

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adsorption von Plasmaproteinen auf verschiedenen potentiellen, kolloidalen Arzneistoffträgern mittels zwei-dimensionaler Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-DE) analysiert. Im Mittelpunkt standen dabei feste Lipidnanopartikel (SLN), da ihnen, aufgrund ihrer guten Verträglichkeit *in vivo* und der Möglichkeit zur Produktion im großtechnischen Maßstab, ein hohes Marktpotential zugeordnet werden kann. Außerdem wurden Fettemulsionen, Nanopartikel aus Gelatine und spezielle Polymerpartikel (MC81cs) untersucht.

Um die 2-DE-Analytik auf SLN zu übertragen, wurde zunächst die Gelfiltration als universell einsetzbare Methode zur Abtrennung von SLN von überschüssigem Plasma etabliert. Danach wurden die optimalen Parameter der Probenaufbereitung von Cetylpalmitat-SLN mittels Zentrifugation bestimmt (drei Waschschritte mit 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4). Die Inkubation von SLN in Plasmen unterschiedlicher Spender hatte ebenso wenig einen Einfluss auf die resultierenden Proteinmuster, wie die unterschiedliche Stabilisation der Plasmen mit Natriumcitrat bzw. Natrium-EDTA oder das Einfrieren der Plasmen über vier Monate bei -70°C . Die Inkubation von ausgewählten SLN-Formulierungen in Serum konnte zeigen, dass keine Aktivierung des Komplementsystems stattfand. Außerdem wurde gezeigt, dass die Verwendung von IPG-Strips mit linearem Gradienten eine gute Alternative darstellt, um die adsorbierten Mengen von ApoC-III, ApoC-II und ApoA-II zu differenzieren.

Nach Klärung der wichtigsten methodischen Parameter der 2-DE-Analytik mit SLN erfolgte ein Rezepturscreening mit Variation der verwendeten Tenside. Primäres Ziel war dabei die Anreicherung von ApoE auf der Oberfläche der SLN, um einen Arzneistoffcarrier zu entwickeln, der - ähnlich wie Polybutylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikel - einen Transport über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ermöglicht, jedoch nach i. v. Injektion besser verträglich ist. Durch Herstellung unterschiedlicher Tensid-Reihen konnten erste Korrelationen zwischen den Oberflächeneigenschaften der untersuchten Cetylpalmitat-SLN (bzw. den Eigenschaften der eingesetzten Tenside) und der resultierenden Plasmaproteinadsorptionsmuster aufgestellt werden. Ein wichtiges Ergebnis in diesem Zusammenhang war die Feststellung, dass die adsorbierten Mengen von ApoE bzw. ApoA-IV mit steigender Polyethylenoxid-Kettenlänge der verwendeten Block-Copolymere exponentiell bzw. annähernd linear

abnehmen. In der Reihe der untersuchten Block-Copolymere zeichnete sich insbesondere der P-gp-Hemmer Poloxamer 235 durch den höchsten ApoE/ApoC-II-Quotienten in Verbindung mit der zweithöchsten Menge ApoA-IV als für das Gehirn-Targeting sehr interessantes Tensid aus. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die adsorbierten Mengen von ApoE bzw. ApoA-IV mit kleiner werdendem HLB-Wert der Polysorbate kontinuierlich zunahm. Neben Poloxamer 235 und Polysorbat 80 erwiesen sich Poloxamer 184, Lecithin und TPGS (ein weiterer P-gp-Hemmer) als geeignete Tenside, um das Proteinmuster zu optimieren.

Im nächsten Schritt wurde gezeigt, dass das verwendete Matrixlipid einen großen Einfluss auf das resultierende Adsorptionsmuster hat, wobei bei gleicher sterischer Abschirmung, Partikelgröße bzw. -ladung die Oberflächenhydrophobie des Lipids die entscheidende Rolle spielte. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Cetylpalmitat-SLN durchaus auf andere SLN, die von Lipiden mit ähnlicher Hydrophobie gebildet werden (z. B. Compritol oder Witepsol E85), übertragbar sind.

Im weiteren Vorgehen wurde die Kinetik bei der Adsorption von Plasmaproteinen auf SLN untersucht. Es wurde zwar wie bei Polystyrol-Partikeln ein „Vroman-Effekt“ festgestellt, jedoch beschränkte sich diese Verdrängung von Fibrinogen durch Apolipoproteine auf die erste Adsorptionsphase (Subsekundenbereich). Bei längerer Kontaktzeit (Minuten- und Stundenbereich) zeigten sich die Adsorptionsmuster von oberflächenmodifizierten SLN als viel weniger zeitabhängig (ähnlich bei O/W-Emulsionen) als die von oberflächenmodifizierten Polystyrol-Partikeln. Darüber hinaus konnte auch die „physiologische Stabilität“ von SLN nachgewiesen werden, denn die Proteinmuster von physikochemisch stabilen SLN waren über mindestens zwei Jahre Lagerung stabil. Diese Feststellungen bildeten weitere wichtige Grundlagen für die gezielte Entwicklung von SLN als Arzneistoffcarrier über die BHS.

Neben SLN wurden auch die Plasmaproteinadsorptionsmuster von Fettemulsionen untersucht, die als Träger für das Narkosegas Xenon entwickelt wurden und *in vivo* am Schwein getestet wurden. Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Proteinadsorption von der jeweiligen Tröpfchengröße (Oberflächenkrümmung). Obwohl die Rezepturoptimierung von Abbolipid 10% mit Polysorbat 80 nicht zu der erwarteten Zunahme der Adsorption von ApoE führte, konnte mit dieser Formulierung die beste klinische Wirkung erzielt werden. Die Tatsache, dass Xenon auch ohne

Transportvektor die BHS passieren kann, erschwerte allerdings auch die Korrelation der Proteinmuster mit dem klinischen Effekt. Davon abgesehen waren die klinischen Erfolge einer Injektionsnarkose mit Xenon-beladenen Fettemulsionen sehr vielversprechend, da sie (aufgrund eines viel geringeren Verbrauchs im Vergleich zur Inhalationsnarkose) das Wirtschaftlichkeitsproblem bei der Verwendung von Xenon als Narkosegas lösen könnten. Auf diese Weise könnte Xenon, das viele Kriterien eines idealen Narkosegases erfüllt, einen erfolgreichen Weg zur regelmäßigen Anwendung am Patienten antreten.

Des Weiteren wurden erste Untersuchungen zur Plasmaproteinadsorption auf Nanopartikeln aus Gelatine (Gelatine-NP) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Apolipoproteine keineswegs auf allen Carriersystemen die dominierende Proteinspezies darstellt, da sie auf Gelatine-NP über einen relativen Anteil von ca. 3% nicht hinaus kamen. Aufgrund der bestimmten Proteinadsorptionsmuster scheinen positiv geladene Gelatine-NP ein geeignetes Gentransfersystem zu sein für ein „passives Targeting“ zur Aufnahme in immunkompetente Zellen. Ein Gehirn-Targeting dürfte mit diesen Partikeln jedoch eher schwierig zu realisieren sein. Außerdem wurde gezeigt, dass die Oberflächenmodifikation von Gelatine-NP mit Cholesterin einen größeren Einfluss auf das Proteinmuster hat, als die anschließende Bindung eines Oligonukleotids an die Oberfläche der positiv geladenen Partikel. Zusätzlich wurde die Proteinadsorption nach Inkubation in Rattenplasma bestimmt, anhand deren Muster die gleichen Schlussfolgerungen gezogen werden konnten.

Die Analyse der Proteinadsorption auf arzneistoffbeladenen bzw. unbeladenen „Kern-Schale-Nanopartikeln“ nach Inkubation in Humanplasma lieferte Muster, die sehr stark von Apolipoproteinen dominiert (über 90%) und untereinander sowohl qualitativ als auch quantitativ sehr ähnlich waren. Aufgrund der durchgeführten *In-vitro*-Zellversuche mit Makrophagen erfolgte zusätzlich die Analyse der Proteinadsorption nach Inkubation in dem verwendeten Zellmedium. Auch hier waren die Muster untereinander relativ ähnlich, jedoch waren sie (aufgrund von anderen Konzentrationsverhältnissen) nicht ganz so stark geprägt von Apolipoproteinen. Die *In-vitro*-Studie lieferte das überraschende Ergebnis einer leichten Überlegenheit von unbeladenen gegenüber arzneistoffbeladenen Polymerpartikeln hinsichtlich des therapeutischen Effekts. Dies konnte unter anderem durch die Tatsache der höheren

Adsorption von Oponinen auf den unbeladenen Partikeln erklärt werden. Dieser Unterschied war zwar nicht besonders stark ausgeprägt, jedoch zeigte dieses Ergebnis gerade auch deshalb die Bedeutung auch kleinster Verschiebungen im Proteinmuster, für den Fall, dass sie Proteine betreffen, die für den beobachteten Vorgang entscheidend sind.

Die Untersuchungen unterschiedlicher Arzneistoffsysteme, die für eine i. v. Applikation am Menschen in Frage kommen, zeigten, dass SLN aufgrund ihrer physikochemischen Ähnlichkeit zu Lipoproteinpartikeln sehr gut geeignet sind, um ein „ideales Plasmaproteinadsorptionsmuster“ zur Überwindung der BHS auszubilden. Da dieses Muster dann auch während der Zirkulation im Blutstrom bestand hat und sich auch nach längerer Lagerung der Dispersion reproduzierbar ausbildet, wurde die Basis für die Entwicklung eines gut verträglichen und im industriellen Großmaßstab einfach herstellbaren Arzneistoffcarrier, der zu einem Gehirn-Targeting führen kann, gelegt.

In der weiteren Entwicklung dieses Systems gilt es zu überprüfen, ob bzw. inwieweit sich die Plasmaproteinadsorptionsmuster von SLN nach Beladung mit einem Arzneistoff ändern. Es ist jedoch zu erwarten, dass - ähnlich wie bei bereits untersuchten Fettemulsionen oder Polymerpartikeln - die festgestellten Muster bestand haben, zumindest für den Fall, dass man einen Arzneistoff wählt, der sich innerhalb der Partikel aufhält. Aus Sicht der Arzneistoffbeladung ist es ein weiteres interessantes Ziel, die 2-DE Analytik und die bisher ermittelten Erkenntnisse auf die zweite Generation der Lipidnanopartikel, die NLC (Nanostrukturierte Lipidcarrier) zu übertragen, da diese eine höhere Beladungskapazität aufweisen. Außerdem gilt es zu klären, inwieweit die in dieser Arbeit (weitgehend anhand von früheren *In-vivo*-Studien) aufgestellten Vermutungen hinsichtlich der Organverteilung im Tierversuch bestätigt werden können.