

**Entwicklung peptidischer oberflächen-
modifizierter nanopartikulärer Trägersysteme
für Antisense-Wirkstoffe und präklinische
Testung gegen HIV**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Pharmazie und
Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main**

**von
Conrad Coester
aus Neuhof**

Frankfurt an Main, 2000

| | |
|--|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 2 THEORETISCHER TEIL | 5 |
| 2.1 Der humane Immundefizienz-Virus | 5 |
| 2.1.1 Der Ursprung von HIV-1 und -2 nach heutigem Stand der Wissenschaft | 5 |
| 2.1.2 Immunologischer Verlauf einer HIV-Infektion | 6 |
| 2.1.3 Persistieren von HIV im lymphatischen Gewebe | 9 |
| 2.1.4 Makrophagen als Virusreservoir | 11 |
| 2.1.5 Antiretrovirale Therapie (ART) der HIV-Infektion | 13 |
| 2.2 Peptide-Nucleic-Acids (PNA) | 15 |
| 2.2.1 Einführung | 15 |
| 2.2.1.1 Chemische Eigenschaften der PNAs | 16 |
| 2.2.1.2 Synthese der PNA-Monomere | 17 |
| 2.2.1.3 Synthese der Oligomere | 17 |
| 2.2.1.4 Stabilität der PNAs | 18 |
| 2.2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung von PNAs | 18 |
| 2.2.3 Biochemische Effekte von PNAs | 19 |
| 2.2.3.1 Hybridisierung | 19 |
| 2.2.3.2 Aktivitätsstudien | 20 |
| 2.2.3.3 Antisense-Aktivität | 21 |
| 2.2.3.4 Zell- bzw. Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit | 23 |
| 2.2.4 Derzeitige Stellung der PNAs in der HIV-Therapie | 24 |
| 2.3 Nanopartikel | 25 |
| 2.3.1 Definition und Allgemeines | 25 |
| 2.3.2 Aufgaben und Funktion des retikuloendothelialen Systems (RES) | 27 |
| 2.3.3 Drug Targeting | 27 |
| 2.3.3.1 Definition | 28 |
| 2.3.3.2 Drug Targeting mit Nanopartikeln | 29 |
| 2.3.4 Herstellung und Aufbau von Gelatine und Albumin | 31 |
| 2.3.4.1 Albumin | 32 |
| 2.3.4.2 Gelatine | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.5 Herstellungsmethoden | 34 |
| 2.3.5.1 Herstellung von Nano-/Mikropartikeln in einem Zweiphasensystem | 35 |
| 2.3.5.1.1 Albumin-Partikel | 35 |
| 2.3.5.1.2 Gelatine-Partikel | 35 |
| 2.3.5.2 Partikelbildung durch Desolvatation | 37 |
| 2.3.5.2.1 Albumin-Partikel | 38 |
| 2.3.5.2.2 Gelatine-Partikel | 39 |
| 2.3.6 Anwendung von Nanopartikeln | 41 |
| 2.3.6.1 HIV-Therapeutika | 41 |
| 2.3.6.2 Protein-Nano- und Mikropartikel | 44 |
| 2.3.6.2.1 Zytostatika | 44 |
| 2.3.6.2.2 Glaukom-Behandlung | 46 |
| 2.3.6.2.3 Diagnostika | 46 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 49 |
| 3.1 Saatvirusstamm | 49 |
| 3.2 Antisense-Wirkstoffe | 49 |
| 3.2.1 Antisense-Struktur gegen HIV-1 117 _{DIII} | 49 |
| 3.2.2 Eingesetzte PNAs | 50 |
| 3.2.3 Eingesetzte Phosphorothioate | 50 |
| 3.3 Analytik | 51 |
| 3.3.1 Analytik der verwendeten PNAs | 51 |
| 3.3.1.1 Chemikalien, Materialien und Geräte | 51 |
| 3.3.1.2 Durchführung der HPLC | 51 |
| 3.3.1.3 Validierung der HPLC-analytischen Bestimmung | 52 |
| 3.3.1.4 Ultraschall-Stabilitätsuntersuchungen | 52 |
| 3.3.2 Gel-Permeation-Chromatographie (GPC) | 53 |
| 3.3.2.1 Chemikalien, Materialien, Geräte | 53 |
| 3.3.2.2 Durchführung der GPC | 54 |
| 3.3.2.3 Validierung der Methode zur Molekulargewichtsbetimmung | 54 |
| 3.3.3 Bestimmung der Sulfhydrylgruppen mit Ellman's Reagenz | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4 Partikelherstellung | 56 |
| 3.4.1 Chemikalien, Materialien, Geräte | 56 |
| 3.4.2 Gelatine-A-Nanopartikel | 57 |
| 3.4.2.1 Kopplung von Texas Red [®] an Gelatine-A-Nanopartikel | 57 |
| 3.4.2.2 Kopplung von Fluoreszeinamin an Gelatine-A-Nanopartikel | 58 |
| 3.4.2.3 Avidin-oberflächenmodifizierte Gelatine-A-Nanopartikel | 58 |
| 3.4.2.3.1 Quenchen der Gelatine-A-Nanopartikel mit Cystein | 58 |
| 3.4.2.3.2 Aktivierung und Aufreinigung von NeutrAvidin [®] | 59 |
| 3.4.2.3.3 Kopplung von aktiviertem Avidin an die Cystein-Gelatinepartikel | 59 |
| 3.4.2.3.4 Beladung von Avidin-Gelatine-Partikeln mit biotinylierter PNA | 59 |
| 3.4.2.3.5 Beladung von Avidin-Gelatine-Partikeln mit biotinyliertem Fluoreszein | 60 |
| 3.4.2.4 Kopplung von Cholamin-HCl an Gelatine-A-Nanopartikel | 60 |
| 3.4.3 Gelatine-B-Nanopartikel | 60 |
| 3.4.4 Nanopartikel aus humanem Serum-Albumin (HSA) | 61 |
| 3.4.4.1 Kopplung von Texas Red [®] an HSA-Nanopartikel | 61 |
| 3.4.4.2 Kopplung von Fluoreszeinamin an HSA-Nanopartikel | 62 |
| 3.4.5 Gelatinepartikel nach der Öl-Emulsionmethode | 62 |
| 3.4.6 Materialien und Geräte | 62 |
| 3.4.6.1 Durchführung | 63 |
| 3.4.7 Herstellung von Copolymer (SPM)-Nanopartikeln | 63 |
| 3.4.8 Herstellung von Polyhexylcyanoacrylat (PHCA)-Nanopartikeln | 63 |
| 3.5 Charakterisierung der Nanopartikel | 64 |
| 3.5.1 Gehaltsbestimmung der Nanopartikel-Dispersionen | 64 |
| 3.5.2 Bestimmung der Beladungsrate | 64 |
| 3.5.2.1 PNA | 64 |
| 3.5.2.2 Phosphorothioate | 65 |
| 3.5.3 Größencharakterisierung | 65 |
| 3.5.3.1 Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) | 66 |
| 3.5.3.1.1 Geräte und Methode | 66 |
| 3.5.3.2 Rasterelektronenmikroskopie | 67 |
| 3.5.4 Zeta-Potential-Bestimmung | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6 Toxizität der Nanopartikel | 69 |
| 3.6.1 Hämolysetest | 69 |
| 3.6.1.1 Materialien, Chemikalien und Geräte | 69 |
| 3.6.1.2 Isolierung der Erythrozyten | 69 |
| 3.6.1.3 Kalibrierung des Assays | 70 |
| 3.6.1.4 Durchführung | 70 |
| 3.6.2 MTT-Test | 71 |
| 3.6.2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte | 71 |
| 3.6.2.2 Durchführung des MTT-Tests | 71 |
| 3.7 Zellkultur | 72 |
| 3.7.1 Primäre Monozyten/Makrophagen | 72 |
| 3.7.1.1 Chemikalien, Materialien und Geräte | 73 |
| 3.7.1.2 Allgemeine Bedingungen und verwendete Medien | 74 |
| 3.7.1.3 Isolierung der Monozyten/Makrophagen | 75 |
| 3.7.1.4 Kultivierung primärer humaner Monozyten/Makrophagen | 76 |
| 3.7.1.4.1 Kultivierung in Mehrfachkulturschalen | 76 |
| 3.7.1.4.2 Kultivierung in LAB-TEK® Chamberslides | 78 |
| 3.7.1.5 Zellzahlbestimmung | 78 |
| 3.7.1.6 Infektion mit HIV <i>in vitro</i> | 79 |
| 3.7.1.7 Quantitative Virusbestimmung | 79 |
| 3.7.2 Kultivieren der Bronchialepithelzellen | 81 |
| 3.7.2.1 Primäre Bronchialepithelzellen (PBE-Zellen) | 81 |
| 3.7.2.2 Humane Bronchialepithelzellen (HBE-Zellen, Zelllinie) | 82 |
| 3.7.3 Phagozytose fluoreszenzmarkierter Nanopartikel | 82 |
| 3.7.3.1 Chemikalien | 83 |
| 3.7.3.2 Durchführung in der Zellkultur | 83 |
| 3.7.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) | 84 |
| 3.7.4.1 Geräte, Methoden und Bedingungen | 84 |
| 3.7.4.2 Auswertung und Dokumentation | 86 |
| 3.8 Antivirale Wirksamkeit der Oligonukleotide | 87 |
| 3.8.1 Versuchsdurchführung in chronisch infizierten Zellen | 87 |
| 3.8.2 Auswertung | 88 |

| | |
|---|------------|
| 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 89 |
| 4.1 Analytik der PNAs | 89 |
| 4.1.1 Eichgerade für die eingesetzten PNAs | 89 |
| 4.1.1.1 Ergebnis der Stabilitätsuntersuchung | 90 |
| 4.2 Proteinanalytik | 91 |
| 4.2.1 Eichfunktion der Standardproteine | 92 |
| 4.2.2 Auswertung der Herstellungsmethode der Gelatinepartikel | 93 |
| 4.3 Beladungsscreening mit etablierten Trägersystemen | 95 |
| 4.4 Oberflächenmodifikationen der Nanopartikel | 96 |
| 4.4.1 Fluoreszenzmarkierung der Nanopartikel | 96 |
| 4.4.1.1 Kovalente Bindung von Fluoreszeinamin an Protein-Nanopartikel | 97 |
| 4.4.1.2 Kovalente Bindung von Texas Red® an Protein-Nanopartikel | 98 |
| 4.4.2 Bindung von Avidin auf die Nanopartikel-Oberfläche | 98 |
| 4.4.2.1 Avidin-Bindung an Gelatine-Nanopartikel | 99 |
| 4.4.2.2 Kopplung von Cholamin an Gelatine-Nanopartikel | 101 |
| 4.5 Charakterisierung der Nanopartikel | 102 |
| 4.5.1 SEM-Untersuchungen von Nanopartikeln | 102 |
| 4.5.2 Farbstoff-oberflächenmodifizierte Nanopartikel | 105 |
| 4.5.3 Avidin-oberflächenmodifizierte Nanopartikel | 106 |
| 4.5.3.1 Analytik der Sulfhydrylgruppen | 107 |
| 4.5.3.1.1 Eichgerade zur Sulfhydrylgruppenbestimmung | 107 |
| 4.5.3.1.2 Gehalt an Sulfhydrylgruppen von Gelatine-Nanopartikeln | 108 |
| 4.5.3.2 Analytik des gebundenen Avidins und der PNA-Bindung | 109 |
| 4.5.3.3 Analyse der maximalen Beladung von Gelatine-Nanopartikeln mit PNA | 110 |
| 4.5.3.4 Toxizität der Nanopartikel | 111 |
| 4.5.3.4.1 MTT-Test | 112 |
| 4.5.4 Cholamin-oberflächenmodifizierte Nanopartikel | 114 |
| 4.5.4.1 Validierung der Herstellung durch Bestimmung des Zetapotentials | 114 |
| 4.5.4.1.1 Anstieg des Zetapotentials während der Umsetzung | 114 |
| 4.5.4.1.2 pH-Wert-Abhängigkeit des Zetapotentials | 116 |
| 4.5.4.1.3 Zetapotential-Veränderung bei Beladung mit Phosphorothioaten | 117 |

| | |
|--|------------|
| 4.5.4.2 Stabilität der Beladung von GPD-EDC-CHOL mit Phosphorothioaten | 118 |
| 4.5.4.3 Toxizität der Nanopartikel | 119 |
| 4.6 Zelluläre Anreicherung peptidischer Nanopartikel | 122 |
| 4.6.1 Gelatine-Nanopartikel in humanen Monozyten/Makrophagen | 122 |
| 4.6.2 Gelatine-Nanopartikel in primären Bronchialepithel (PBE)-Zellen | 124 |
| 4.6.3 Albumin-Nanopartikel in primären Bronchialepithel (PBE)-Zellen | 125 |
| 4.6.4 Albumin-Nanopartikel in humanen Bronchialepithel (HBE)-Zellen | 127 |
| 4.6.5 Zellaufnahme von über Avidin-Biotin-Komplex gebundenen Fluoreszenzmarkern | 128 |
| 4.7 Antivirale Wirksamkeit der Zubereitungen in der Zellkultur | 130 |
| 4.7.1 Wirkung der Antisense-Sequenzen | 130 |
| 4.7.1.1 Gelöste Präparationen | 131 |
| 4.7.1.2 Partikuläre Präparationen | 133 |
| 4.7.1.2.1 SPM-Nanopartikel | 133 |
| 4.7.1.2.2 Gelatine-Nanopartikel | 134 |
| 4.7.1.3 Phosphorothioat Präparationen | 138 |
| 4.7.2 Vergleichende Darstellung der Antisense-Versuche | 140 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICKE | 143 |
| 5.1 Zusammenfassung | 143 |
| 5.1.1 Herstellung der Trägersysteme | 143 |
| 5.1.2 Zellaufnahme des Trägersystems | 144 |
| 5.1.3 Einsatz als HIV-Therapeutikum | 145 |
| 5.2 Ausblicke | 146 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS | 149 |
| 7 LEBENSLAUF | 157 |

| | |
|---|------------|
| 8 VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGREßBEITRÄGE | 159 |
| 8.1 Veröffentlichungen | 159 |
| 8.2 Kongreßbeiträge | 159 |
| 8.3 Vorträge | 160 |
| 8.4 Patente | 161 |