

**Plasmaproteinadsorption auf parenteral  
applizierbaren kolloidalen Arzneistoffträgern zur  
Überwindung der Blut-Hirn-Schranke**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Torsten M. Göppert  
aus Offenburg**

**August 2005**

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. H. Müller

2. Gutachter: PD Dr. K. Langer

Disputation am: 18.10.05

Meiner Mutter  
mit großem Dank gewidmet

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

*„You spend tremendous amounts of money developing drugs.  
You should also spend money on technology to deliver the drugs  
to the organ of choice.“*

Tom Davis, Pharmakologe an der Universität von Arizona in Tucson



# INHALTSVERZEICHNIS

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>                       | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b>ALLGEMEINER TEIL.....</b>                                  | <b>4</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Arzneistofftransport über die Blut-Hirn-Schranke .....</b> | <b>4</b>  |
| 2.1.1      | Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke.....               | 4         |
| 2.1.2      | Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke.....              | 6         |
| 2.1.2.1    | Passive Diffusion (Permeation).....                           | 7         |
| 2.1.2.2    | Transportersysteme .....                                      | 7         |
| 2.1.2.2.1  | Carrier-vermittelter Transport.....                           | 7         |
| 2.1.2.2.2  | Vesikulärer Transport.....                                    | 8         |
| 2.1.3      | Strategien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke.....        | 9         |
| 2.1.3.1    | Invasive Strategien .....                                     | 9         |
| 2.1.3.2    | Pharmakologische Strategien .....                             | 10        |
| 2.1.3.2.1  | Erhöhung der Lipophilie .....                                 | 10        |
| 2.1.3.2.2  | Hemmung von Effluxmechanismen.....                            | 10        |
| 2.1.3.2.3  | Chemical Delivery Systems .....                               | 10        |
| 2.1.3.3    | Physiologische Strategien .....                               | 11        |
| 2.1.3.3.1  | Adsorptive Endozytose .....                                   | 11        |
| 2.1.3.3.2  | Rezeptorvermittelte Endozytose .....                          | 12        |
| <b>2.2</b> | <b>Das Konzept der „Differenzierenden Adsorption“.....</b>    | <b>13</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Kolloidale Arzneistoffträger.....</b>                      | <b>16</b> |
| 2.3.1      | Polymernanopartikel .....                                     | 16        |
| 2.3.2      | Emulsionen.....   | 17        |
| 2.3.3      | Feste Lipidnanopartikel (SLN).....                            | 17        |
| 2.3.4      | Nanopartikel aus Gelatine .....                               | 18        |
| <b>2.4</b> | <b>Struktur und Eigenschaften der Apolipoproteine.....</b>    | <b>19</b> |
| 2.4.1      | Allgemeines.....  | 19        |
| 2.4.2      | Struktur, Eigenschaften und Bedeutung von ApoE .....          | 20        |
| <b>3</b>   | <b>MATERIALIEN.....</b>                                       | <b>23</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>3.1</b> | <b>Lipide</b> .....  | <b>23</b> |
| 3.1.1      | Cetylpalmitat .....  | 23        |
| 3.1.2      | Compritol 888 ATO .....  | 23        |
| 3.1.3      | Witepsol E 85 .....  | 23        |
| 3.1.4      | Dynasan 118.....   | 24        |
| 3.1.5      | Stearinsäure .....   | 24        |
| <b>3.2</b> | <b>Tenside</b> .....   | <b>25</b> |
| 3.2.1      | Nichtionische Tenside .....                                      | 25        |
| 3.2.1.1    | Block-Copolymere .....   | 25        |
| 3.2.1.2    | Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester (Polysorbate) .....        | 26        |
| 3.2.1.3    | Sorbitanfettsäureester .....                                     | 27        |
| 3.2.1.4    | Tego Care 450 .....  | 27        |
| 3.2.1.5    | Polyoxyethylen-Fettsäureglyceride .....                          | 28        |
| 3.2.1.6    | Eastman Vitamin E TPGS.....                                      | 28        |
| 3.2.2      | Lecithin.....  | 29        |
| <b>3.3</b> | <b>Gelatine</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Wasser</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Weitere Materialien</b> .....                                 | <b>31</b> |
| <b>4</b>   | <b>METHODEN</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Herstellung kolloidaler Arzneistoffträger</b> .....           | <b>33</b> |
| 4.1.1      | Hochdruckhomogenisation.....                                     | 33        |
| 4.1.2      | Herstellung von Nanopartikeln aus Gelatine .....                 | 34        |
| 4.1.2.1    | Zwei-Stufen-Desolvatationstechnik .....                          | 34        |
| 4.1.2.2    | Positiv geladene Gelatine Nanopartikel und Beladung mit DNA..... | 35        |
| 4.1.3      | Herstellung von „Kern-Schale-Nanopartikeln“ .....                | 35        |
| <b>4.2</b> | <b>Charakterisierung kolloidaler Arzneistoffträger</b> .....     | <b>36</b> |
| 4.2.1      | Zwei-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-DE) .....   | 36        |
| 4.2.1.1    | Probenvorbereitung .....   | 37        |
| 4.2.1.1.1  | Inkubation.....  | 37        |
| 4.2.1.1.2  | Partikelseparation: Zentrifugation und Gelfiltration .....       | 38        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 4.2.1.1.2.1 | Zentrifugation.....  | 38        |
| 4.2.1.1.2.2 | Gelfiltration.....   | 39        |
| 4.2.1.1.3   | Proteindesorption und Vorbereitung für die IEF.....                              | 41        |
| 4.2.1.2     | Isoelektrische Fokussierung (IEF).....   | 42        |
| 4.2.1.3     | Äquilibrierung und SDS-PAGE.....   | 43        |
| 4.2.1.4     | Silberfärbung.....   | 45        |
| 4.2.1.5     | Auswertung der Elektrophorese-Gele.....  | 46        |
| 4.2.1.5.1   | Qualitative Auswertung.....  | 46        |
| 4.2.1.5.2   | Quantitative Auswertung.....   | 47        |
| 4.2.2       | Teilchengrößenanalytik.....  | 49        |
| 4.2.2.1     | Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....                                     | 49        |
| 4.2.2.2     | Laserdiffraktometrie (LD).....   | 50        |
| 4.2.3       | Zetapotential und Laser-Doppler-Anemometrie.....                                 | 51        |
| 4.2.4       | Bestimmung der Oberflächenhydrophobie.....                                       | 52        |
| 4.2.4.1     | Bengalrosa-Adsorptionsstudien.....   | 52        |
| 4.2.4.2     | Kontaktwinkelmessungen.....  | 53        |
| <b>4.3</b>  | <b>Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure-Assay.....</b>                | <b>54</b> |
| <b>4.4</b>  | <b>Durchführung der In-vivo-Studie mit Xenon-gesättigten Fettemulsionen.....</b> | <b>55</b> |
| <b>4.5</b>  | <b>Durchführung der In-vitro-Studie mit „Kern-Schale-Nanopartikeln“.....</b>     | <b>56</b> |
| <b>5</b>    | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>5.1</b>  | <b>Plasmaproteinadsorption auf festen Lipidnanopartikeln (SLN).....</b>          | <b>59</b> |
| 5.1.1       | Methodische Aspekte der 2-DE mit SLN.....  | 59        |
| 5.1.1.1     | Partikelseparation.....  | 59        |
| 5.1.1.1.1   | Gelfiltration als Alternativmethode zur Separation von SLN.....                  | 60        |
| 5.1.1.1.2   | Fazit.....   | 67        |
| 5.1.1.1.3   | Waschmedium.....   | 68        |
| 5.1.1.1.4   | Waschschritte.....   | 71        |
| 5.1.1.2     | Inkubationsmedium.....   | 75        |
| 5.1.1.2.1   | Verwendung von Humanplasmen unterschiedlicher Spender.....                       | 75        |
| 5.1.1.2.2   | Vergleich zwischen Frischplasma und gefrorenem Plasma.....                       | 77        |
| 5.1.1.2.3   | Humanserum.....  | 79        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.1.1.3    | Isoelektrische Fokussierung mit IPG's: nichtlinearer vs. linearer Gradient ...  | 83         |
| 5.1.1.4    | Zusammenfassung und Fazit .....   | 85         |
| 5.1.2      | Einfluss des Tensids auf die Adsorptionsmuster.....                             | 86         |
| 5.1.2.1    | Block-Copolymere .....  | 87         |
| 5.1.2.2    | Polysorbate .....   | 103        |
| 5.1.2.3    | Sonstige Tenside .....  | 115        |
| 5.1.2.4    | Mischungen von unterschiedlichen Tensiden .....                                 | 121        |
| 5.1.2.5    | Zusammenfassung und Fazit.....  | 124        |
| 5.1.3      | Einfluss der Lipidmatrix auf die Adsorptionsmuster .....                        | 125        |
| 5.1.3.1    | Compritrol .....  | 126        |
| 5.1.3.2    | Andere Lipide.....  | 128        |
| 5.1.3.3    | Zusammenfassung und Fazit.....  | 132        |
| 5.1.4      | Adsorptionskinetik auf SLN.....   | 132        |
| 5.1.4.1    | „Vroman-Effekt“ auf SLN .....   | 134        |
| 5.1.4.2    | Adsorptionskinetik auf oberflächenmodifizierten SLN .....                       | 137        |
| 5.1.4.3    | Zusammenfassung und Fazit.....  | 144        |
| 5.1.5      | „Physiologische Stabilität“ von SLN .....                                       | 144        |
| 5.1.5.1    | Vergleich der Adsorptionsmuster auf SLN verschiedenen Alters .....              | 145        |
| 5.1.5.2    | Zusammenfassung und Fazit.....  | 149        |
| <b>5.2</b> | <b>Plasmaproteinadsorption auf Fettemulsionen.....</b>                          | <b>151</b> |
| 5.2.1      | Xenon als Narkosegas – Vorteile und Problemstellung.....                        | 151        |
| 5.2.2      | Entwicklung einer Formulierung für das Narkosegas Xenon .....                   | 153        |
| 5.2.3      | Vergleich der Proteinmuster ausgewählter Fettemulsionen.....                    | 156        |
| 5.2.4      | Ergebnisse der <i>In-vivo</i> -Studie mit Xenon-gesättigten Fettemulsionen..... | 159        |
| 5.2.5      | Zusammenfassung und Fazit.....  | 162        |
| <b>5.3</b> | <b>Plasmaproteinadsorption auf Nanopartikeln aus Gelatine.....</b>              | <b>164</b> |
| 5.3.1      | Nanopartikel aus Gelatine als alternatives Carriersystem.....                   | 164        |
| 5.3.2      | Vergleich der Plasmaproteinadsorptionsmuster auf Gelatine-Nanopartikeln....     | 164        |
| 5.3.3      | Zusammenfassung und Fazit.....  | 171        |
| <b>5.4</b> | <b>Plasmaproteinadsorption auf „Kern-Schale-Nanopartikeln“ .....</b>            | <b>173</b> |
| 5.4.1      | Verwendung partikulärer Arzneistoffträger gegen intrazelluläre Parasiten.....   | 173        |
| 5.4.2      | Vergleich der Proteinadsorptionsmuster auf „Kern-Schale-Nanopartikeln“ .....    | 175        |
| 5.4.2.1    | Adsorptionsmuster nach Inkubation in Humanplasma .....                          | 176        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 5.4.2.2   | Adsorptionsmuster nach Inkubation in FBS .....                                     | 181        |
| 5.4.3     | Ergebnisse der <i>In-vitro</i> -Zellversuche mit „Kern-Schale-Nanopartikeln“ ..... | 183        |
| 5.4.4     | Zusammenfassung und Fazit .....  | 186        |
| <b>6</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>189</b> |
| <b>7</b>  | <b>SUMMARY .....</b>   | <b>193</b> |
| <b>8</b>  | <b>ANHANG .....</b>  | <b>196</b> |
| <b>9</b>  | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>199</b> |
| <b>10</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>201</b> |
|           | <b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>   | <b>231</b> |
|           | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>233</b> |
|           | <b>LEBENS LAUF .....</b>   | <b>235</b> |

