandevenne, A. Gibaud, E. Garcion, T. Cordonnier, M. Galleni, F. Boury, Protein-polysaccharide complexes for enhanced protein delivery in hyaluronic acid templated calcium carbonate microparticles, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 7360–7368, <https://doi.org/10.1039/C7TB01538K>.
- [37] C.R. Haney, P.W. Buehler, A. Gulati, Purification and chemical modifications of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 40 (2000) 153–169, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00047-2).
- [38] V. Privman, D. Goia, J. Park, E. Matijević, Mechanism of formation of monodispersed colloids by aggregation of nanosize precursors, *J. Colloid Interface Sci.* 213 (1999) 36–45, <https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6106>.
- [39] M. Ocaña, R. Rodríguez-Clemente, C.J. Serna, Uniform colloidal particles in solution: Formation mechanisms, *Adv. Mater.* 7 (1995) 212–216, <https://doi.org/10.1002/adma.19950070225>.
- [40] A.S. Mildvan, M. Cohn, Magnetic resonance studies of the interaction of the manganese ion with bovine serum albumin*, *Biochemistry* 2 (1963) 910–919, <https://doi.org/10.1021/bi00905a003>.
- [41] K.O. Pedersen, Binding of calcium to serum albumin. I. Stoichiometry and intrinsic association constant at physiological pH, ionic strength, and temperature, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 28 (1971) 459–469, <https://doi.org/10.3109/00365517109095724>.
- [42] D. Horn, J. Rieger, Organic nanoparticles in the aqueous phase-theory, experiment, and use, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 4330–4361 (accessed March 5, 2014) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12404417>>.
- [43] T. Kato, T. Suzuki, T. Amamiya, T. Irie, M. Komiya, H. Yui, Effects of macromolecules on the crystallization of CaCO₃ the formation of organic/inorganic composites, *Supramol. Sci.* 5 (1998) 411–415, [https://doi.org/10.1016/S0968-5677\(98\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0968-5677(98)00041-8).

- [44] M. Kitamura, Crystallization and transformation mechanism of calcium carbonate polymorphs and the effect of magnesium ion, *J. Colloid Interface Sci.* 236 (2001) 318–327, <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7398>.
- [45] S.M. Pourmortazavi, M. Rahimi-Nasrabadi, A.A. Davoudi-Dehaghani, A. Javidan, M.M. Zahedi, S.S. Hajimirsadeghi, Statistical optimization of experimental parameters for synthesis of manganese carbonate and manganese oxide nanoparticles, *Mater. Res. Bull.* 47 (2012) 1045–1050, <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.12.048>.
- [46] X. Duan, J. Lian, J. Ma, T. Kim, W. Zheng, Shape-controlled synthesis of metal carbonate nanostructure via ionic liquid-assisted hydrothermal route: the case of manganese carbonate, *Cryst. Growth Des.* 10 (2010) 4449–4455, <https://doi.org/10.1021/cg1006567>.
- [47] W. Tong, C. Gao, Selective removal of particle cores to fabricate manganese carbonate hollow spheres and composite microcapsules, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 295 (2007) 233–238, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.09.005>.
- [48] R. Beck, J.-P. Andreassen, Spherulitic growth of calcium carbonate, *Cryst. Growth Des.* 10 (2010) 2934–2947, <https://doi.org/10.1021/cg901460g>.
- [49] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques*. 37 (2004) 790–802 (accessed July 5, 2017) <http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00037/BTN_A_04375RV01_O_37190a.pdf>.
- [50] M.N. Collins, C. Birkinshaw, Investigation of the swelling behavior of crosslinked hyaluronic acid films and hydrogels produced using homogeneous reactions, *J. Appl. Polym. Sci.* 109 (2008) 923–931, <https://doi.org/10.1002/app.27631>.
- [51] E. Ilan, P.G. Morton, T.M.S. Chang, The anaerobic reaction of bovine hemoglobin with divinyl sulfone: structural changes and functional consequences, *Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1163 (1993) 257–265, [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90160-S](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90160-S).
- [52] H. Cölfen, S. Mann, Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 2350–2365, <https://doi.org/10.1002/anie.200200562>.
- [53] J. Rieger, T. Frechen, G. Cox, W. Heckmann, C. Schmidt, J. Thieme, Precursor structures in the crystallization/precipitation processes of CaCO₃ and control of particle formation by polyelectrolytes, *Faraday Discuss.* 136 (2007) 265–277, <https://doi.org/10.1039/b701450c>.
- [54] L.A. Gower, D.A. Tirrell, Calcium carbonate films and helices grown in solutions of poly(aspartate), *J. Cryst. Growth.* 191 (1998) 153–160, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(98\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(98)00002-5).
- [55] W.T. Winter, S. Arnott, Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing, *J. Mol. Biol.* 117 (1977) 761–784, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90068-7).
- [56] C.B. Shah, S.M. Barnett, Swelling behavior of hyaluronic acid gels, *J. Appl. Polym. Sci.* 45 (1992) 293–298, <https://doi.org/10.1002/app.1992.070450211>.
- [57] D.A. Musale, S.S. Kulkarni, Relative rates of protein transmission through poly (acrylonitrile) based ultrafiltration membranes, *J. Memb. Sci.* 136 (1997) 13–23, [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(97\)00179-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(97)00179-8).
- [58] G. Furth, R. Knierim, V. Buss, C. Mayer, Binding of bivalent cations by hyaluronate in aqueous solution, *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 33–40, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.09.001>.

Publikation 3

Kao, I.; Xiong, Y.; Steffen, A.; Smuda, K.; Zhao, L.; Georgieva, R.; Pruss, A.; Bäuml, H.,
Preclinical In Vitro Safety Investigations of Submicron Sized Hemoglobin Based Oxygen Carrier
HbMP-700, *Artificial organs*, 2018, 42 (5), 549–559. <https://doi.org/10.1111/aor.13071>

Seiten: 59 - 69

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Publikationsliste

1. **Steffen, A.**; Xiong, Y.; Georgieva, R.; Kalus, U.; Bäumlner, H., Bacterial safety study of the production process of hemoglobin-based oxygen carriers, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2022**, 13, 114-126, <https://doi.org/10.3762/bjnano.13.8>; IF: 3.649 (2020)
2. Kaewprayoon, W.; Suwannasom, N.; Kloypan, C.; **Steffen, A.**; Xiong, Y.; Schellenberger, E.; Pruß, A.; Georgieva, R.; Bäumlner, H. *International journal of molecular sciences* **2020**, 21 (23), 8978. doi:10.3390/ijms21238978; IF: 5.923 (2020)
3. Prapan, A.; Suwannasom, N.; Kloypan, C.; Chaiwaree, S.; **Steffen, A.**; Xiong, Y.; Kao, I.; Pruß, A.; Georgieva, R.; Bäumlner, H. *Coatings* **2019**, 9 (7), 454. doi:10.3390/coatings9070454; IF: 2.330 (2019)
4. Kloypan, C.; Prapan, A.; Suwannasom, N.; Chaiwaree, S.; Kaewprayoon, W.; **Steffen, A.**; Xiong, Y.; Baisaeng, N.; Georgieva, R.; Bäumlner, H. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2018**, 46 (sup3), S964-S972. doi:10.1080/21691401.2018.1521819; IF: 4.462 (2018)
5. Kao, I.; Xiong, Y.; **Steffen, A.**; Smuda, K.; Zhao, L.; Georgieva, R.; Pruss, A.; Bäumlner, H. *Artificial organs* **2018**, 42 (5), 549–559. doi:10.1111/aor.13071; IF: 2,379 (2018)
6. Xiong, Y.; Georgieva, R.; **Steffen, A.**; Smuda, K.; Bäumlner, H. *Journal of colloid and interface science* **2018**, 514, 156–164. doi:10.1016/j.jcis.2017.12.030; IF: 5,091 (2018)
7. Koziol, M. J.; Sievers, T. K.; Smuda, K.; Xiong, Y.; Müller, A.; Wojcik, F.; **Steffen, A.**; Dathe, M.; Georgieva, R.; Bäumlner, H. *Macromolecular bioscience* **2014**, 14 (3), 428–439. doi:10.1002/mabi.201300363; IF: 3.238 (2016)
8. Xiong, Y.; Liu, Z. Z.; Georgieva, R.; Smuda, K.; **Steffen, A.**; Sendeski, M.; Voigt, A.; Patzak, A.; Bäumlner, H. *ACS nano* **2013**, 7 (9), 7454–7461. doi:10.1021/nn402073n; IF: 13.942 (2016)
9. Xiong, Y.; **Steffen, A.**; Andreas, K.; Müller, S.; Sternberg, N.; Georgieva, R.; Bäumlner, H. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (10), 3292–3300. doi:10.1021/bm301085x; IF: 5.246 (2016)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich hier aufrichtig bei Prof. Dr. Hans Bäuml er für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Im April 2008 gab er mir die Möglichkeit, meine Masterarbeit in seiner Forschungsabteilung am Institut für Transfusionsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin zu bearbeiten. In der Folge war meine Arbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter und Gastwissenschaftler in verschiedenen Konstellationen immer eng mit ihm und seiner Arbeitsgruppe verbunden. Bis heute stand er mir jederzeit unterstützend zur Seite. Seine Erfahrung, Wissen und Motivation halfen mir in meinem Berufsleben bis heute und führten in vielen fruchtbaren Diskussionen zum Abschluss dieser Arbeit. Es war eine wilde Reise; danke Hans.

Ähnliches gilt für Frau Prof. Dr. Radostina Georgieva. Auch ihrer Unterstützung konnte ich mir in der gesamten Zeit sicher sein. Ich möchte ihr für ihre kontinuierliche Hilfe und die wertvollen Anregungen nachdrücklich danken.

Auch danke ich Prof. Dr. Axel Pruß für die Unterstützung meiner Arbeit am Institut für Transfusionsmedizin.

Besonderer Dank gilt Dr. Yu Xiong. Seit 2009 arbeiteten wir eng und vertrauensvoll zusammen. Jederzeit hat er mich in zielführenden Diskussionen und mit seinen Anregungen unterstützt.

Weiter danke ich den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Bäuml er. Besonders hervorzuheben sind dabei Josephine Müller und Stefanie Dolling. Danke für die fortwährende praktische Unterstützung im Labor.

Ich danke meiner Familie, besonders meinen Eltern Verena und Jörg Neumeister, ohne die mein Studium und damit mein weiterer Weg nicht möglich gewesen wäre sowie meinem Bruder Holger Steffen. Insbesondere für die moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danke ich meinen Freunden, hier besonders Dr. Kathleen Dahncke, Dr. Frank Wenke und Christian Daubitz.