

Isoniazid@Fe₂O₃-Nanocontainer mit antibakterieller Wirkung auf Tuberkulose-Mykobakterien

Peter Leidinger, Jens Treptow, Kristine Hagens, Jacqueline Eich, Nicole Zehethofer, Dominik Schwudke, Wulf Oehlmann, Heinrich Lünsdorf, Oliver Goldmann, Ulrich E. Schaible,* Kurt E. J. Dittmar* und Claus Feldmann*

Professor Ulrich Müller zum 75. Geburtstag gewidmet

Abstract: Isoniazid-gefüllte, nanoskalige Fe₂O₃-Hohlkugeln (INH@Fe₂O₃, Durchmesser < 30 nm, 48 Gew.-% INH-Beladung) werden erstmals vorgestellt und für die Tuberkulose-Therapie vorgeschlagen. Nach Dextran-Funktionalisierung zeigen die INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainer hohe Aktivität gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb.) und M.tb.-infizierten Makrophagen. Die Nanocontainer können als „Trojanisches Pferd“ aufgefasst werden und zeigen effiziente, aktive Aufnahme in M.tb.-infizierte Makrophagen und sogar in mykobakterielle Zellen.

Tuberkulose (TB) gehört weltweit zu den am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten mit hoher Mortalität. So wurden 2013 etwa 9 Millionen TB-Erkrankungen mit 1.5 Millionen Todesfällen gemeldet.^[1] TB hat inzwischen wieder erhebliche Bedeutung in Verbindung mit HIV und infolge der besorgniserregenden multiresistenten (multidrug resistant, MDR) und extrem resistenten (extrem drug resistant, XDR) Isolate gewonnen.^[1,2] Weiterhin ist davon auszugehen, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung latent infiziert ist, wobei die Wahrscheinlichkeit eines akuten Verlaufs bei etwa 10% über die Lebenszeit liegt. Der pathogene Erreger, *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb.), befindet sich als fakultativ interzellulärer Parasit in Makrophagen eingekapselt in Granulome.^[3] Vor diesem Hintergrund stellt insbe-

sondere die latente Tuberkulose eine große Herausforderung dar.^[1,3]

Grundsätzlich stehen sehr wirksame Antibiotika wie Isoniazid (Isonikotinyldiazin, INH), Rifampicin (RIF), Pyrazinamid (PYZ) oder Ethambutol (ETB) für die TB-Therapie zur Verfügung.^[2,4] Allerdings müssen diese antimykobakteriellen Wirkstoffe nicht nur Granulom-Einkapselung und die Membran der Wirtsmakrophage, sondern auch die lipidreiche Zellwand der mykobakteriellen Zellen durchdringen. Weitere Einschränkungen betreffen die geringe Permeabilität in Biofilmen sowie den schnellen Abbau unter physiologischen Bedingungen bei geringer Dosis, aber schweren Nebenwirkungen bei höherer Dosis.^[2,4] Die TB-Therapie erfordert eine tägliche Dosis von bis zu 5 mg kg⁻¹ Körpergewicht über 6–9 Monate. Typische Nebenwirkungen sind dabei Hepatitis, Anämie, Krämpfe, Niereninsuffizienz, Ataxie oder allergische Überempfindlichkeit. Infolge der reduzierten Lebensqualität neigen Patienten jedoch zu vorzeitigem Therapieabbruch, woraus die Hauptgefahr für bakterielle Multiresistenzen resultiert.^[2–5]

Vor diesem Hintergrund sind kostengünstige und effiziente TB-Wirkstoffe und Verabreichungsformen erforderlich, um geringere Dosierungen und kürzere Behandlungsdauern zu erreichen und Nebenwirkungen zu vermeiden. Dies würde die Patientenzustimmung erhöhen und das Risiko therapeutischer Misserfolge und bakterieller Resistenzen minimieren.^[1–5] Nanomaterialien bieten generell bereits vielversprechende Strategien für Molekularbiologie und Medizin. So wurde deren Verwendung für neuartige Bildgebungstechniken^[6] oder die Tumorthherapie in den letzten Jahren bereits intensiv untersucht.^[7] Für die TB-Behandlung wären effiziente Transportsysteme zur Infiltration von Antibiotika in infizierte Zellen erforderlich. Derartige Transportsysteme sollten möglichst hohe Antibiotikagehalte aufweisen und zudem bioverträglich, leicht abbaubar und im besten Fall nach 2–3 Tagen vollständig ausgeschieden sein.^[8] Insgesamt wurden Nanomaterialien für die TB-Behandlung bislang wenig untersucht.^[9] Hier wurden SiO₂-^[10] und Polymernanopartikel^[11] mit TB-Antibiotika beschichtet oder beladen. Darüber hinaus wurde die intrinsische antibakterielle Wirkung von nanoskaligem Silber genutzt.^[12] Die Untersuchungen beziehen sich zumeist auf vergleichsweise große Partikel (> 50 nm) mit begrenzter Antibiotika-Beladung (< 10 Gew.-%).

[*] Dr. P. Leidinger, J. Treptow, Prof. Dr. C. Feldmann
Institut für Anorganische Chemie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Engesserstraße 15, 76131 Karlsruhe (Deutschland)
E-Mail: claus.feldmann@kit.edu

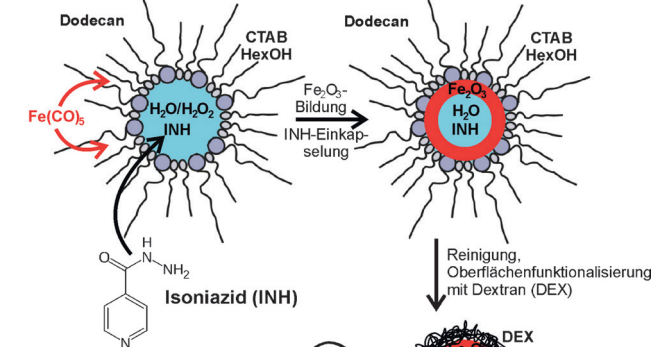
K. Hagens, J. Eich, Dr. N. Zehethofer, Dr. D. Schwudke,
Prof. Dr. U. E. Schaible
Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Bio-
wissenschaften, Priority Area Infections
Parkallee 1–40, 23845 Borstel (Deutschland)
E-Mail: uschaible@fz-borstel.de

Dr. W. Oehlmann
Lionex – Diagnostics and Therapeutics GmbH
Salzdahlumer Straße 196, 38126 Braunschweig (Deutschland)

Dr. H. Lünsdorf, Dr. O. Goldmann, Dr. K. E. J. Dittmar
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
E-Mail: kurt.dittmar@helmholtz-hzi.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505493> zu finden.

1. Mikroemulsions-Synthese der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer



2. Zellaufnahme und Freisetzung des INH

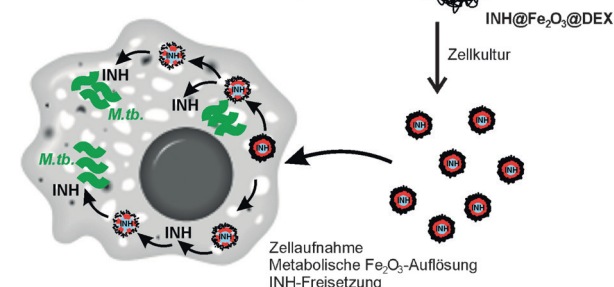


Abbildung 1. Illustration von Mikroemulsions-Synthese, Dextran-Funktionalisierung, Aufnahme von $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainern und INH-Freisetzung in *M.tb.*-infizierten Makrophagen.

Als neuartige Strategie schlagen wir Isoniazid-gefüllte Eisenoxid-Nanocontainer ($\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$) für die TB-Therapie vor. $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$ -Nanocontainer wurden über einen modifizierten Mikroemulsionsansatz synthetisiert (Abbildung 1).^[13] Dabei wurde eine inverse Mikroemulsion mit *n*-Dodecan als unpolare Dispersionsphase, Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als Tensid, *n*-Hexanol als Cotensid und verdünntes H_2O_2 (1.4 Vol.-%) als polare Phase verwendet. INH wurde zur Wasserphase zugegeben, wogegen $\text{Fe}(\text{CO})_5$ in der Dodecan-Phase der Mikroemulsion vorlag. Die nachfolgende H_2O_2 -bedingte Oxidation des $\text{Fe}(\text{CO})_5$ bei Raumtemperatur führt zur langsamen Bildung von bräunlichem Fe_2O_3 . Die Tatsache, dass $\text{Fe}(\text{CO})_5$ und H_2O_2 in unterschiedlichen Phasen gelöst vorliegen, begrenzt ihre Reaktion auf die Flüssig-Flüssig-Phasengrenze der Mizellen. Als Ergebnis werden die INH-haltigen Wassertröpfchen durch Fe_2O_3 unter Bildung der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$ -Nanocontainer eingekapselt (Abbildung 1). Mit $\text{Fe}(\text{CO})_5$ als stärkerem Reduktionsmittel wird die Oxidation des INH unterbunden und H_2O_2 durch Reaktion mit $\text{Fe}(\text{CO})_5$ vollständig verbraucht (siehe Hintergrundinformationen (SI): Abbildungen S1–S3).

Die Elektronenmikroskopie (SEM, STEM, HRTEM) zeigt eine einheitliche, sphärische Morphologie der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$ -Nanocontainer (Abbildung 2). Durch statistische Auswertung von 100 Partikeln kann ein mittlerer Durchmesser von 18(1) nm ermittelt werden (Abbildung 2A,B und SI: Abbildung S1A). STEM- und HRTEM-Abbildungen verdeutlichen die Struktur der Nanocontainer mit einem äußeren Durchmesser von 15–20 nm, einer Wandstärke von 2–4 nm und einem Durchmesser der inneren

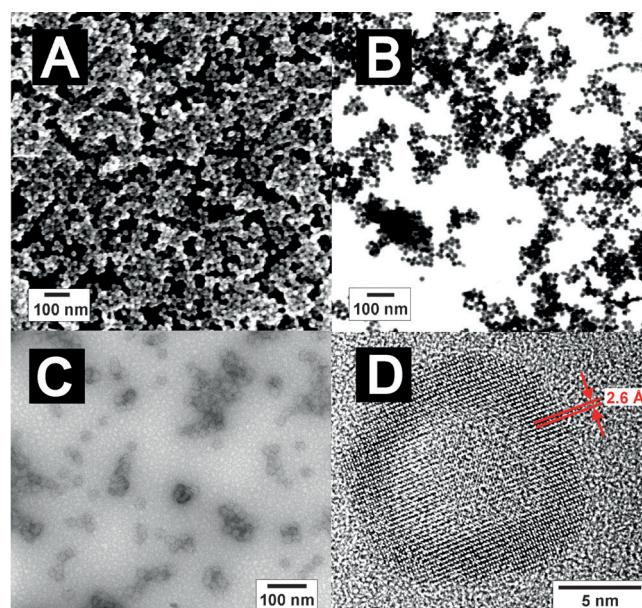


Abbildung 2. Partikelgröße und Größenverteilung von $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$ -Nanocontainern gemäß Elektronenmikroskopie bei unterschiedlichen Vergrößerungsstufen: A) SEM, B) STEM, C,D) HRTEM.

Kavität von 8–10 nm (Abbildung 2C,D). HRTEM verdeutlicht die Kristallinität der Kugelwand mit Gitterabständen von 2.6 Å (Volumenmaterial $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /Maghemit: $d(311)$ mit 2.52 Å) (Abbildung 2D).^[14]

Die chemische Zusammensetzung der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$ -Nanocontainer wurde mittels Infrarotspektroskopie (FT-IR), Thermogravimetrie (TG), Massenspektrometrie (MS), Elementaranalyse (EA), Pulverdiffraktometrie (XRD), Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) und energiedispersiver Röntgenanalyse (EDX) verifiziert. FT-IR und MS zeigen Schwingungen entsprechend dem charakteristischen Fingerabdruck sowie die Massenpeaks von INH (SI: Abbildung S2). Das Vorliegen von Fe_2O_3 wurde über HRTEM (Abbildung 2D), EDX, XRD, und EELS (SI: Abbildungen S3, S4, S6 und S7) belegt. Die INH-Beladung der Nanocontainer wurde über TG quantifiziert (SI: Abbildung S3). Demzufolge bestehen die Nanocontainer aus 9 Gew.-% Wasser und 48 Gew.-% INH in der inneren Kavität sowie 43 Gew.-% Fe_2O_3 als Kugelwand. Mit etwa der Hälfte des Gesamtgewichts ist die INH-Beladung im Vergleich zu bekannten Nanopartikelkonzepten für die TB-Therapie erheblich höher.^[9–12] Um Membranpermeabilität und Zellaufnahme zu erhöhen, wurden die $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$ -Nanocontainer weiterhin mit Dextran (DEX) funktionalisiert und in isotonischem Wasser redispersiert (Abbildung 1).^[15] Hier wurde Sephadex als quervernetztes hochmolekulares Dextran-Derivat verwendet (siehe SI). Die resultierenden $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer weisen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 26(2) nm nach der DEX-Funktionalisierung auf (SI: Abbildungen S1B,C und S5).

Bioverträglichkeit und Zellaufnahme der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer wurden in vitro nach Aufnahme in Säugetierzellen (d.h. murine Knochenmarks-

makrophagen, unreife humane dendritische Zellen, siehe SI) getestet. Diese Zellen zeichnen sich generell durch hohe Aufnahme von Nanopartikeln und schnelle Reaktion auf mutmaßlich toxische Verbindungen aus.^[16] Beide Zelltypen zeigen jedoch normale Lebensfähigkeit und Proliferationsraten nach Internalisierung von $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$. Die Reaktion der Makrophagen wurde hinsichtlich reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), induzierbarem Stickstoffmonoxid (iNOs) und freigesetzter Lactatdehydrogenase (LDH) quantifiziert (SI: Abbildungen S8 und S9). Obwohl aufgrund des Fe-Gehalts der Nanopartikel eine substantielle ROS-Bildung wie erwartet zu beobachten ist,^[17] belegen niedrige Werte für NO und LDH eine ausreichende Bioverträglichkeit der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer. Tatsächlich kann die ROS-Bildung in Abwesenheit zytotoxischer Effekte einen zusätzlichen antimikrobiellen Vorteil bei der TB-Abwehr darstellen, da diese sich auf die mykobakterielle Lebensfähigkeit auswirkt, gleichzeitig die Zellen aktiviert und die Zytokin-Sekretion immunstimuliert.^[3,18]

Um die Aufnahme der Nanocontainer in Makrophagen zu belegen, wurden Zellen auf Kunststoffoberflächen fixiert und „en Face“ in parallele Bereiche geschnitten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass das Zytoplasma der Nanocontainer-behandelten Makrophagen mit Elektronenundurchlässigen Clustern angereichert ist, die eine charakteristische granulare Substruktur aufweisen (Abbildung 3 A,B). Die Nanocontainer sind somit ausschließlich in den Vesikeln lokalisiert. Parallele Elektronenenergieverlustspektroskopie (PEEL) der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -behandelten Vesikel zeigen eindeutig die Fe-M23/L23-Ionisationskanten und bestätigen das Vorliegen von Eisen in den granularen Strukturen (Abbildung 3 C–E). Die $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer kolonisieren in den Vesikeln entsprechend der Überlagerung mit Fe-L23-Elementkarten (Abbildung 3 C,D). Statistische Analysen von Zellschnitten zeigen im Mittel etwa 1400 Nanocontainer pro Zelle (SI: Tabelle S1). Eine derart hohe Zahl an Nanocontainern in den Makrophagen erlaubt auch den Zugang zu intrazellulären Mykobakterien, die sich nach Phagozytose in den Phagosomen der Makrophagen befinden.^[2–5]

Die Aktivität der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer wurde zunächst gegenüber *M.tb.*-Kulturen getestet (Stamm H37Rv, die Handhabung von *M.tb.* erfordert Biosicherheitsbedingungen der Stufe 3, siehe SI). Unterschiedliche Konzentrationen an $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainern, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Referenz, reinem INH und Kontrollmedium wurden bezüglich der Aktivität gegen *M.tb.* mittels Resazu-

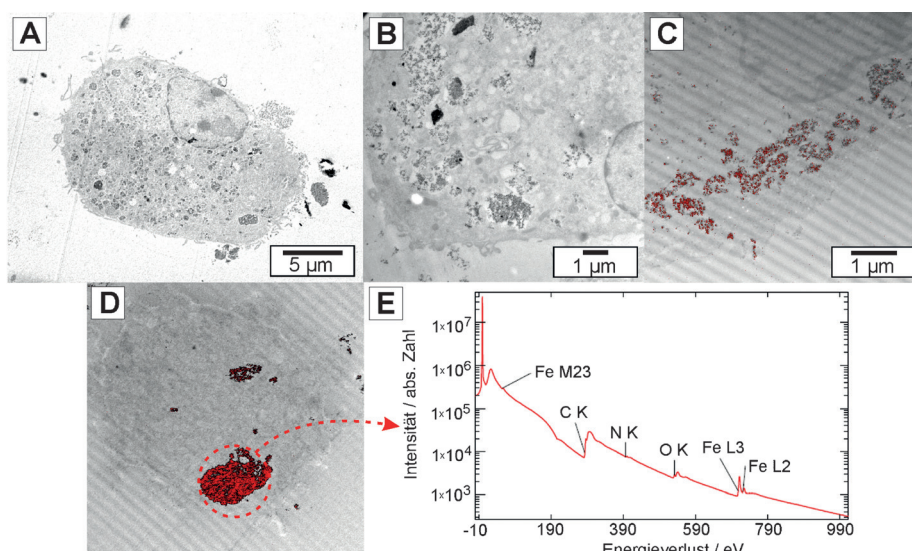


Abbildung 3. Zellaufnahme der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer: A) Niedrig und B) hoch aufgelöste Abbildungen der mit Nanocontainern behandelten Makrophagen; C,D) Vesikel mit überlagerter Fe-L23-Elementkarte geben die $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer als rote Punkte zu erkennen; E) WR-PEEL-Spektren von Nanocontainer-Agglomeraten (roter Kreis in D)).

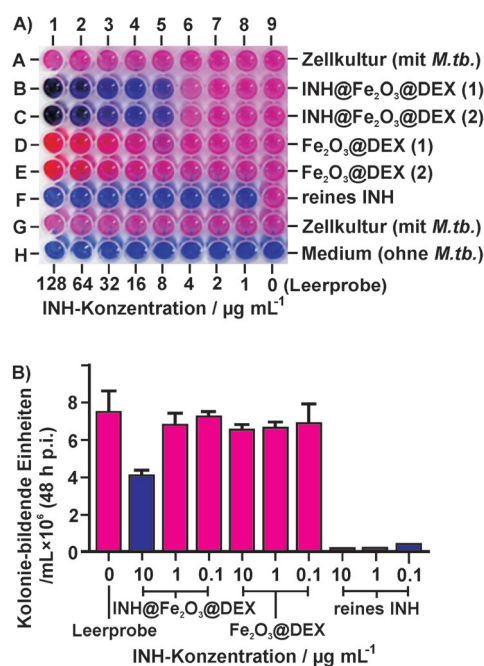


Abbildung 4. Aktivität der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer: A) Resazurin-Assay als Indikator der *M.tb.* (H37Rv)-Viabilität: orange-rot: *M.tb.* positiv/aktiver Metabolismus; dunkelblau: *M.tb.* negativ/kein aktiver Metabolismus; B) *M.tb.*-Wachstum gemäß CFU-Assay (Referenzen: INH-freies $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$, reines INH, Leerprobe) (INH entspricht 48 Gew.-% des $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Gesamtgewichts).

rin-Assay (Abbildung 4A) und Test koloniebildender Einheiten (colony forming unit, CFU) (Abbildung 4B) untersucht. Während Resazurin-Assays den mykobakteriellen Stoffwechsel anzeigen, erlauben CFU-Assays eine Abschät-

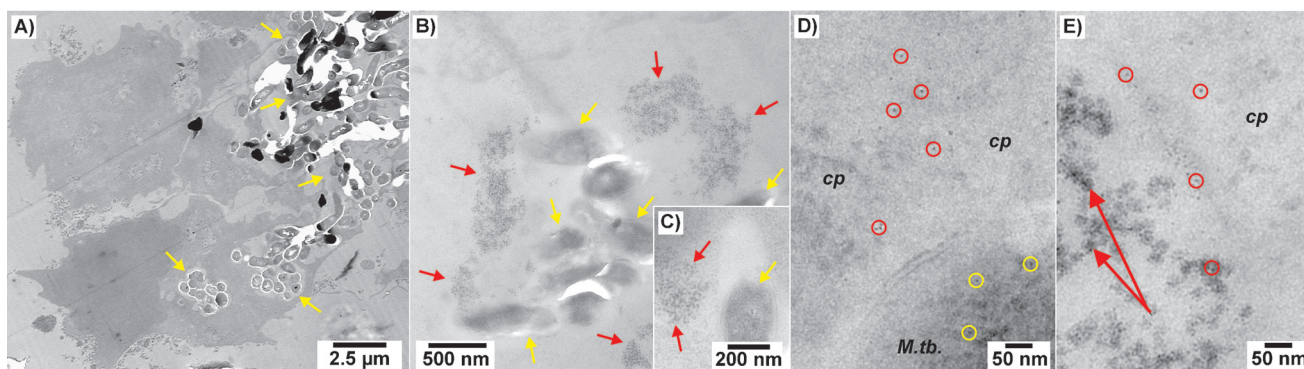


Abbildung 5. Ultrastrukturelle Analyse *M.tb.*-infizierter Makrophagen nach Behandlung mit INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainern: A) TEM (90 nm Ausschnitt) mit *M.tb.*-infizierten Makrophagen und B,C) INH@Fe₂O₃@DEX (rote Pfeile) in unmittelbarer Nachbarschaft von Bakterienzellen (gelbe Pfeile); D) Detailansicht von INH@Fe₂O₃@DEX-behandelten, *M.tb.*-infizierten Makrophagen. Sowohl das Zytoplasma (*cp*) der Makrophagen als auch das Zytoplasma von *M.tb.* enthalten Bruchstücke der Nanocontainer (rote Kreise: innerhalb der Makrophagen; gelbe Kreise: innerhalb von *M.tb.*-Zellen); E) Detailaufnahme eines Clusters mit INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainern (rote Pfeile) sowie Bruchstücke von Nanocontainern (rote Kreise) im Zytoplasma (*cp*) von Makrophagen. Ultradünne Schnitte in (A) und (B) enthalten einige Risse und Löcher durch inhomogene Harzinfiltration/-polymerisation aufgrund der Wechselwirkung mit der Biomatrix.

zung der Zahl lebensfähiger Mykobakterien. Reines INH zeigt in beiden Tests antibakterielle Aktivität bei geringster Konzentration (1 µg mL⁻¹), was bei direkter Einwirkung von INH auf die Mykobakterien zu erwarten ist. Die INH-freie Fe₂O₃@DEX-Referenz hat keinerlei Effekt, was aber die generelle Bioverträglichkeit belegt (Abbildung 4). Im Gegensatz hierzu inhibieren die INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainer die metabolische Aktivität und töten *M.tb.* bei geringen Konzentrationen von 8 µg mL⁻¹ ab (Abbildung 4). Analog zur wohl bekannten langsamen und vollständigen Auflösung massiver Eisenoxidnanopartikel unter physiologischen Bedingungen unter Ferretin-Bildung^[17,19] wird INH offensichtlich mit voranschreitender Auflösung der Nanocontainer freigesetzt. Diese spezifischen Eigenschaften des Eisenoxids – Bioverträglichkeit, Bioabbaubarkeit und langsame Auflösung^[20] – kommen in unserem Nanocontainer-Konzept ebenfalls zum Einsatz.

Nach Verifizierung von Bioverträglichkeit, zellulärer Aufnahme und Aktivität gegen Mykobakterien wurden *M.tb.*-infizierte Makrophagen mit INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainern behandelt. Auf TEM-Abbildungen sind die *M.tb.*-Mykobakterien in den Phagosomen der Makrophagen klar erkennbar (Abbildung 5 A–C). Charakteristische dunkle, granulare Strukturen – analog zu den Abbildungen 3A,B – belegen das Vorliegen Elektronen-dichter INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainer in unterschiedlichen Stadien der Auflösung (Abbildung 5 D,E). Sehr oft befinden sich die Nanocontainer in submikronem Abstand zu *M.tb.*-Zellen (Abbildung 5 A–C). Diese Beobachtung deutet auf eine aktive Aufnahme von Eisen als essentielles Spurenelement für Wachstum und Virulenz der Mykobakterien.^[21] Tatsächlich wurde bereits vorgeschlagen, den mykobakteriellen Eisenstoffwechsel für eine effiziente TB-Therapie in Betracht zu ziehen.^[21] Insgesamt können die INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainer entsprechend der Elektronenmikroskopie als „Trojanisches Pferd“ für Antibiotika aufgefasst werden. HRTEM-Aufnahmen zeigen die Nanocontainer und deren

partikuläre Bruchstücke sogar in den mykobakteriellen Zellen (Abbildung 5 D; SI: Abbildung S10).

Die Auflösung der INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainer innerhalb des Zytoplasmas der Makrophagen sowie außerhalb der Makrophagen kann anhand von TEM-Aufnahmen und EELS verdeutlicht werden (Abbildung 6; SI: Abbildung S11). Elektronenmikroskopie und Fe-L23-Elementkarten verdeutlichen nach Kultivierung über Nacht eindeutig einen geringeren Eisengehalt intrazellulärer im Vergleich zu extrazellulären Nanocontainern. Dieser Befund belegt eine bevorzugte Auflösung internalisierter INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainer und die Notwendigkeit von Eisen für den Metabolismus der Makrophagen.^[21] Im Gegensatz zu internalisierten Nanocontainern stellt sich zudem die INH-Freisetzung aus INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainern in physiologischen Medien als sehr langsam heraus (SI: Tabelle S2 und Abbildung S12), was die aktive Aufnahme von Eisen durch die Makrophagen wie durch die Mykobakterien zusätzlich stützt.

Insgesamt stellen INH@Fe₂O₃@DEX-Nanocontainer eine neue Art nanoskaliger Hohlkugeln mit Durchmessern < 30 nm dar, die als effiziente Systeme zur Wirkstofffreisetzung von Antibiotika in der TB-Therapie dienen können. Mit 48 Gew.-% INH enthalten sie im Vergleich zu alternativen Nanocontainer-Konzepten eine deutlich höhere Wirkstoffbeladung. Bioverträglichkeit, Bioabbaubarkeit und aktive Eisenaufnahme sowohl durch Makrophagen als auch Mykobakterien stellen weitere Vorteile Fe₂O₃-basierter Nanocontainer dar. Somit verbindet INH@Fe₂O₃@DEX einerseits eine geringe zelluläre Toxizität der Nanocontainer mit einer hohen Aktivität des eingekapselten INH. Wie ein „Trojanisches Pferd“ werden die Nanocontainer aktiv in die Makrophagen internalisiert und setzen INH durch langsame metabolische Auflösung der Fe₂O₃-Wand in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Mykobakterien frei, wobei auch der Eisenbedarf der Mykobakterien ausgenutzt wird. Aerosol-basierte Rezepturen und In-vivo-Studien stellen wichtige Folge-

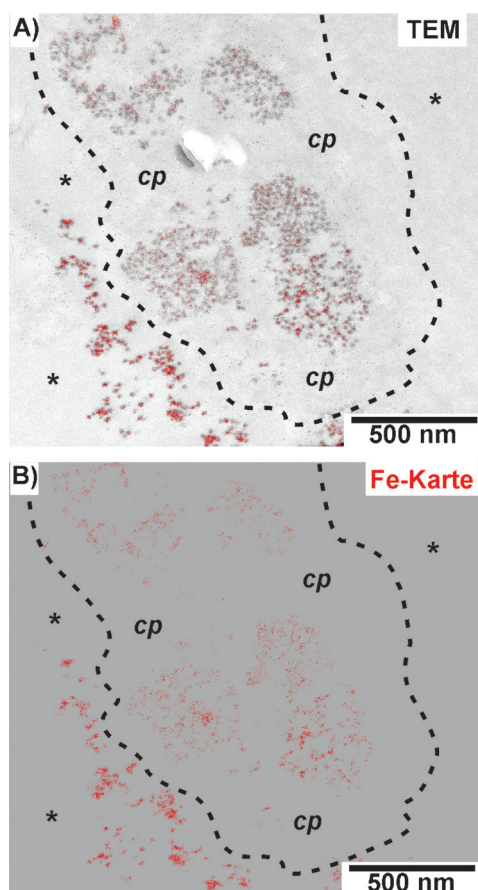


Abbildung 6. Unterschiedliche Auflösungsrate der $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer nach Kultivierung über Nacht innerhalb des Zytoplasmas (*cp*) einer Makrophage und außerhalb (*) der Makrophage (Zellmembran angedeutet durch schwarze Linie): A) Überlagerung von TEM-Aufnahme und Fe-L23-Elementkarte; B) Fe-L23-Elementkarte aus (A).

schritte dar, um unmittelbar Lungentuberkulose behandeln zu können und um eine Verminderung von Nebenwirkungen durch das neuartige Nanocontainer-Konzept nachweisen zu können. Neben dem Potential für die TB-Therapie können Konzept, Synthesestrategie und Art der Nanocontainer ebenfalls für Einkapselung, Transport und Freisetzung anderer Antibiotika und Wirkstoffe in unabhängige Zielstrukturen wie Virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen von hoher Relevanz sein.

Experimentelles

Synthese: $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Nanocontainer und INH -freie $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ -Referenz wurden über einen modifizierten Mikroemulsionsansatz hergestellt, der unserer Strategie zur Herstellung nanoskaliger Hohlkugeln folgt (z. B. Ag, Au, $\text{AlO}(\text{OH})$, SnO_2 , $\text{La}(\text{OH})_3$, Cu_2S , CuS , Ag_2S) und an anderer Stelle publiziert wurde.^[13] Eine detaillierte Synthesevorschrift für $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3$ und $\text{INH@Fe}_2\text{O}_3\text{@DEX}$ ist in den Hintergrundinformationen zu finden.

Weitere Details zu Synthese, Materialcharakterisierung, In-vitro-Studien mit Makrophagen, Assays und Zelltests mit virulenten *M. tb* sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) für die Förderung im Rahmen des Projekts „Allergie-relevante Analytik mit Nano-Reagentien (nanoARA)“. P.L. und C.F. danken Dr. R. Popescu und Prof. Dr. D. Gerthsen (KIT) für TEM-Analysen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung von Ausstattung. D.S., N.Z. und U.S. danken dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung für die Förderung.

Stichwörter: In-vitro-Studien · Isoniazid · Mykobakterien · Nanocontainer · Tuberkulose

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 12597–12601
Angew. Chem. **2015**, 127, 12786–12791

- [1] World Health Organization (WHO), *Global tuberculosis report 2014*, ISBN 978 92 4 156480 9.
- [2] a) *Tuberculosis: A comprehensive clinical reference* (Hrsg.: H. S. Schaaf, A. Zumla), Saunders Elsevier, Amsterdam, **2009**; b) D. L. Kasper, A. S. Fauci, *Harrison's Infectious Diseases*, McGraw-Hill, New York, **2010**.
- [3] Übersichtsartikel: G. Weiss, U. Schaible, *Immunol. Rev.* **2015**, 264, 182.
- [4] Übersichtsartikel: a) A. Zumla, P. Nahid, S. T. Cole, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, 12, 388; b) R. Beena, D. S. Rawat, *Med. Res. Rev.* **2013**, 33, 693.
- [5] Übersichtsartikel: a) C. Lu, Q. Liu, A. Sarm, C. Fitzpatrick, D. Falzon, C. D. Mitnick, *PLoS one* **2013**, 8, e56074; b) T. Gumbo, *Nat. Genet.* **2013**, 45, 720.
- [6] Übersichtsartikel: a) S. Chapman, M. Dobrovolskaia, K. Farahani, A. Goodwin, A. Joshi, H. Lee, T. Meade, M. Pomper, K. Ptak, J. Rao, et al., *Nano Today* **2013**, 8, 454; b) J. G. Fujimoto, D. Farkas, *Biomedical Optical Imaging*, Oxford University Press, Oxford, **2009**.
- [7] Übersichtsartikel: a) C. Li, *Nat. Mater.* **2014**, 13, 110; b) D. Ling, M. J. Hackett, T. Hyeon, *Nat. Mater.* **2014**, 13, 122; c) Y. Ding, S. Li, G. Nie, *Nanomedicine* **2013**, 8, 1209; d) K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 872; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 886.
- [8] a) M. E. Davis, *Mater. Res. Soc. Bull.* **2012**, 37, 828; b) J. B. Hall, M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, S. E. McNeil, *Nanomedicine* **2007**, 2, 789.
- [9] a) F. Fenaroli, D. Westmoreland, J. Benjaminsen, T. Kolstad, F. M. Skjeldal, A. H. Meijer, M. van der Vaart, L. Ulanova, N. Roos, B. Nystrom, *ACS Nano* **2014**, 8, 7014; b) L. A. Aranha, A. J. Almeida, L. M. D. Goncalves, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, 10, 2295; c) G. Griffiths, B. Nystroem, S. B. Sable, G. K. Khuller, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 827; d) A. Sosnik, A. M. Carcaboso, R. J. Glisoni, M. A. Moretton, D. Chiappetta, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, 62, 547.
- [10] a) P. Pedrosa, B. Veigas, D. Machado, I. Couto, M. Viveiros, P. V. Baptista, *Tuberculosis* **2014**, 94, 332; b) B. Zargar, A. Hatamie, *Spectrochim. Acta Part A* **2013**, 106, 185; c) Y. Xiang, K. Deng, H. Xia, C. Yao, Q. Chen, L. Zhang, Z. Liu, W. Fu, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 49, 442.
- [11] a) M. Gajendiran, Y. Jainuddin, M. Sheik, V. Elangovan, S. Balasubramanian, *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2, 418; b) R. Kalluru, F. Fenaroli, D. Westmoreland, L. Ulanova, A. Maleki, N. Roos, M. P. Madsen, G. Koster, W. Egge-Jacobson, S. Wilson, *J. Cell Sci.* **2013**, 126, 3043; c) L. L. I. J. Booyens, L. Kalambo, E. Brooks, R. Hansen, J. Gilliland, V. Gruppo, P. Lungenhofer, B. Semete-Makokolela, H. S. Swai, A. F. Kotze, *Int. J. Pharm.* **2013**,

- 444, 10; d) I. P. Kaur, M. K. Verma, *Int. J. Pharm.* **2011**, *1*, 110; e) G. K. Saraogi, P. Gupta, U. D. Gupta, N. K. Jain, G. P. Agrawal, *Int. J. Pharm.* **2010**, *385*, 143.
- [12] A. Banu, V. Rathod, *J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *3*, 211.
- [13] a) H. Gröger, F. Gyger, P. Leidinger, C. Zurmühl, C. Feldmann, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1586; b) D. H. M. Buchold, C. Feldmann, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3489.
- [14] D. Lindsay, *Min. Soc. Am.* **1976**, *3*.
- [15] a) Y. Chao, P. P. Karmali, R. Mukthavaram, S. Kesari, V. L. Kouznetsova, I. F. Tsigelny, D. Simberg, *ACS Nano* **2013**, *7*, 4289; b) L. K. Bogart, A. Taylor, Y. Cesbron, P. Murray, R. Levy, *ACS Nano* **2012**, *6*, 5961.
- [16] C. Gottstein, G. Wu, B. J. Wong, J. A. Zasadzinski, *ACS Nano* **2013**, *7*, 4933.
- [17] J. D. López-Castro, A. V. Maraloiu, J. J. Delgado, J. J. Calvino, M.-G. Blanchin, N. Galvez, J. M. Dominguez, *Nanoscale* **2011**, *3*, 4597.
- [18] A. Dube, J. L. Reynolds, W. C. Law, C. C. Maponga, P. N. Prasad, G. D. Morse, *Nanomedicine* **2014**, *10*, 831.
- [19] L. Lartigue, D. Alloyeau, J. Kolosnjaj-Tabi, Y. Javed, P. Guardia, A. Riedinger, C. Pechoux, T. Pellegrino, C. Wilhelm, F. Gazeau, *ACS Nano* **2013**, *7*, 3939.
- [20] Übersichtsartikel: a) P. W. Goodwill, E. U. Saritas, L. R. Croft, T. N. Kim, K. M. Krishnan, D. V. Schaffer, S. M. Conolly, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3870; b) N. Lee, T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2575.
- [21] a) H. Drakesmith, A. M. Prentice, *Science* **2012**, *338*, 768; b) S. M. Santhanagopalan, G. M. Rodrigues, *Tuberculosis* **2012**, *92*, 60; c) A. K. Sharma, R. Naithani, V. Kumar, S. S. Sandhu, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1723; d) U. E. Schaible, S. H. Kaufmann, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 946.

Eingegangen am 15. Juni 2015,
veränderte Fassung am 16. Juli 2015
Online veröffentlicht am 31. August 2015