

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einleitung

Der Einsatz hochpotenter Arzneistoffe, wie z.B. Zytostatika oder Antibiotika ist häufig mit einem hohen Risiko verbunden. Die Gefahr schwerer Nebenwirkungen ist bei einigen Stoffen so groß, dass sie nicht in reiner Form appliziert werden können. Desweiteren existieren Arzneistoffe, die nicht ohne Probleme peroral aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert werden können (Amphotericin B) oder durch Magensäure und Proteasen inaktiviert werden (Enzyme, Peptide). In den letzten Jahrzehnten ist daher die Entwicklung von Arzneistoff-Träger-Systemen wie Nano- bzw. Mikropartikeln immer mehr in das Zentrum des Interesses gerückt. Der Wirkstoff liegt hier eingebettet in einer Matrix, als schwer löslicher Nanopartikel oder adsorbiert an eine Nanopartikeloberfläche vor. Diese Arzneiformen besitzen einige entscheidende Vorteile:

- Plasmakonzentrationen können dadurch über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden („Controlled Release“)
- Durch gezielte Modifikation der Oberfläche können bestimmte Gewebe, bzw. Organe gezielt angesteuert und therapiert werden („Drug Targeting“)

Dies ermöglicht es, die unerwünschte Wirkungen gering zu halten und die Therapieeffizienz zu erhöhen (Müller 1991; Kreuter 1994; Speiser 1998).

Die Herstellung solcher Nanopartikel kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen:

- Ein schwerlöslicher Arzneistoff wird durch Anwendung von Energie, wie z.B. durch Hochdruckhomogenisation (Müller, Becker et al. 1999) oder Mahlen in

einer Perlmühle bis in den Nanometerbereich zerkleinert. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Top-Down-Technologie“ (Müller and Akkar 2004).

- Aus einzelnen Monomeren wird durch Polymerisation oder Präzipitation (Gassmann 1994) ein Partikel aufgebaut, der den Arzneistoff während des Polymerisationsprozesses in seine Matrix eingeschlossen hat. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Bottom-Up“-Technologie (Müller and Akkar 2004).

Als geeignete Polymere für die letztgenannte Methode kommen Stoffe wie Polybutylcyanoacrylat (PBCA), Polymilchsäure (PLA) oder Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) in Frage (Fahr and Kissel 1997; Luck, Pistel et al. 1998).

Durch gezielte Modifikation der Oberfläche können die in vivo-Eigenschaften eines Partikels beeinflusst werden. Diese Modifikation kann während des Herstellungsprozesses vorgenommen werden, indem bestimmte funktionelle Gruppen auf der Oberfläche verankert werden (Gessner, Waicz et al. 2000; Gessner, Lieske et al. 2003). Es ist auch möglich nach Herstellung durch Adsorption von Tensiden die Oberfläche zu modifizieren (Alyautdin 1995; Kreuter, Alyautdin et al. 1995; Kreuter 1997).

Die große Herausforderung liegt zunächst darin, die applizierten Partikel vor den Zellen des mononukleären phagozytären Systems (MPS) zu schützen. Dem MPS obliegt es, in den Körper eingedrungene Partikel zu phagozytieren und dadurch unschädlich zu machen. Diese Interaktion führt dazu, dass die Partikel sehr schnell inaktiviert werden (Müller 1991). Die Inaktivierung findet zu über 90% in der Leber statt. Bevor also ein „Drug Targeting“ erreicht werden kann, muss der Nanopartikel vor der Eliminierung durch das MPS geschützt werden.

Nach Applikation der Partikel lagern sich unverzüglich im Blut befindliche Plasmaproteine auf die Partikeloberfläche an. Je nach Beschaffenheit der Oberfläche ist dieses Proteinmuster variabel und charakteristisch für eine Partikeloberfläche. Nicht etwa die Eigenschaften der Oberfläche des Partikels selbst sondern die auf ihr adsorbierten Proteine verleihen dem Partikel ein spezifisches in vivo-Verhalten.

Es existieren einerseits Plasmaproteine, die die Interaktion mit dem MPS beschleunigen. Diese Proteine bezeichnet man als Opsonine. Sie bilden eine „Brücke“ zwischen dem Partikel und den Zellen des MPS und fördern dadurch die Phagozytose (Frank and Fries 1991). IgG und den Proteinen des Komplementsystems kommt solch eine Rolle zu. Andererseits gibt es auch Plasmaproteine, die diese Interaktion negativ beeinflussen und somit dem Partikel einen gewissen Schutz vor dem MPS bieten. Diese Proteine bezeichnet man als Dysopsonine. Hier kommt vor allem IgA und Albumin eine große Bedeutung zu (Kreuter and Borchard 1992; Lück 1997).

Durch Modifikation der Oberfläche und gezieltes Anlagern bestimmter Proteine kann nicht nur ein Schutz des Partikels erreicht werden, sondern es ist auch möglich die Partikel in bestimmten Organen oder Geweben anzureichern. Die Inkubation einer Nanopartikelsuspension mit Polysorbat 80 bewirkt eine verstärkte Aufnahme von Arzneistoffen über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn. Die Aufnahme des Arzneistoffes in die Endothelzellen wird wahrscheinlich vermittelt durch das auf den Nanopartikeln adsorbierte Apolipoprotein E, ein Plasmaprotein aus der Familie der „low density lipoproteins“ (LDL). An der Zelloberfläche der Endothelzellen befinden sich LDL-Rezeptoren, die möglicherweise den gesamten Partikel aktiv in die Zellen transportieren. Die Art und Menge der adsorbierten Plasmaproteine sowie auch deren Verhältnis untereinander besitzen also eine entscheidende Bedeutung für die Verteilung einer Nanosuspension im Körper. Die Qualität und die Quantität der adsorbierten Proteine wiederum sind abhängig von den physikochemischen Parametern der Partikel. Das theoretische Modell, das diesem Mechanismus zugrunde liegt wird, als das „Konzept der differentiellen Adsorption“ bezeichnet (Blunk 1994).

Um Art und Menge der adsorbierten Plasmaproteine erfassen zu können, wurde von Blunk 1993 die zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-D PAGE) zur Bestimmung der Plasmaproteinadsorption auf Nanopartikeln entwickelt. Die Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Proteinen sind vielseitig. Als Beispiele seien hier Immunoassays (Bergstrom, Holmberg et al. 1992), die Field Flow Fractionation (FFF) (Anger, Caldwell et al. 1999) oder auch die Massenspektrometrie (Oleschuk, McComb et al. 2000) genannt.

Allerdings ist keines dieser Verfahren so effektiv und zuverlässig wie die 2-D PAGE. Sie ermöglicht es, eine Vielzahl an Proteinen bis zu einer Nachweisgrenze von 0,05 - 0,1 ng/mm<sup>2</sup> nebeneinander zu bestimmen (Merril, Goldman et al. 1982)

## 1.2 Zielsetzungen der Dissertation

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in unterschiedliche Teilbereiche, die die gewonnenen Erkenntnisse der vorangegangenen Arbeiten von Blunk, Lück und Geßner auf dem Gebiet der Plasmaproteinadsorption auf Nanocarriern aufgreift und erweitert. Die Kapitel gliedern sich in voneinander unabhängige Teilbereiche.

In Kapitel 3 wurden die von Gessner begonnenen Untersuchungen bezüglich einer Veränderung der Plasmaproteinadsorption im Hinblick auf unterschiedliche physikochemische Eigenschaften bei gleicher chemischer Struktur der Partikeloberfläche um einen kationischen Partikeltyp erweitert.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit der Qualität und dem Ausmaß der adsorbierten Proteine auf Styrenkugeln, die mit Polyoxyethylen (PEG) auf der Oberfläche modifiziert sind. Hier wurden die durch 2-D PAGE gewonnenen Daten durch Kalibriergeraden, die anhand von Humanplasma erstellt wurden, erweitert. Dadurch war erstmals eine exakte Bestimmung der einzelnen Proteinmengen auf einem bestimmten Partikeltyp möglich.

Des Weiteren werden in Kapitel 5 die von Lück 1997 erstellte Theorie bezüglich der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke mit Polysorbat 80-gecoateten PBCA-Nanopartikeln ausführlich untersucht. Es soll darüber hinaus geprüft werden, ob weitere Plasmaproteine für eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sein könnten. Zusätzlich wird zum ersten Mal eine eingehende Untersuchung der Plasmaproteinadsorption zwischen den Species Mensch und Ratte im Hinblick auf deren Vergleichbarkeit durchgeführt. Besonders wurden die Auswirkungen der Tenside Polysorbat 80 und Poloxamer 188 auf die Plasmaproteinadsorption und die daraus resultierenden *in-vivo*-Eigenschaften beachtet.

Abschließend wurden in Kapitel 6 verschiedene Amphotericin B-Formulierungen zur Therapie von *Balamuthia mandrillaris* analysiert. Auch hier wurde im Rahmen einer Tierstudie der Transport von Arzneistoff über die Blut-Hirn-Schranke untersucht.