

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die pharmazeutisch-biotechnologischen Einsatzmöglichkeiten von kationischen Solid Lipid Nanopartikeln zu erforschen.

Basierend auf den ersten Ergebnissen von Olbrich [Olbrich et al. 2000, Olbrich et al. 2001a] wurden zwei Studien zum Einsatz von kationischen SLN als Impfstoffadjuvantien bei der Vakzinierung von Hühnern durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine sehr gute Gewebeverträglichkeit und Stabilität der SLN-Formulierungen. Allerdings konnte an diesem Huhnmodell nur eine begrenzte Steigerung der IgY-Antikörperkonzentration im Vergleich zu den Vakzinen ohne Adjuvans nachgewiesen werden. Die Gründe hierfür dürften vielfältig sein. Zum einen war die Anzahl der Tiere natürlich zu gering. Die interindividuellen Schwankungen waren schon sehr groß. Im Nachhinein betrachtet war das eingesetzte Antigen vielleicht nicht ideal. Das Adjuvans MF59 [Ott et al. 1995], woran sich unser System orientierte, wurde bisher nur mit viralen Antigenen getestet [Kahn 1994, Langenberg 1995, Wang 1996, Ott 1998]. Da sich der Mechanismus der Immunität gegen extrazelluläre Parasiten wie z. B. Bakterien bekanntlich ja grundlegend von dem gegen intrazelluläre Parasiten wie z. B. Viren unterscheidet, ist es verständlich, daß nicht jedes Antigen mit jedem Adjuvans erfolgreich kombiniert werden kann. Des weiteren waren die untersuchten Parameter vielleicht nicht ideal gewählt. Die Antikörpertiterverläufe veränderten sich durch den Einsatz der SLN-Adjuvantien aber charakteristisch. Vielleicht hätte die Untersuchung anderer immunologischer Parameter wie z. B. die Interferon-gamma und Interleukin-2 Konzentrationen, die eine T-Helferzell-Reaktion vom Typ 1 kennzeichnen und zu einer verstärkten zellulären Immunität führen, [Mosmann und Coffman 1989] oder die Bestimmung der zytotoxischen T-Lymphozyten [Singh et al. 2000] aussagekräftigere Ergebnisse geliefert.

Diese nicht so erfolgreichen Ergebnisse bedeuten meiner Meinung nach nicht, daß das SBA-System nicht ausreichend wirksam ist. Aufgrund der nun vorliegenden Ergebnisse müßten die Testbedingungen idealerweise analog zu MF59 gewählt werden. Die Ähnlichkeit zu MF59 und Berichte über die immunmodulierenden Eigenschaften von kationischen Lipiden [Filion und Philips 1997] lassen vermuten, daß das Potential von SBA noch nicht vollständig erforscht worden ist.

Die Optimierung des von Olbrich eingeführten Systems TransoPlex[®] [Olbrich 2001] verlief dagegen sehr erfolgreich. Das Screening von 22 Formulierungen brachte die sehr potente Zubereitung Cp(2)Dotap (im weiteren Verlauf S1 genannt) hervor. Des Weiteren konnte die Abhängigkeit der Zytotoxizität allein vom verwendeten kationischen Lipid gezeigt werden. Einkettige kationische Lipide waren alle zu zytotoxisch, um als Transfektionsreagenz verwendet zu werden. Im Gegensatz dazu waren die zweikettigen kationischen Lipide alle sehr gut verträglich. Die Transfektionseffektivität hing nicht nur vom verwendeten kationischen Lipid, sondern auch vom Matrixlipid ab. Die Einarbeitung des Helferlipids DOPE, welches in liposomalen Formulierungen [Fasbender et al. 1997] und kationischen DOTAP-Emulsionen [Kim et al. 2001] die Transfektionseffizienz zu steigern vermag, zeigte bei SLN hingegen einen beschränkten Effekt.

Der Vergleich der Formulierung S1 mit dem ebenfalls aus DOTAP und Tween 80/Span 85 zusammengesetzten Liposom L1 und den beiden kommerziellen liposomalen Formulierungen „DOTAP liposomales Transfektionsreagenz“ (Roche) und Escort[™] (Sigma) zeigte, daß SLN und Liposomen vergleichbare Effektivitäten besitzen. Nur Escort[™], das neben DOTAP auch noch DOPE enthielt, erzielte etwas bessere Ergebnisse. Da in der SLN-Formulierung sicherlich ein Gleichgewicht zwischen auf der Oberfläche gebundenem und mizellar und liposomal organisiertem DOTAP herrscht [Mehnert und Mäder 2001], waren die vergleichbaren Effektivitäten ein Beweis dafür, daß sowohl DOTAP-SLN als auch DOTAP-Liposomen transfezieren können. Würden nämlich nur die DOTAP-Liposomen in der SLN-Formulierung Transfektion vermitteln, so hätten die SLN ja eine signifikant niedrigere Effizienz zeigen müssen als die reinen Liposomen.

Letztlich wurde die Kombination von kationischen SLN mit der Kernlokalisationssequenz TAT₂ untersucht. Wie die Versuche zeigten, konnte die Transfektionseffizienz durch die Vorkomplexierung der DNA mit TAT₂ nochmals enorm gesteigert werden. Eine nicht ganz so starke Effektivitätssteigerung konnte durch die Vorkomplexierung mit poly-L-Arginin erreicht werden.

Versuche zur Sterilisation zeigten, daß die Formulierungen S1 und Lab40 Cp0,5 problemlos autoklavierbar waren. Zusammen mit der guten Lagerstabilität und der Möglichkeit zur Produktion im großen Maßstab und an validierten Maschinen sind das entscheidende technologische Vorteile gegenüber Liposomen. Das TransoPlex[®]-System stellt also eine neue alternative Plattformtechnologie zur Lipofektion dar.

DNA-Vakzinen werden intramuskulär appliziert und sollen die Bildung von Antikörpern und die Ausbildung einer zellulärer Immunität gegen das vom zugeführten Plasmid codierte Protein induzieren. Eine auf MF59 basierende DOTAP-Emulsion [Ott et al. 2002] und auch DOTAP-Mikropartikel [Singh 2000] wurden bereits als Adjuvans für DNA-Vakzinen beschrieben. Mehrere Artikel beschreiben immunmodulierende Eigenschaften von kationischen Lipiden [Filion und Philips 1997, Philips und Gagné 1995]. Nimmt man die Ergebnisse aus den Versuchen zum Einsatz von SLN als Adjuvans und als Gentransfervehikel zusammen, erscheint die Anwendung von SLN als Adjuvans für DNA-Vakzinen vielversprechend. Das System der kationischen SLN bietet eine sehr gute Gewebeverträglichkeit, eine hohe Transfektionseffizienz und höchstwahrscheinlich auch noch näher zu charakterisierende immunmodulierende Eigenschaften.