

5 Plasmaproteinadsorption auf mit Doxorubicin beladenen und unbeladenen PBCA-Nanopartikeln mit Human- und Rattenplasma zur Überwindung der BBB

5.1 Einleitung

5.1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Therapie von Erkrankungen des ZNS wird erschwert durch die Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier; BBB). Sie sorgt dafür, dass die meisten Substanzen aus dem Blutkreislauf in das Gehirn nur sehr verlangsamt oder überhaupt nicht aufgenommen werden.

Die genauen Gründe für die transportbeschränkenden Mechanismen sind im Einzelnen nicht bekannt. Als morphologisches Substrat der Blut-Hirn-Schranke wird in erster Linie das Gefäßendothel angesehen, da die Interzellularräume durch „tight junctions“ überbrückt sind (Thews, Mutschler et al. 1991). Außerdem zeichnet sich das Gewebe durch fehlende Fenestrierung und das Fehlen von Poren aus. Die Endothelzellen selbst sind nochmals von einer dichten Basalmembran umschlossen (Borchard 1998). Für essentielle Nährstoffe, wie beispielsweise Aminosäuren oder Glucose werden aktive Carrierproteine auf der Oberfläche der Blut-Hirn-Schranke exprimiert (Friden 1996). Der freie Übertritt durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS ist ausschließlich sehr kleinen oder lipophilen Molekülen, wie beispielsweise Nikotin, Alkohol oder Halothan, vorbehalten, deren Molekülmasse weniger als 500 Da beträgt. Sie sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke durch Diffusion zu passieren und in das Gehirn zu gelangen.

In den letzten Jahrzehnten hat die Therapie von Erkrankungen des ZNS immer mehr an Bedeutung gewonnen. Durch die Verschiebung der Altersstruktur treten

Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson immer mehr in den Vordergrund. Neben den gesellschaftlichen Problemen für die Betroffenen belasten derartige Erkrankungen die Krankenkassen enorm. Alleine in den USA waren 1996 vier Millionen Menschen an Alzheimer erkrankt, was den drittgrößten Kostenblock im amerikanischen Gesundheitsbudget von fünfzig Milliarden Dollar verursachte.

Die meisten Arzneistoffmoleküle können also von sich aus die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Deshalb ist eine medikamentöse Therapie von Gehirntumoren nahezu unmöglich. Die einzige Möglichkeit bieten hier invasive Strategien, bei denen die Blut-Hirn-Schranke physikalisch umgangen wird. Hier wird durch chirurgischen Eingriff ein Implantat in das Gehirn eingesetzt (Friden 1996). Die Therapie von Erkrankungen des ZNS stellt dadurch eine somit Herausforderung dar.

Eine der bislang aussichtsreichsten Strategien, Arzneistoffe ins Gehirn zu transportieren, ist die Rezeptor-vermittelte Transcytose (Partridge 1991; Partridge 1996; Dehouck, Fenart et al. 1997). Das Endothel der Hirnkapillaren ist besetzt mit Rezeptoren für Peptide und Proteine. Einige von ihnen dienen als Transportsysteme für essentielle Stoffe, wie z.B. Insulin. Auch für die LDLs und VLDLs werden entsprechende Rezeptoren auf den Endothelzellen beschrieben (Partridge 1996; Wyne, Pathak et al. 1996; Lucarelli, Gennarelli et al. 1997).

Basierend auf diesen Kenntnissen wurde versucht, Ligandenkonjugate aus den entsprechenden Proteinen und den Arzneistoffen zu entwickeln, die dann einen Transport ins Gehirn ermöglichen.

Eine Weiterentwicklung dieser Idee ist es, das Potential von Nanopartikeln für den Transport ins Gehirn auszunutzen. Anders als die oben beschriebenen Konjugate haben Nanopartikel eine hohe Transportkapazität. Darüber hinaus ist es möglich, die Oberfläche des Nanopartikels gezielt zu modifizieren (Borchard 1998). Über Kopplung von Antikörpern bzw. Proteinfragmenten oder über die Ausnutzung des Konzeptes der differentiellen Adsorption (Müller 1989; Blunk 1994) könnte es hier möglich sein, entweder eine längere Verweildauer des Partikels am Hirnendothel oder gar einen Übertritt des gesamten Partikels in die Endothelzellen und schließlich ins Gehirn zu vermitteln.

5.1.2 Die Entdeckung von Apolipoprotein E als Medium für ein Gehirntargeting

Lück analysierte die Plasmaproteinadsorption auf PBCA-Partikeln, die mit Dalargin beladen und mit Polysorbat 80 präinkubiert waren (Lück 1997). Dalargin ist ein Leu-Enkephalin-Analogon und bewirkt einen zentralen analgetischen Effekt. Außerhalb des ZNS zeigt es keine Wirkung. Es ist darüber hinaus nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke (BBB) zu überwinden. In Zusammenhang mit den PBCA-Partikeln und Polysorbat 80 konnte jedoch ein analgetischer Effekt nachgewiesen werden, der zunächst nicht erklärt werden konnte (Alyautdin 1995; Kreuter, Alyautdin et al. 1995; Alyautdin and D.A. 1997; Alyautdin, Tezikov et al. 1998).

Die Analyse der Partikel durch Lück ergab, dass sich auf den mit Polysorbat 80 gecoateten Partikeln im Vergleich zu den reinen Dalarginpartikeln eine signifikant höhere Menge an Apolipoprotein E (ApoE) befand. ApoE rückte daraufhin in den Mittelpunkt des Interesses der Forschungen um die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Es wurde die Theorie entwickelt, dass entsprechend zum „Konzept der differentiellen Adsorption“ (Blunk 1994) Polysorbat 80 in der Lage ist, vermehrt ApoE auf den Partikeln zu binden (Müller, Lück et al. 1997). Für ApoE existieren an der Blut-Hirn-Schranke verschiedene Rezeptoren, die zur Familie der LDL-Rezeptoren gehören (Schneider and Nimpf 1993). Das adsorbierte ApoE vermittelt dann den Übergang des Arzneistoffes oder des kompletten Nanopartikel-Arzneistoff-Komplexes in die Endothelzellen und anschließend in das ZNS. Es konnte bislang nicht geklärt werden, ob die PBCA-Partikel durch Endocytose in das Endothel eindringen oder ob ausschließlich der auf der Partikeloberfläche adsorbierte Arzneistoff in die Zelle penetriert.

Zusätzlich ist bekannt, dass Polysorbat 80 eine hemmende Wirkung auf das P-Glykoprotein (Pgp) besitzt, das wie eine Pumpe dafür verantwortlich ist, eingedrungene Stoffe oder Abbauprodukte aus dem ZNS heraus zu transportieren (Begley, Bradbury et al. 2000).

Eine weitere Theorie beschäftigte sich mit der Toxizität der PBCA-Nanopartikel. Man vermutete, dass die Anwesenheit der PBCA-Partikel zu einem kurzzeitigen

Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke oder einer Öffnung der „tight junctions“ führt (Olivier, Fenart et al. 1999). Die Abbauprodukte der PBCA-Partikel sollten hier die Perfusion bewirken. Diese Theorie wurde jedoch mittlerweile widerlegt (Kreuter, Ramge et al. 2003).

Die Kenntnisse über den genauen Mechanismus des Transportes von Arzneistoffen über die Blut-Hirn-Schranke sind bislang noch sehr lückenhaft. Möglicherweise ist es eine Verkettung der oben genannten Vorgänge, die entweder nacheinander oder parallel ablaufen. Man ging jedoch lange Zeit davon aus, dass sowohl Polysorbat 80, als auch ApoE für eine Blut-Hirn-Schranken-Passage unabdingbar sind.

5.1.3 Doxorubicin-Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Ein Nachweis für die Wirksamkeit von auf PBCA-Partikeln adsorbiertem Doxorubicin gegenüber Hirntumoren wurde ebenfalls erbracht (Gulyaev and G.Ya. & Kreuter 1999; Gelperina, Khalansky et al. 2002; Steiniger, Kreuter et al. 2004).

Darüber hinaus fand man heraus, dass nicht nur Dox-Partikel, die mit Polysorbat 80 inkubiert waren, einen therapeutischen Effekt hatten, sondern auch Partikel, die mit Poloxamer 188 vorbehandelt wurden. Der Effekt war mit dem der Partikel, die mit Polysorbat 80 inkubiert wurden, vergleichbar. Da Poloxamer 188 kein Hemmstoff für PgP darstellt, rückten die adsorbierten Plasmaproteine als entscheidende Mediatoren zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in den Fokus. Eine umfangreiche 2-D PAGE-Studie wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob eventuell eine ApoE-vermittelte Aufnahme von Dox-Partikeln in die Endothelzellen stattfindet.

5.1.4 Herstellung der PBCA-Partikel

Die Nanopartikel wurden von Herrn Alexander Bootz vom Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main, hergestellt. Der Syntheseweg wird aus Abbildung 12 ersichtlich. Die Butylcyanoacrylat-Monomere wurden durch anionische Emulsionspolymerisation in 0,001 N HCl unter Zusatz von Dextran 70.000 hergestellt. Nach 40 Minuten wurde das Doxorubicin zugegeben und es wurde weitere 2,5 h polymerisiert. Danach wurde der Ansatz neutralisiert und eine weitere Stunde gerührt. Die entstandene Suspension wurde filtriert und mit 3% Mannit versetzt. Danach wurde das Produkt gefriergetrocknet (Freeze-Drier Christ Alpha 1-5, Osterode/Harz), (Bootz, Russ et al. 2005; Labarre, Vauthier et al. 2005). 1 ml Nanosuspension enthält 2 mg Doxorubicin.

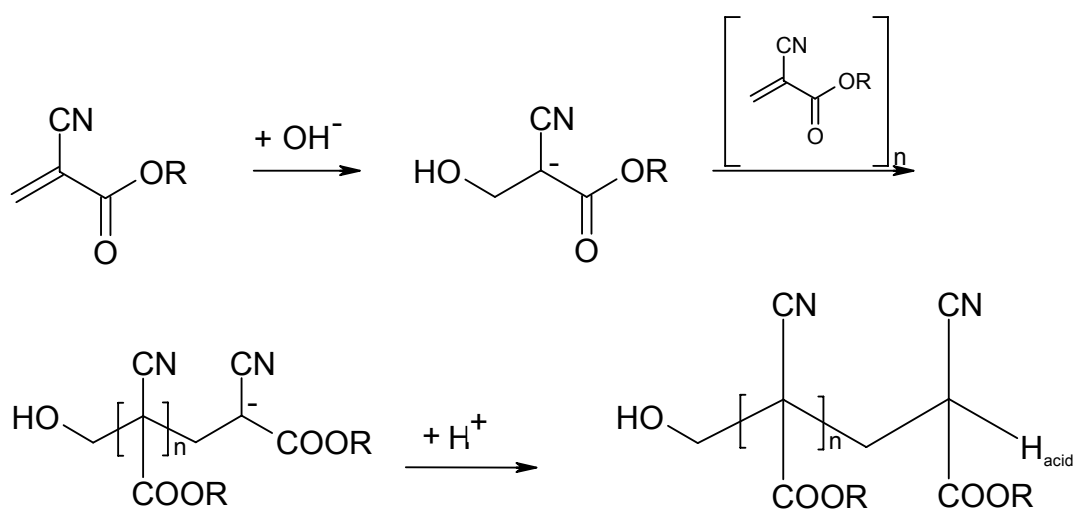


Abbildung 12: Syntheseweg der Nanopartikelherstellung nach Bootz et. al. 2005

5.1.5 Doxorubicin

Doxorubicin (Abbildung 13) ist ein Antibiotikum mit zytotoxischen Eigenschaften. Es wird gewonnen aus Kulturen einer Mutante von *Streptomyces peuceticus* (Burger and Wachter 1998) und gehört zur Gruppe der Anthracycline. Es wird angewendet als Antineoplastikum bei Lymphomen, Leukämien und soliden Tumoren. Der Wirkmechanismus begründet sich durch Einlagerung des Tetracyclinrestes in die DNA. Doxorubicin ist ein Prodrug und wird in der Zelle durch mikrosomale Cytochrom-P-450-Reduktasen zur eigentlichen Wirkform, dem Semichinon-Radikal, reduziert. Dieses produziert dann Sauerstoffradikalanionen, die dann zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen in der DNA führen können (Forth, Henschler et al. 1996).

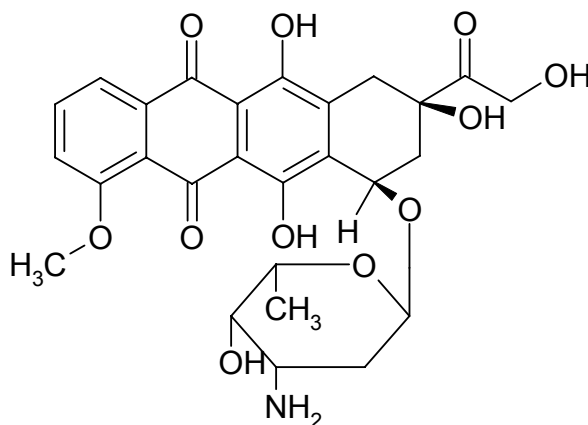


Abbildung 13: Strukturformel von Doxorubicin

5.2 Ergebnisse der 2-D PAGE- und Tierstudien

5.2.1 Ziele der Analyse

In einer weiteren Tierstudie, die von Dr. Svetlana Gelperina am Zentrum für Molekulare Diagnostik in Moskau durchgeführt wurde, stellte sich heraus, dass nicht nur mit Polysorbat 80 gecoatete PBCA-Partikel in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Eine Charge, die mit Poloxamer 188 gecoatet war, zeigte sich den Polysorbat-Partikeln ebenbürtig.

In dieser 2-D PAGE-Studie sollten nun die Plasmaadsorptionsmuster der einzelnen Nanosuspensionen ermittelt werden. Hierzu wurden mit Dox beladene und unbeladene Nanopartikel untersucht, die jeweils mit Polysorbat 80 und Poloxamer 188 inkubiert waren. Die Studien wurden in Humanplasma und in Rattenplasma durchgeführt. Das Schema der Analyse ist in Abbildung 14 dargestellt. Das Matching der Pherogramme mit Rattenplasma erfolgte nach (Haynes, Miller et al. 1998; Miller, Haynes et al. 1998; Miller, Haynes et al. 1999).

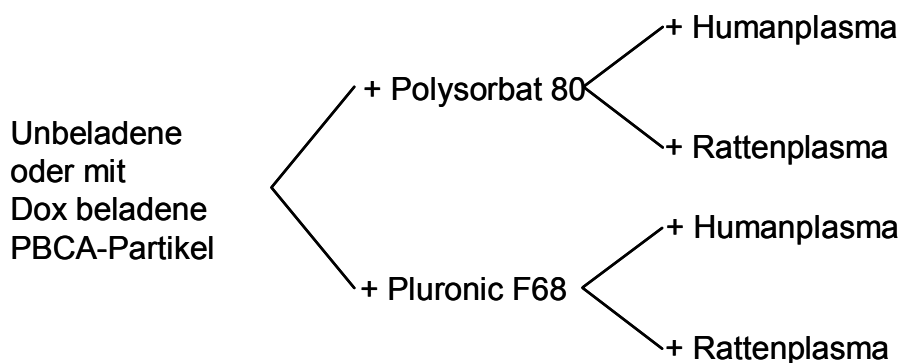


Abbildung 14: Schema der Analyse

Basierend auf den Erkenntnissen, die Lück 1997 gewonnen hatte, sollte speziell die Adsorption von ApoE untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, dass sowohl Polysorbat 80 als auch Poloxamer 188 adsorbiert auf der Nanopartikeloberfläche in

der Lage ist, ausreichend ApoE auf ihrer Oberfläche zu binden, welches anschließend einen Transport über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen könnte.

Viele *in-vivo*-Versuche werden in Ratten durchgeführt, um anschließend auf den Menschen übertragen zu werden. Da die Plasmaproteinadsorption auf Nanopartikeln als der entscheidende Faktor für die Organverteilung angesehen wird, sollte ermittelt werden, inwieweit die Proteinmuster beider Spezies vergleichbar sind. Ferner sollten Parallelen und Unterschiede der Proteinmuster im Hinblick auf reine PBCA-Partikel und mit Dox beladene sowie die beiden verwendeten Tenside herausgearbeitet werden.

5.2.2 Probenaufbereitung

Das Lyophilisat wurde mit 2,0 ml einer 1%igen Tensidlösung redispergiert und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1,0 ml Nanosuspension abpipettiert und in einem Inkubationsröhrchen mit 3,0 ml Plasma versetzt. Das Gemisch wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Nanopartikel durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 23.000 x g vom Inkubationsmedium getrennt. Die Partikel wurden dreimal mit jeweils 1,0 ml Aqua bidest. gewaschen und nach jedem Waschschrift erneut durch Zentrifugation davon getrennt. Nach Desorption der Proteine von der Partikeloberfläche wurden 100 µl Prüflösung der 2-D PAGE zugeführt.

5.2.3 Ergebnisse der 2-D PAGE- Analysen

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse der 2-D PAGE-Studie jeweils in Form einer Tabelle und als Abbildung eines Pherogramms aufgelistet. Die Tabellen zeigen die Ergebnisse jeweils in absoluten (Volume) und prozentualen (%Vol) Werten. Jeweils ein Pherogramm wurde stellvertretend abgebildet.

5.2.3.1 Plasmaproteinadsorption in Humanplasma

5.2.3.1.1 PBCA-Partikel inkubiert mit Polysorbat 80

Tabelle 11: Proteinadsorption von PBCA-Polysorbat 80 in Humanplasma, n=4

		PBCA + Polysorbat 80 in Humanplasma
gesamt	Volume	121380 ± 36483
Albumin	Volume %	1894 ± 1047 1,5 ± 0,4
α -1-Antitrypsin	Volume %	1454 ± 514 1,2 ± 0,2
ApoA-I	Volume %	22498 ± 6491 18,5 ± 3,1
ApoA-IV	Volume %	5617 ± 2079 4,6 ± 0,7
ApoC-III	Volume %	950 ± 324 0,8 ± 0,4
ApoE	Volume %	9766 ± 2424 8,4 ± 2,2
ApoJ	Volume %	8666 ± 2921 7,2 ± 1,4
Haptoglobin	Volume %	12483 ± 2399 10,6 ± 2,0
IgG γ	Volume %	27730 ± 7847 23,0 ± 1,9
Ig leichte Ketten	Volume %	29019 ± 12688 22,9 ± 4,3

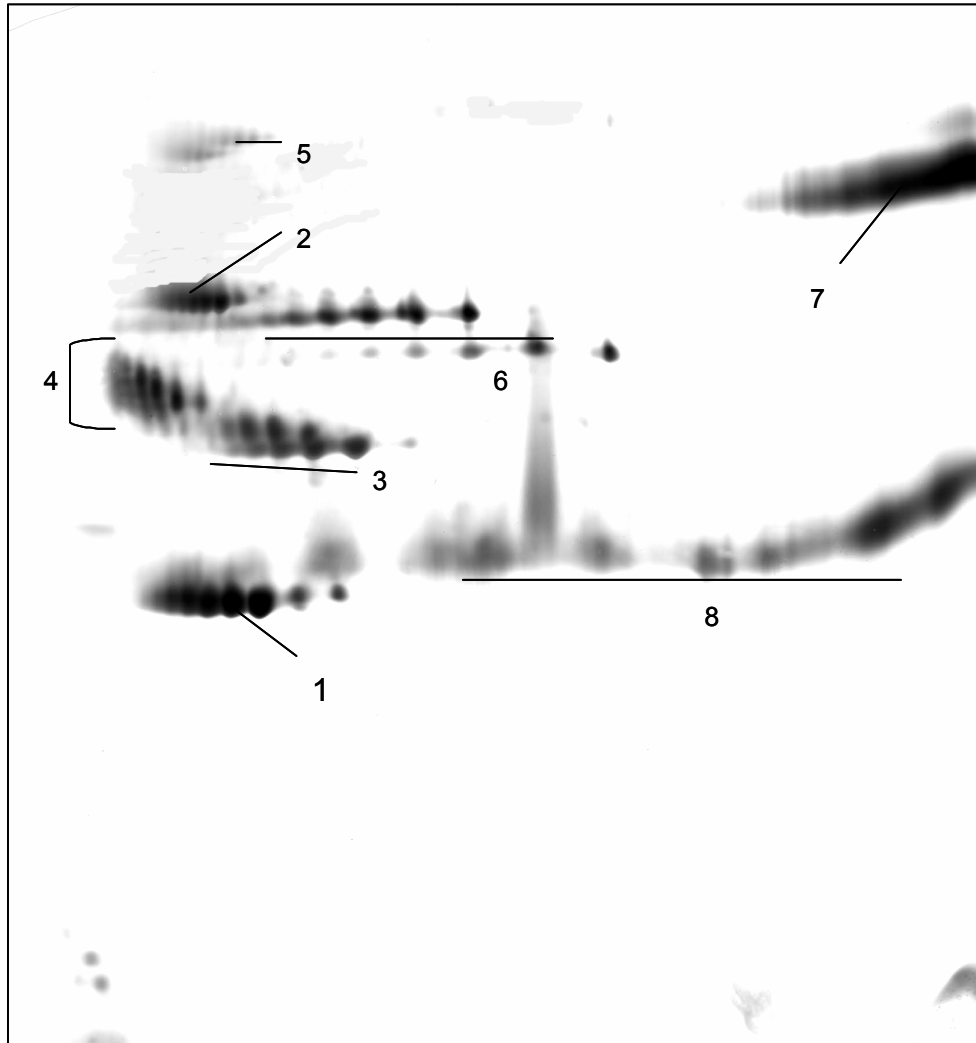


Abbildung 15: Pherogramm unbelastener PBCA-Partikel inkubiert mit Polysorbat 80 in Humanplasma.

1: ApoA-I, 2: ApoA-IV, 3: ApoE, 4: ApoJ, 5: α -1-Antitrypsin, 6: Haptoglobin, 7: IgG γ , 8: Ig leichte Ketten

5.2.3.1.2 PBCA-Partikel inkubiert mit Poloxamer 188

Tabelle 12: Proteinadsorption PBCA-Poloxamer 188 in Humanplasma, n=4

		PBCA + Poloxamer 188 in Humanplasma
gesamt	Volume	94481 ± 18324
Albumin	Volume	1413 ± 686
	%	1,4 ± 0,5
α-1-Antitrypsin	Volume	1005 ± 366
	%	1,0 ± 0,2
ApoA-I	Volume	19641 ± 8280
	%	20,7 ± 6,6
ApoA-II	Volume	7098 ± 1992
	%	7,7 ± 2,5
ApoA-IV	Volume	5989 ± 2181
	%	6,3 ± 1,8
ApoC-II	Volume	4565 ± 2009
	%	4,9 ± 2,1
ApoC-III	Volume	12531 ± 3108
	%	13,7 ± 4,8
ApoE	Volume	3939 ± 1763
	%	4,1 ± 1,3
ApoJ	Volume	11009 ± 4939
	%	11,7 ± 4,5
IgG γ	Volume	10478 ± 8031
	%	10,9 ± 7,5
Ig leichte Kette	Volume	10145 ± 4617
	%	10,3 ± 3,1
Transthyretin	Volume	5883 ± 1642
	%	6,1 ± 0,6

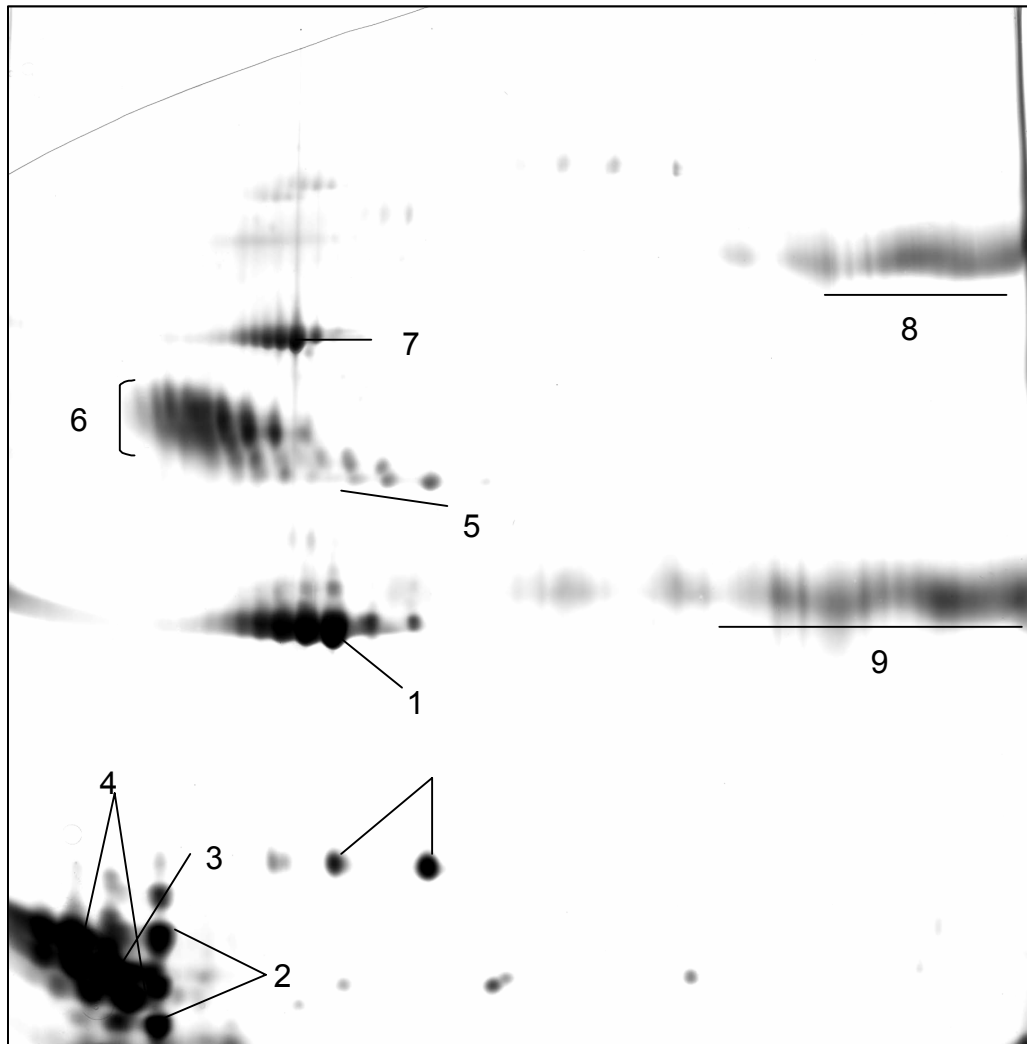


Abbildung 16: Pherogramm unbeladener PBCA-Partikel inkubiert mit Polxamer 188 in Humanplasma.

1: ApoA-I, 2: ApoA-II, 3: ApoC-II, 4: ApoC-III, 5: ApoE, 6: ApoJ, 7: ApoA-IV, 8: IgG γ , 9: Ig leichte Ketten

5.2.3.1.3 Dox-PBCA inkubiert in Polysorbat 80

Tabelle 13: Proteinadsorption Dox-PBCA-Polysorbat 80 in Humanplasma, n=4

		Dox-PBCA + Polysorbat 80 in Humanplasma
gesamt	Volume	121373 ± 18568
Albumin	Volume	9407 ± 4155
	%	7,5 ± 2,6
α -1-Antitrypsin	Volume	950 ± 149
	%	0,8 ± 0,1
ApoA-I	Volume	1184 ± 810
	%	1,0 ± 0,6
ApoA-IV	Volume	1108 ± 378
	%	0,9 ± 0,3
ApoE	Volume	1126 ± 667
	%	0,9 ± 0,5
ApoJ	Volume	2916 ± 818
	%	2,4 ± 0,5
β-1-B-Glykoprotein	Volume	2974 ± 2389
	%	2,4 ± 1,6
Fibrinogen	Volume	17025 ± 1361
	%	14,1 ± 2,8
Haptoglobin	Volume	2668 ± 263
	%	2,2 ± 0,2
IgG γ	Volume	32635 ± 3040
	%	26,9 ± 2,1
Ig leichte Ketten	Volume	37683 ± 7249
	%	31,2 ± 1,9
IgM	Volume	9758 ± 1019
	%	8,2 ± 0,7

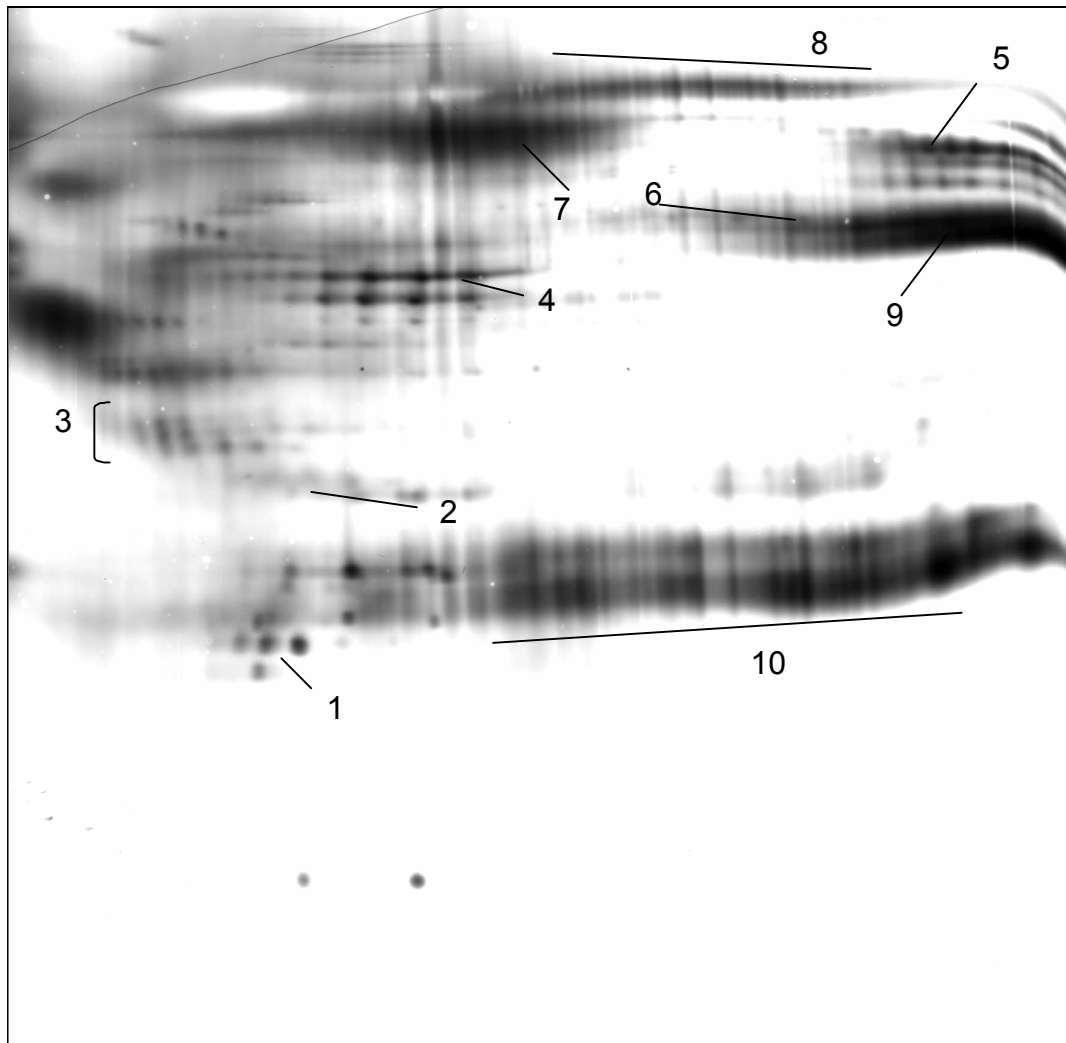


Abbildung 17: Pherogramm eines mit Doxorubicin beladenen Partikels, inkubiert mit Polysorbat 80 in Humanplasma

1: ApoA-I, 2: ApoE, 3: ApoJ, 4: Fibrinogen γ , 5: Fibrinogen α , 6: Fibrinogen β , 7: Albumin, 8: IgM, 9: IgG γ , 10: Ig leichte Ketten

5.2.3.1.4 Dox-PBCA inkubiert in Poloxamer 188

Tabelle 14: Proteinadsorption Dox-PBCA-Poloxamer 188 in Humanplasma n=4

		Dox-PBCA + Poloxamer 188 in Humanplasma
gesamt	Volume	190450 ± 20586
Albumin	Volume %	14378 ± 5942 7,7 ± 3,6
ApoA-I	Volume %	3660 ± 2995 2,0 ± 1,7
ApoA-II	Volume %	1376 ± 730 0,7 ± 0,4
ApoA-IV	Volume %	1300 ± 647 0,7 ± 0,4
ApoC-II	Volume %	2188 ± 798 1,1 ± 0,4
ApoC-III	Volume %	9475 ± 1921 5,0 ± 1,3
ApoE	Volume %	205 ± 139 0,2 ± 0,05
ApoJ	Volume %	2474 ± 1329 0,9 ± 0,7
Fibrinogen	Volume %	11302 ± 2840 17,7 ± 4,1
IgG γ	Volume %	60582 ± 10104 31,7 ± 1,9
Ig leichte Ketten	Volume %	44483 ± 3525 23,3 ± 0,7
IgM	Volume %	19511 ± 5329 10,1 ± 1,8

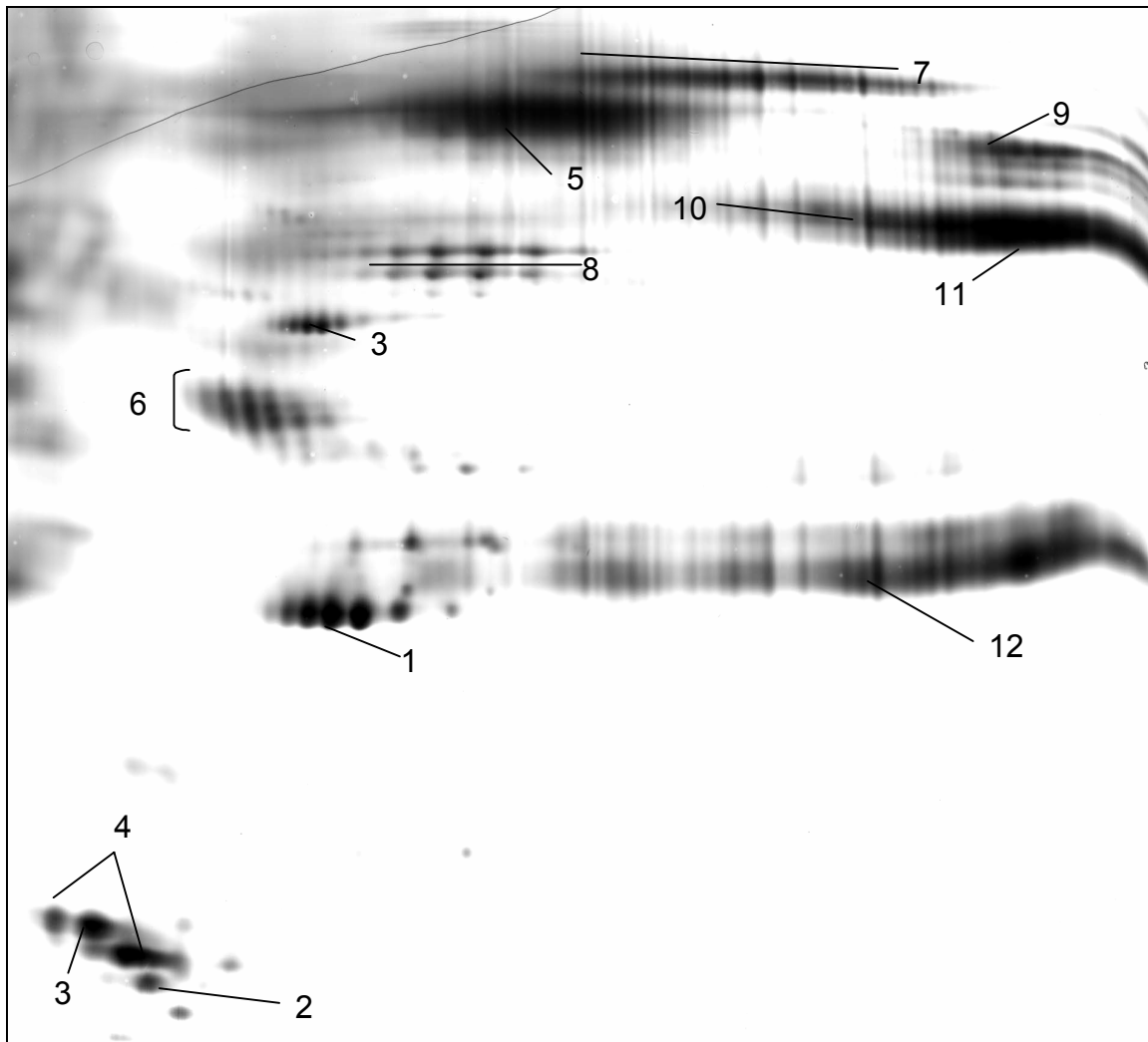


Abbildung 18: Pherogramm eines mit Doxorubicin beladenen Partikels, inkubiert mit Poloxamer 188 in Humanplasma

1: ApoA-I, 2: ApoA-II, 3: ApoC-II, 4: ApoC-III, 5: Albumin, 6: ApoJ, 7: IgM, 8: Fibrinogen γ , 9: Fibrinogen α , 10: Fibrinogen β , 11: IgG γ , 12: Ig leichte Ketten

5.2.3.2 Plasmaproteinadsorption in Rattenplasma

5.2.3.2.1 PBCA inkubiert in Polysorbat 80

Tabelle 15: Proteinadsorption PBCA-Polysorbat 80 in Rattenplasma n=4

		PBCA + Polysorbat 80 in Rattenplasma
gesamt	Volume	38990 ± 12897
Albumin	Volume	838 ± 368
	%	2,2 ± 1,0
ApoA-I	Volume	8377 ± 3077
	%	20,8 ± 2,1
ApoA-IV	Volume	3935 ± 3030
	%	9,2 ± 3,8
ApoC-II	Volume	7371 ± 4109
	%	17,6 ± 7,6
ApoJ	Volume	4089 ± 3443
	%	9,8 ± 6,5
IgG γ	Volume	7556 ± 702
	%	20,9 ± 7,3
Ig leichten Ketten	Volume	1293 ± 42
	%	3,5 ± 1,3
Transferrin	Volume	5207 ± 1075
	%	13,5 ± 2,5

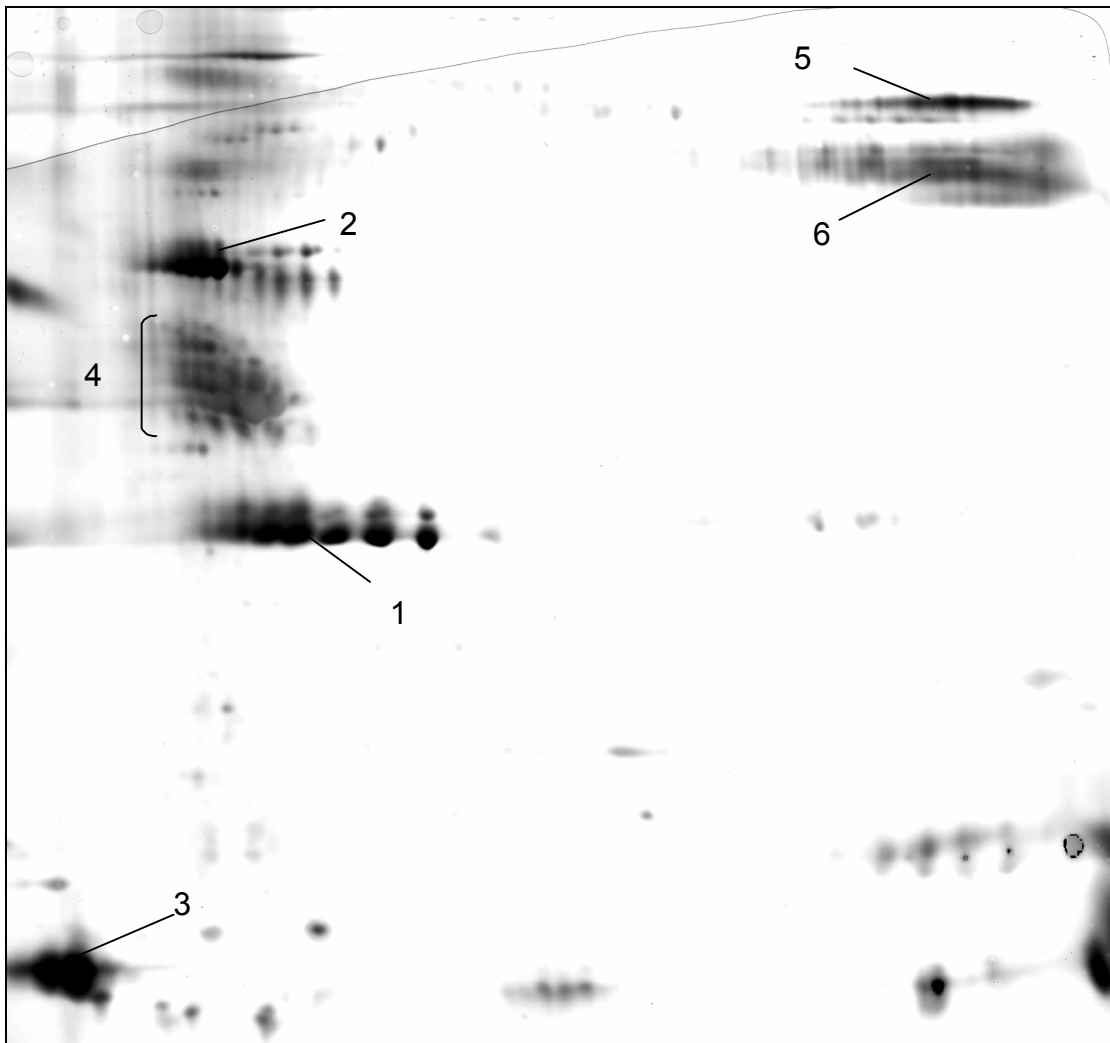


Abbildung 19: Pherogramm eines unbeladenen Partikels, inkubiert mit Polsorbat 80 in Rattenplasma

1: ApoA-I, 2: ApoA-IV, 3: ApoC-II, 4: ApoJ, 5: Transferrin 6: IgG γ

5.2.3.2.2 PBCA inkubiert in Poloxamer 188

Tabelle 16: Proteinadsorption PBCA-Poloxamer 188 in Rattenplasma n=4

		PBCA + Poloxamer 188 in Rattenplasma
gesamt	Volume	79535 ± 8576
Albumin	Volume	2920 ± 2509
	%	3,5 ± 2,8
α-1-Antitrypsin	Volume	2289 ± 1007
	%	2,9 ± 1,2
α-1-HS-Glykoprotein	Volume	5928 947
	%	7,4 ± 0,1
ApoA-I	Volume	3595 ± 876
	%	4,4 ± 0,8
ApoA-IV	Volume	7134 ± 1226
	%	8,8 ± 0,9
ApoC-III	Volume	9430 ± 3376
	%	12,1 ± 5,6
ApoE	Volume	294 ± 143
	%	0,3 ± 0,04
ApoJ	Volume	21886 ± 1990
	%	24,9 ± 5,2
IgG γ	Volume	9508 ± 2719
	%	11,7 ± 2,9
Ig leichte Kette	Volume	2006 ± 476
	%	2,5 ± 0,5
Ig Zwischenkette	Volume	4762 ± 1913
	%	6,4 ± 2,9
Transferrin	Volume	7467 ± 1479
	%	9,3 ± 1,0

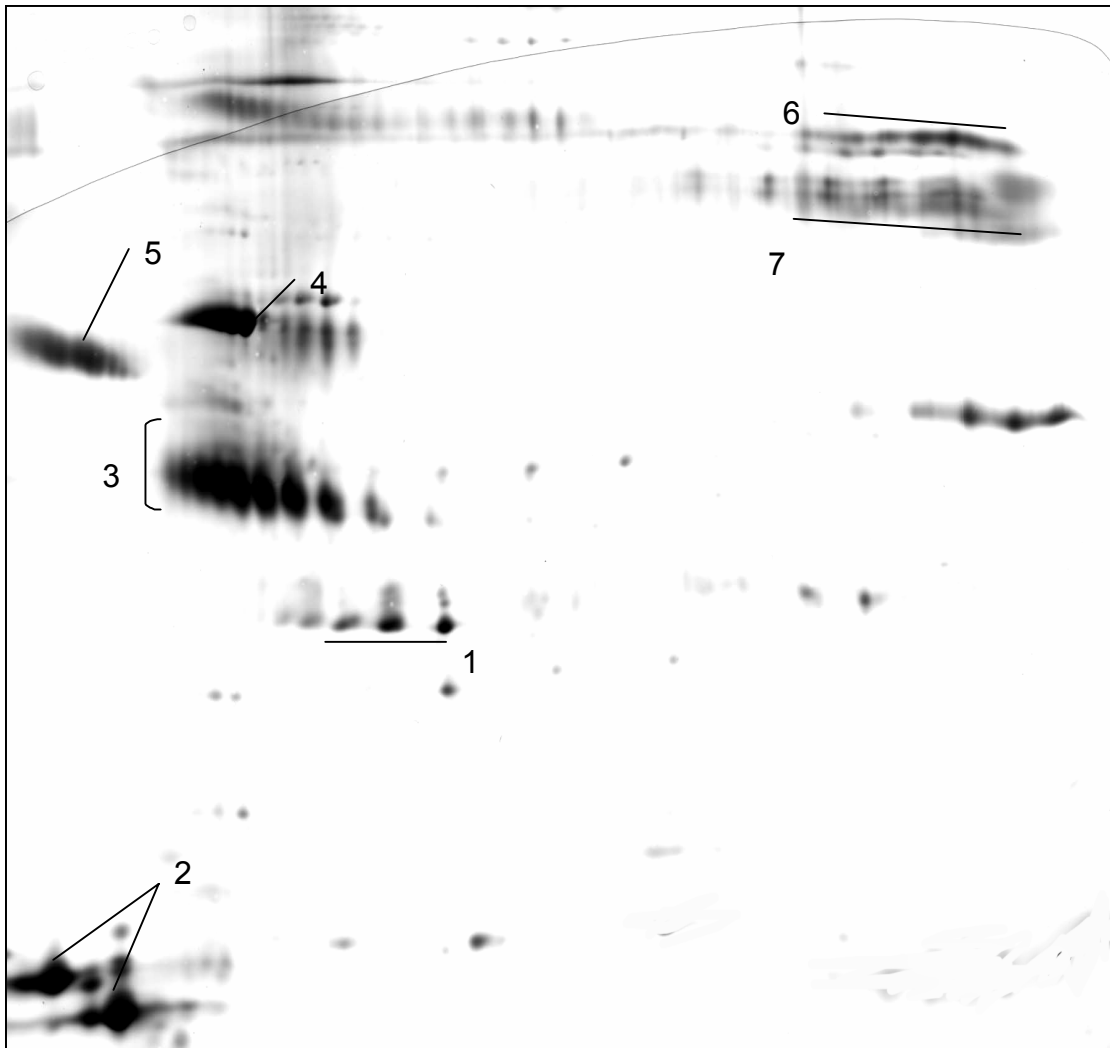


Abbildung 20: Pherogramm eines unbeladenen Partikels, inkubiert mit Poloxamer 188 in Rattenplasma

1: ApoA-I, 2: ApoC-III, 3: ApoJ, 4: ApoA-IV, 5: α -1-HS-Glykoprotein, 6: Transferrin, 7: IgG γ

5.2.3.2.3 Dox-PBCA inkubiert mit Polysorbat 80

Tabelle 17: Übersicht Proteinadsorption Dox-PBCA-Polysorbat 80 in Rattenplasma n=4

		PBCA-Dox + Poloxamer 188 in Rattenplasma
gesamt	Volume	65975 ± 24792
Albumin	Volume %	5767 ± 4336 7,4 ± 4,2
ApoA-I	Volume %	16205 ± 6490 24,0 ± 1,2
ApoC-II	Volume %	2707 ± 2078 3,8 ± 3,2
ApoJ	Volume %	5166 ± 3269 7,5 ± 3,0
IgG γ	Volume %	12099 ± 2776 19,1 ± 8,5
Ig leichte Kette	Volume %	10354 ± 2222 15,7 ± 3,9
IgM	Volume %	868 ± 260 1,3 ± 0,2
Plasminogen	Volume %	1627 ± 378 2,6 ± 1,2
Thiostatin	Volume %	10975 ± 7431 15,5 ± 4,7

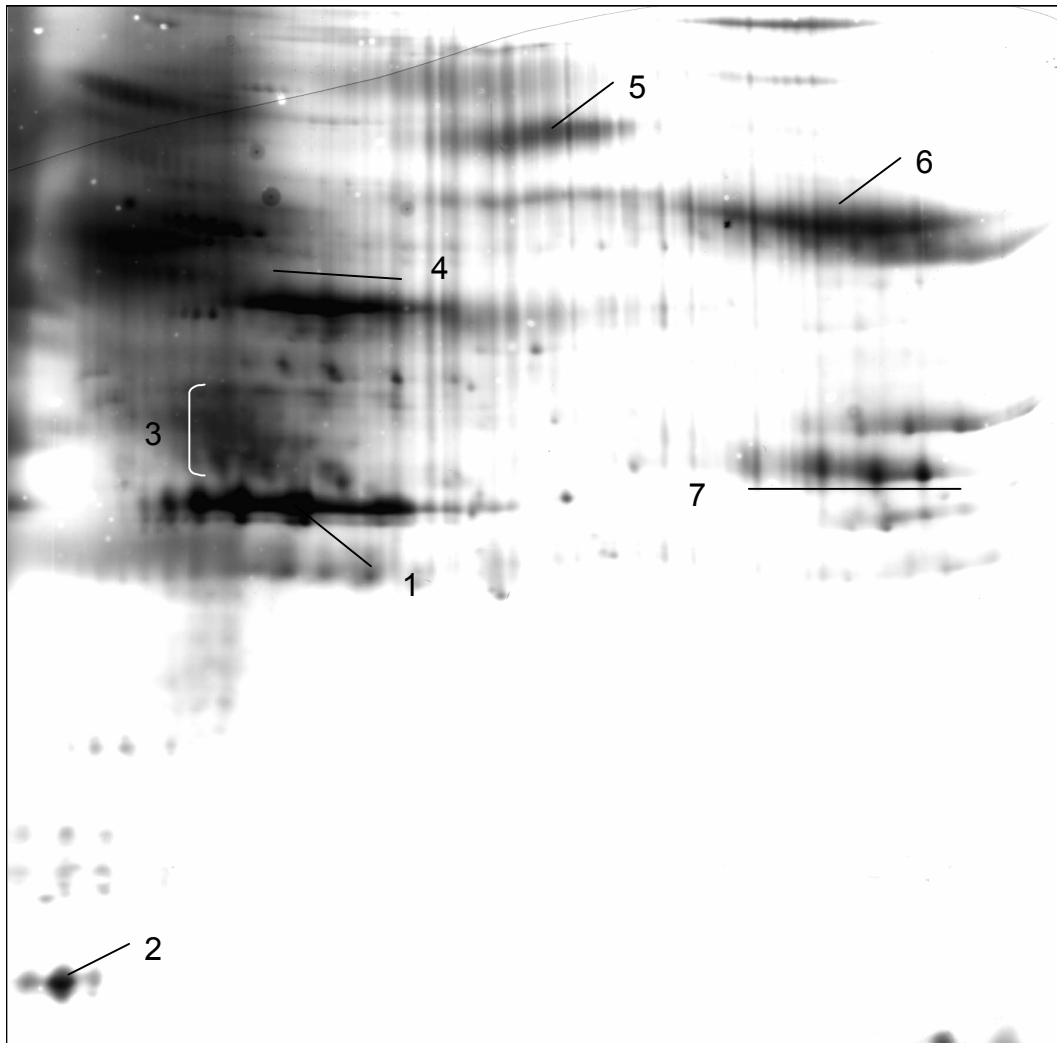


Abbildung 21: Pherogramm eines mit Doxorubicin beladenen Partikels, inkubiert mit Polysorbat 80 in Rattenplasma

1: ApoA-I, 2: ApoC-II, 3: ApoJ, 4: Thiostatin, 5: Albumin, 6: IgG γ , 7: Ig leichte Ketten

5.2.3.2.4 Dox-PBCA inkubiert mit Poloxamer 188

Tabelle 18: Proteinadsorption Dox-PBCA-Polysorbat 80 in Rattenplasma n=4

		PBCA-Dox + Poloxamer 188 in Rattenplasma
gesamt	Volume	92100 ± 27750
Albumin	Volume %	8655 ± 2714 9,2 ± 1,2
α-1-Antitrypsin	Volume %	2220 ± 241 2,5 ± 0,6
ApoA-I	Volume %	22554 ± 6825 24,0 ± 3,7
ApoA-IV	Volume %	2743 314 3,1 ± 0,7
ApoC-II	Volume %	7218 ± 1630 8,4 ± 3,9
ApoJ	Volume %	7906 ± 1615 8,6 ± 1,0
IgG γ	Volume %	14376 ± 6855 14,7 ± 3,2
Ig leichte Kette	Volume %	13739 ± 5156 14,4 ± 2,8
IgM	Volume %	1563 ± 586 1,7 ± 0,2
Plasminogen	Volume %	635 ± 422 0,6 ± 0,3
Transthyretin	Volume %	310 ± 109 0,3 ± 0,1
Thiostatin	Volume %	9489 ± 7169 9,4 ± 4,1

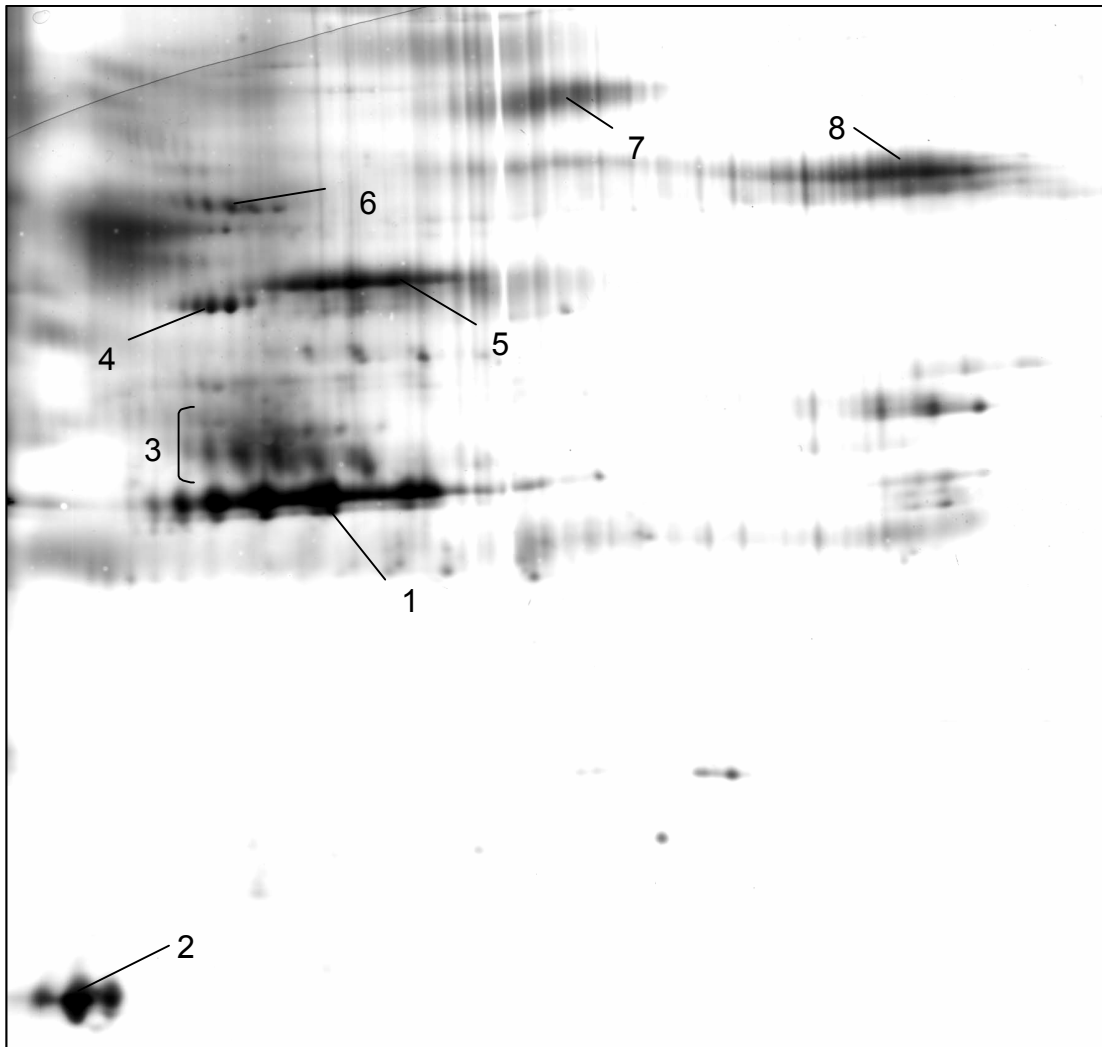


Abbildung 22: Pherogramm eines mit Doxorubicin beladenen Partikels, inkubiert mit Polysorbat 80 in Rattenplasma

1: ApoA-I, 2: ApoC-II, 3: ApoJ: 4: ApoA-IV, 5: Thiostatin, 6. α -1-Antitrypsin, 7: Albumin
8: IgG γ

5.2.3.3 Übersicht über die Gesamtproteinadsorption

Die Ergebnisse der Gesamtproteinadsorption sind zusammenfassend in Abbildung 23 dargestellt. Hier lässt sich zunächst erkennen, dass die Gele der Nanopartikel, die nach Inkubation mit Humanplasma erstellt wurden, stärker angefärbt sind als jene, die mit Rattenplasma inkubiert wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass humane Proteine eine stärkere Affinität zu den untersuchten PBCA-Partikeln aufweisen. Da für die Proteine des Rattenplasmas keine Kalibriergeraden vorliegen (vgl. Kap.4), kann diesbezüglich jedoch keine exakte Aussage getroffen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Proteine der Species Ratte lediglich schwächer auf die Silberfärbung reagieren und dadurch den Anschein erwecken, eine niedrigere Proteinbeladung zu besitzen.

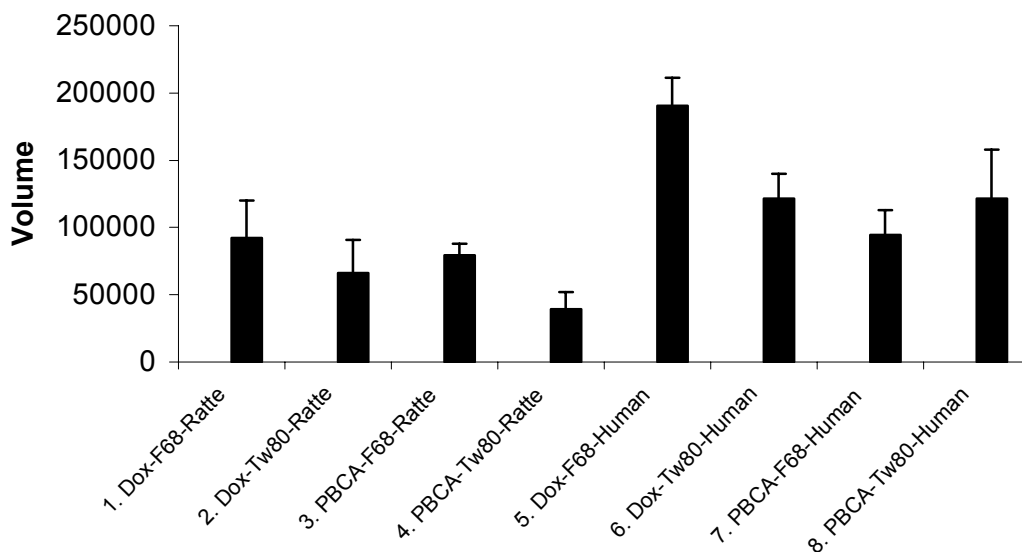


Abbildung 23: Gesamtproteinadsorption der einzelnen Partikelsuspensionen in den jeweiligen Inkubationsmedien. Die Werte sind die Mittelwerte aus n=4 Versuchen. Abkürzungen: F68: Poloxamer 188, Tw80: Polysorbat 80

Der Vergleich der beiden verwendeten Tenside lässt hier schon eher eine gesicherte Aussage zu, da hier Proteine der gleichen Species miteinander verglichen werden konnten.

Es ließ sich bei drei von den vier hier untersuchten Fällen feststellen, dass die Partikel, die mit Poloxamer 188 inkubiert wurden eine zum Teil deutlich höhere Proteinbeladung aufwiesen. Lediglich die unbeladenen PBCA-Partikel, die in Humanplasma inkubiert wurden, zeigten bei Polysorbat 80 eine etwas höhere Proteinbeladung als die entsprechenden mit Poloxamer 188 inkubierten Partikel. Das heißt aber letztendlich nicht, dass tatsächlich viel mehr Protein an den Partikeln, die mit Polysorbat 80 inkubiert waren auf der Partikeloberfläche vorhanden waren. Wird die qualitative Zusammensetzung der adsorbierten Proteine näher betrachtet, so kann man feststellen, dass der Anteil der Apolipoproteine am Gesamtproteinmuster über 69%Vol beträgt. Der Anteil der Lipoproteine auf den Gelen der Partikel, die mit Poloxamer 188 inkubiert war, beträgt hingegen nur 39,5%Vol. Lipoproteine färben sich während der Silberfärbung im Gegensatz zu den übrigen Plasmaproteinen stärker an, sodass ein hoher Anteil an Lipoproteinen einen höheren Wert für die gesamte Proteinbeladung ergibt. Man kann daher generell die Aussage treffen, dass mit Doxorubicin beladene und unbeladene Partikel, die mit Poloxamer 188 inkubiert sind in der Lage sind, mehr Proteine auf der Oberfläche zu binden.

Zuletzt sollte die Proteinbeladung der beladenen und unbeladenen Partikel untersucht werden. Hier lässt sich feststellen, dass die mit Doxorubicin beladenen Partikel bei beiden Species einen signifikant höheren Wert in der Gesamtbeladung aufwiesen. Eine Ausnahme bildet hier wieder der Partikeltyp Nr. 8 (Abbildung 23). Die Werte von Partikeltyp Nr.8 und Nr. 6 (Abbildung 23) waren nahezu identisch. Auch hier gilt das bereits oben erwähnte. Grundsätzlich kann man annehmen, dass die Anwesenheit des Doxorubicins auf der Oberfläche eine Art Anker für die Proteine darstellt. Bei einigen Partikeltypen wirkte sich dies ganz besonders gravierend aus. Partikeltyp Nr. 2 adsorbierte in etwa das doppelte von Partikeltyp Nr. 4. Dasselbe gilt für den Vergleich der Partikeltypen Nr. 5 und Nr. 7.

5.2.4 Vergleich der einzelnen Parameter

5.2.4.1 Vergleich der Proteinadsorption der Species Mensch und Ratte

Um einen genauen Vergleich der Plasmaproteinadsorption in Human- und Rattenplasma ziehen zu können wurden die jeweils gleich zusammengesetzten Nanopartikel, die in derselben Tensidlösung inkubiert wurden miteinander verglichen.

5.2.4.1.1 PBCA inkubiert in Polysorbat 80

Die Analyse der Plasmaproteinmuster auf den reinen PBCA-Partikeln ergab einige Übereinstimmungen zwischen Mensch- und Rattenplasma (Abbildung 24). Auf den Pherogrammen beider Plasmaproben adsorbierte eine große Menge an ApoA-I. Allerdings adsorbierte auf den Partikeln, die in Humanplasma inkubiert wurden etwa die 2,5- bis 3-fache Menge. Der prozentuale Anteil von ApoA-I auf beiden Proben war vergleichbar groß. Er machte bei beiden Species ca. 20%Vol am Gesamtproteinanteil aus. Weitere Übereinstimmungen zeigten sich bei der Adsorption von IgG γ , dessen Anteil auf beiden Gelen ebenfalls bei etwa 20%Vol lag sowie bei Albumin, ApoJ (Clusterin) und ApoA-IV.

Die absoluten Werte lagen bei den Partikeln in Humanplasma deutlich über denen des Rattenplasmas, meist um den Faktor zwei oder drei höher. Generell konnte festgestellt werden, dass die Proteinadsorption auf den Pherogrammen der Partikel, die mit Humanplasma inkubiert wurden, etwa dreimal so hoch war wie auf denen die mit Rattenplasma inkubiert wurden.

Große Unterschiede zwischen den Species ergaben sich jedoch bei der Adsorption von ApoC-III. Konnte auf den Gelen der Partikel, die in Humanplasma inkubiert waren nur ein Menge von 950 Vol festgestellt werden, so lag der Wert in Rattenplasma bei 7373 Vol und betrug damit 17,6 % des Gesamtanteils am Proteinmuster. Des Weiteren fand sich auf den Gelen mit menschlichen

Plasmaproteinen eine signifikant große Menge an ApoE und Haptoglobin. Auf den Gelen, die mit Plasma der Ratte inkubiert waren konnte kein ApoE-Spot (!) und auch kein Haptoglobin nachgewiesen werden. Dafür fand sich auf den Gelen des Rattenplasmas eine größere Menge Transferrin.

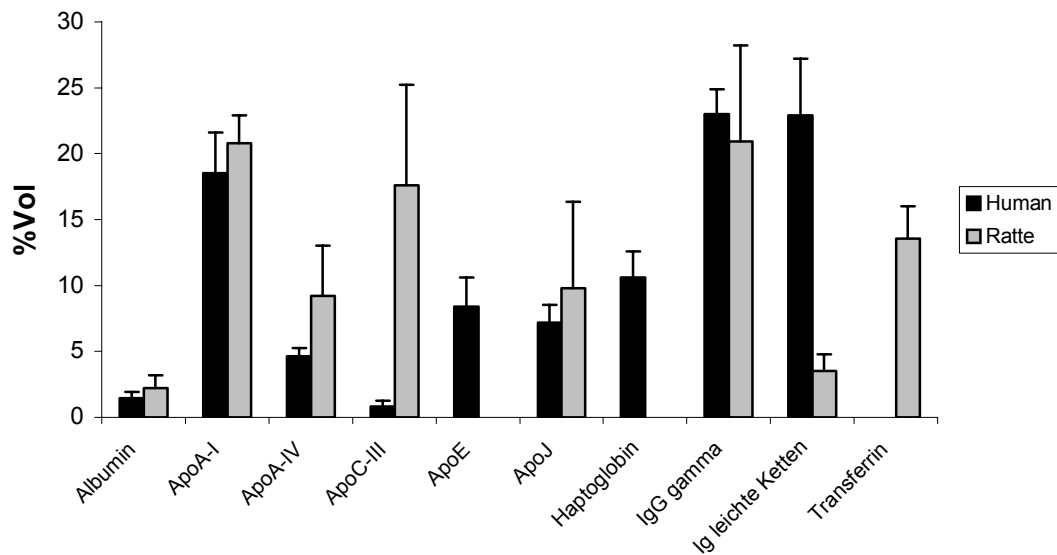


Abbildung 24: Vergleich der Plasmaproteinmuster von Human- und Rattenplasma unbeladener PBCA-Partikel inkubiert in Polysorbat 80 (n=4)

Grundsätzlich kann man feststellen, dass es einerseits deutlich Unterschiede zwischen den jeweiligen Pherogrammen gibt, andererseits zeigen sich aber auch Übereinstimmungen in den Proteinfractionen der Apolipoproteine A-I und J und IgG γ .

5.2.4.1.2 PBCA inkubiert in Poloxamer 188

Auf den mit Poloxamer gecoateten Partikeln war die Differenz der Menge an Gesamtprotein zwischen den beiden Species relativ klein. Auf den Gelen, deren Partikel mit Humanplasma inkubiert wurden, ergab die Silberfärbung eine um ca. 20% größere Proteinmenge.

Im Vergleich zu den PBCA-Partikeln, die mit Polysorbat 80 inkubiert wurden zeigten die Gele, die mit Poloxamer 188 inkubiert wurden, qualitativ und quantitativ noch weniger Übereinstimmungen.

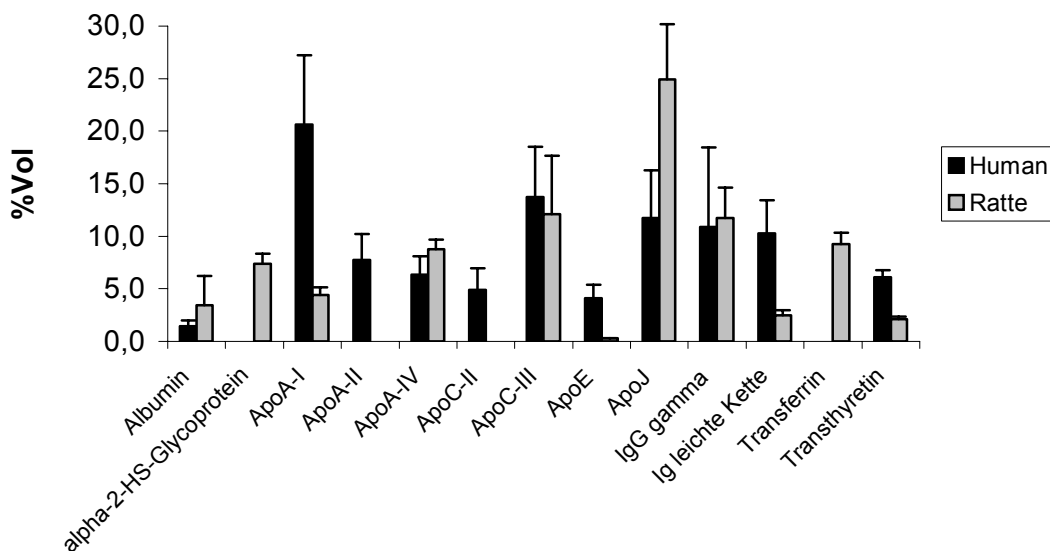


Abbildung 25: Vergleich der Plasmaproteinmuster von Human- und Rattenplasma unbeladener PBCA-Partikel inkubiert in Poloxamer 188 (n=4)

Eine ziemlich exakte Übereinstimmung fand sich in den Adsorptionswerten von ApoC-III, ApoA-IV und, wenn auch weniger ausgeprägt, bei IgG γ . Wie aus Abbildung 25 ersichtlich, konnte man bei einigen anderen Proteinen, wie Albumin, ApoA-I, ApoE, ApoJ und Transthyretin und auf den Gelen beider Plasmasorten zwar

entsprechende Spots detektieren, die Mengen auf den Gelen allerdings unterschieden sich mitunter sehr stark. So konnte beispielsweise auf den Pherogrammen der Gele mit Humanproteinen eine deutliche Menge von ApoE (3939 Vol = 4,1 %Vol) detektiert werden. Auf den Gelen mit Rattenproteinen war ApoE lediglich in einer Stärke von 294 Vol, entsprechend 0,3 %Vol, vorhanden. Nicht ganz so extrem, aber dennoch erheblich zeigten sich die Differenzen bei den Proteinen ApoA-I, ApoJ, Albumin und Transthyretin. Die Menge von ApoA-I auf Humanplasma war mehr als viermal so hoch als auf den Gelen, die mit Rattenplasma erstellt wurden. Diese wiederum zeigten einen ApoJ-Spot, der ungefähr der doppelten Menge dessen entsprach, was sich auf den Gelen mit menschlichen Proteinen detektieren ließ.

Erneut zeigten sich auch Proteine auf den Pherogrammen der einen Species, die sich auf den anderen überhaupt nicht nachweisen ließen. So fand sich auf den Gelen, die mit Rattenplasma erstellt wurden ein Spot von α -2-HS-Glykoprotein, der 7,4% am Gesamtproteinmuster der Partikel betrug. Außerdem konnte noch ein großer Spot von Transferrin detektiert werden, der 9,3% betrug. Auf den Gelen, die mit Humanplasma erstellt wurden, konnte eine signifikante Menge an ApoC-II detektiert werden, die wiederum auf den Gelen des Rattenplasmas nicht detektierbar waren. Die Menge an ApoC-II auf den betreffenden Pherogrammen betrug im Durchschnitt 4,9%Vol.

Bemerkenswert ist zweifelsfrei die hohe Adsorptionsrate von ApoJ auf den Pherogrammen, die mit Rattenplasma inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die Gele des Humanplasmas eine Kumulation von Lipoproteinen der Familie A. Die Summe der Werte für ApoA-I, II und IV ergibt über 30%Vol.

5.2.4.1.3 Dox-PBCA inkubiert in Polysorbat 80

Konnte man auf den unbeladenen PBCA-Partikeln noch gewisse Ähnlichkeiten zwischen den beiden Species Mensch und Ratte ausmachen, so muss man für die beladenen PBCA-Partikel feststellen, dass sich die Proteinadsorptionsmuster grundlegend unterscheiden. Abbildung 26 stellt die beiden Proteinmuster vergleichend dar.

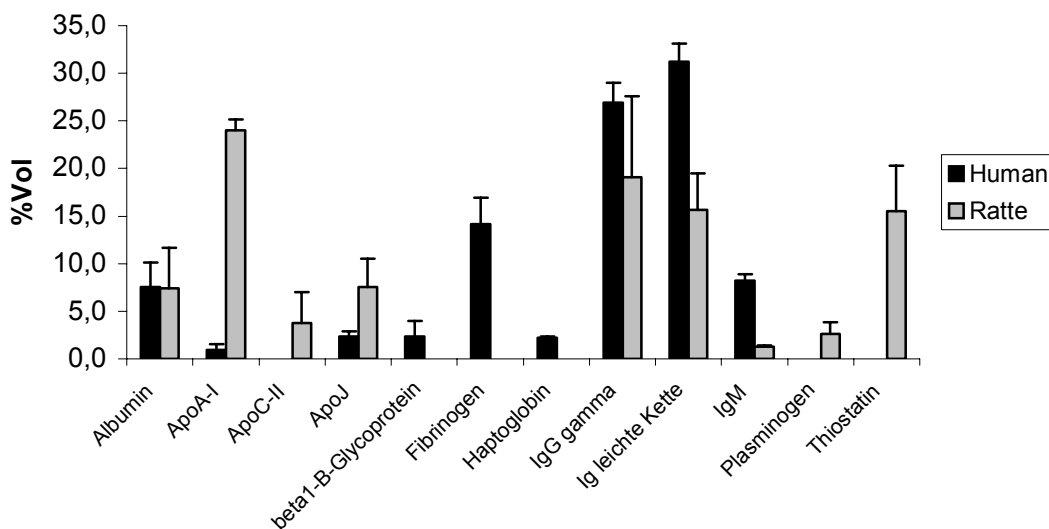


Abbildung 26: Vergleich der Plasmaproteinmuster von Human- und Rattenplasma

Dox-beladener PBCA-Partikel, inkubiert in Polysorbat 80 (n=4)

Sicherlich gibt es Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Proteinmustern. Die prozentualen Adsorptionswerte für Albumin und IgG γ sind sich sehr ähnlich. Dies scheint jedoch, gemessen an den übrigen Werten, rein zufälliger Natur zu sein und ist wohl eher nicht auf die gleiche Affinität des Albumins unterschiedlicher Species auf dieselbe Oberfläche zurückzuführen.

Weiterhin sind auf den Gelen beider Species Spots detektiert worden von ApoA-I, ApoJ, und IgM. Hier muss man allerdings feststellen, dass die Werte sich so deutlich

unterscheiden, dass in diesem Fall nicht mehr von Ähnlichkeiten im Proteinmuster gesprochen werden kann. So liegt z.B. der Wert für adsorbiertes ApoA-I um den Faktor 15 höher auf den Pherogrammen des Rattenplasmas. Zusätzlich konnte eine relativ hohe Menge ApoJ auf der Partikeloberfläche nachgewiesen werden. Thiostatin, Plasminogen und ApoC-II konnten zusätzlich auf den Gelen des Rattenplasmas, im Gegensatz zu den Gelen des Humanplasmas, nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von Thiostatin, einem sog. „acute-phase protein“ könnte darauf schließen lassen, dass die Ratten, aus denen das Plasma gewonnen wurde, an einem Infekt litten. Thiostatin, auch „major acute-phase α_1 protein“ (α_1 MAP) genannt ist spezifisch für Ratten. Es wird bei Infekten in der Leber produziert und dann ausgeschüttet. Die Konzentration liegt normalerweise bei ca. 0,5 g/l und ist kaum auf einem Pherogramm nachweisbar. Es kann aber bei Infekten um das 20-fache ansteigen (Urban, Chan et al. 1979). Da das Plasma nicht vom Großhandel bezogen, sondern aus Tieren aus einem Versuchslabor selbst hergestellt wurde, waren die Konzentrationen hier wahrscheinlich höher.

Die Partikel, die in Humanplasma inkubiert wurden, zeigten eine Gesamtproteinadsorption, die nahezu doppelt so hoch war wie die des Rattenplasmas. Hier konnte eine Anreicherung von Fibrinogen, das bei Rattenplasma überhaupt nicht vorhanden war, und vor allem von IgG γ und IgM festgestellt werden. Die Mengen an Apolipoproteinen, die hier nachgewiesen wurden, sind vernachlässigbar klein.

Die Anwesenheit von Doxorubicin auf der Partikeloberfläche hat offensichtlich dazu geführt, dass sich die Adsorptionsmuster grundlegend voneinander unterscheiden! Dies legt die Vermutung nahe, dass Doxorubicin in Ratten und im Menschen ganz unterschiedlich an Plasmaproteine bindet. Während auf den Gelen des Humanplasmas fast ausschließlich opsonisierende Proteine adsorbierten, konnte man auf denen des Rattenplasmas eine Reihe von Apolipoproteinen nachweisen, deren Konzentration gemessen am Gesamtproteinmuster über 35% betrug.

5.2.4.1.4 Dox-PBCA inkubiert in Poloxamer 188

Auch hier musste festgestellt werden, dass sich die Proteinmuster der einzelnen Species grundlegend voneinander unterscheiden. Die Proteinbeladung war auf den Gelen der mit Humanplasma inkubierten Proteine in etwa um den Faktor 1,5 höher als auf denen des Rattenplasmas.

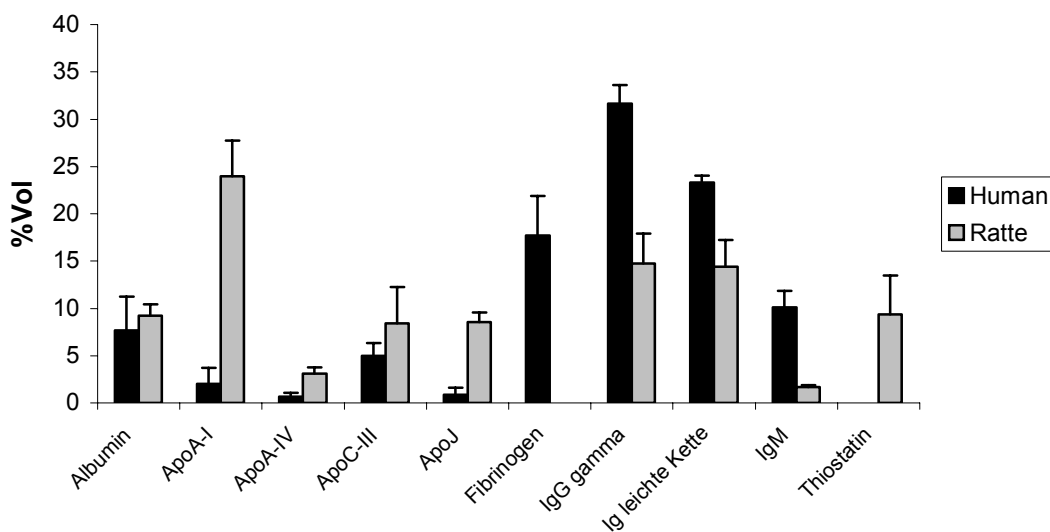


Abbildung 27: Vergleich der Plasmaproteinmuster von Human- und Rattenplasma

Dox-beladener PBCA-Partikel, inkubiert in Poloxamer 188 (n=4)

Auch hier waren auf beiden Pherogrammen die Albuminwerte nahezu identisch. Eine weitere Ähnlichkeit zeigte sich in der Adsorption von ApoC-III. Darüber hinaus konnten aber praktisch keine Übereinstimmungen bei beiden Species festgestellt werden. Die Gele, die mit Humanplasma inkubiert waren, zeigten eine Kumulation opsonisierender Proteine wie Fibrinogen, IgG γ und IgM. Die adsorbierte Menge an ApoA-I ist mit 2%Vol kaum erwähnenswert. Bemerkenswert erscheint hier noch, dass man auf den Gelen, wenn auch nur in geringen Mengen, Proteine des Komplementsystems nachweisen konnte.

Anders stellte sich die Situation bei den mit Rattenplasma inkubierten Gelen dar. Hier zeigt sich ein viel differenzierteres Adsorptionsmuster. Wiederum konnte eine signifikant höhere Menge an ApoA-I detektiert werden. Hinzu kam eine große Menge an ApoJ und ApoC-III. Insgesamt machte die Menge der adsorbierten Apolipoproteine zusammen über 43% der Gesamtproteinadsorption aus. Wie bereits in Kapitel 5.2.4.1.3 erwähnt, kam es hier auch zu einer Adsorption von Thiostatin. Fibrinogen konnte auf den Partikeln, die in Rattenplasma inkubiert wurden, nicht nachgewiesen werden.

5.2.4.2 Vergleich der Proteinadsorption zwischen Polysorbat 80 und Poloxamer 188

5.2.4.2.1 Polysorbat 80

Polysorbat 80 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat) ist besser bekannt unter seinem Handelsnamen Tween[®] 80. Die chemische Struktur des Moleküls zeigt Abbildung 28. Es handelt sich um ein nichtionisches Tensid vom O/W-Typ und lässt sich einordnen in die Gruppe der sog. PEG-Sorbitanfettsäureester. Polysorbat 80 besitzt einen HLB-Wert von 15. Im Zentrum des Moleküls befindet sich das Sorbitan, das aus zweifacher Wasserabspaltung aus Sorbitol synthetisiert wird. Pro mol Sorbitan sind ungefähr 20 mol PEG im Molekül vorhanden (Fiedler 1996). Polysorbat 80 ist in Deutschland zur intravenösen Applikation freigegeben.

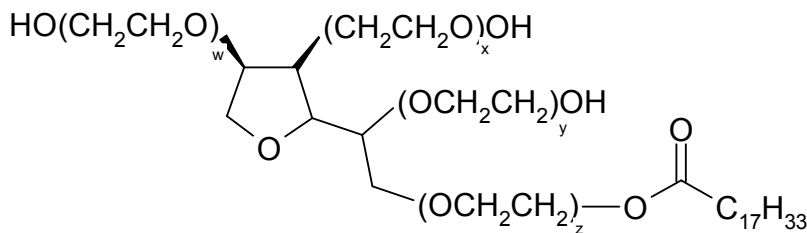


Abbildung 28: Strukturformel von Polysorbat 80

5.2.4.2.2 Poloxamer 188

Poloxamer 188 ist in Deutschland unter unterschiedlichen Bezeichnungen im Handel, u.a. Pluronic[®] F68, Synperonic[®] F68 oder Lutrol[®] F68. Es handelt sich ebenfalls um ein nicht ionogenes Tensid vom O/W-Typ und es besitzt einen HLB-Wert von 29. Die Abbildung 29 zeigt die Strukturformel von Poloxamer 188. Es lässt sich einordnen in die Gruppe der sog. Blockcopolymer. Der Name Blockcopolymer leitet sich von der Zusammensetzung des Moleküls ab. Jeweils getrennt werden Ethylenoxid und

Propylenoxid polymerisiert und die entstandenen Blöcke werden anschließend zusammengesetzt. Poloxamer ist ein physiologisch sehr gut verträgliches Tensid und besitzt in Deutschland die Zulassung zur intravenösen Applikation (Müller 1991; Fiedler 1996).

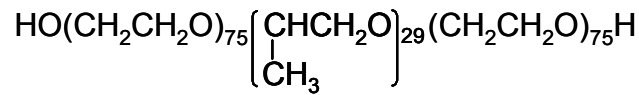


Abbildung 29: Strukturformel von Poloxamer 188

5.2.4.2.2.1 Vergleich der Proteinmuster der beiden Tenside in Humanplasma

5.2.4.2.2.2 Unbeladene PBCA-Partikel

Abbildung 30 stellt die Proteinadsorptionsmuster nebeneinander dar, die durch Inkubation der unbeladenen PBCA-Partikel in Humanplasma detektiert werden konnten. Es finden sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen den beiden Partikelpopulationen.

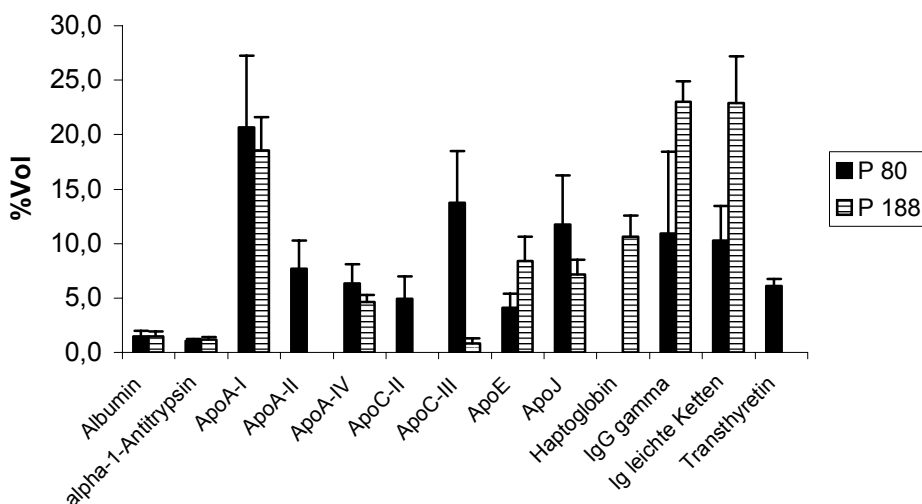


Abbildung 30: Einfluß der Tenside auf das Proteinmuster in Humanplasma auf unbeladenen PBCA-Partikeln

Die Inkubation von Polysorbat 80 führte zu einer verstärkten Anreicherung von Haptoglobin auf den Partikeln, das auf den Gelen, die mit Poloxamer 188 inkubiert waren, nicht detektiert werden konnte. Dafür fand sich dort ein Anteil von 6,1% an Transthyretin und 7,7% ApoA-I sowie 4,9% ApoC-II, die sich wiederum nicht auf den mit Polysorbat 80 inkubierten Partikeln befanden.

Bei all diesen deutlichen Unterschieden, ließen sich aber auch teilweise sehr große Gemeinsamkeiten auf den Pherogrammen feststellen. Der große Anteil von ApoA-I auf beiden Gelen ist hier besonders auffällig. Aber auch andere Lipoproteine zeigten in ihrem Adsorptionsverhalten viele Übereinstimmungen.

So zeigten neben ApoA-I, auch ApoA-IV, ApoE, ApoJ sehr ähnliche prozentuale Anteile am Proteinmuster der beiden Pherogramme.

5.2.4.2.2.3 Beladene PBCA-Partikel

Konnten bei den unbeladenen Partikeln noch größere Unterschiede ausgemacht werden, so muss man bei den beladenen feststellen, dass das Proteinmuster beider Partikelpopulationen weitestgehend identisch ist.

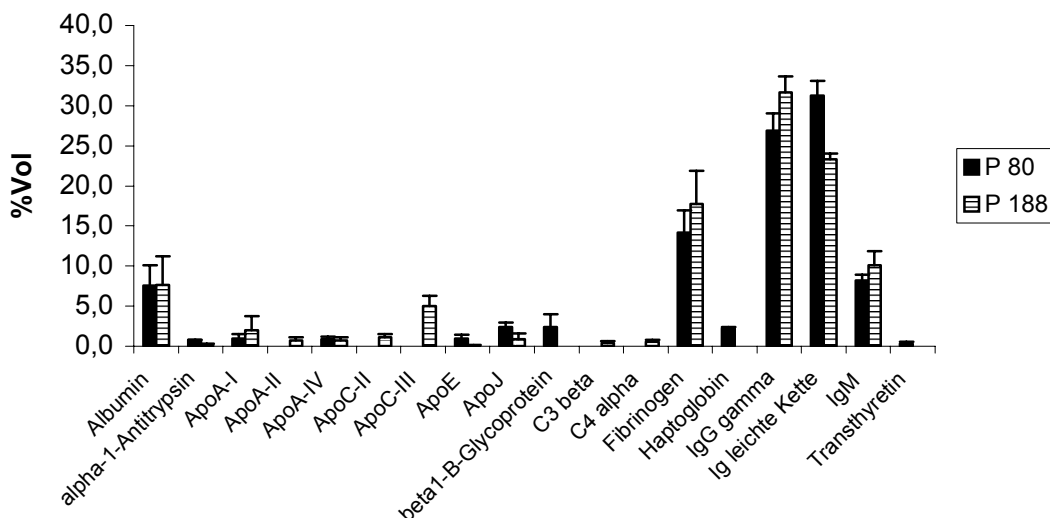


Abbildung 31: Einfluß der Tenside auf das Proteinmuster in Humanplasma auf Dox-beladenen PBCA-Partikeln

Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, zeigen die Proteine, mit einer kleinen Ausnahme bei ApoC-II, ein fast identisches Adsorptionsmuster. Die Mengen der vier adsorbierten Hauptproteine, Albumin, Fibrinogen, IgG γ und IgM sind weitestgehend identisch. Unterschiede gibt es lediglich bei den weniger stark adsorbierten Proteinen, die allerdings, gemessen an der Dominanz der Hauptproteine, keinen *in-vivo*-Effekt haben dürften. Erwähnenswert scheint hier jedoch, dass Poloxamer 188 im Gegensatz zu Polysorbat 80 zu einer Aktivierung des Komplementsystems geführt hat.

5.2.4.2.3 Vergleich der Proteinmuster der beiden Tenside in Rattenplasma

5.2.4.2.3.1 Unbeladene PBCA-Partikel

Wie auch in Humanplasma traten bei den unbeladenen PBCA-Partikeln in Rattenplasma einige Unterschiede auf.

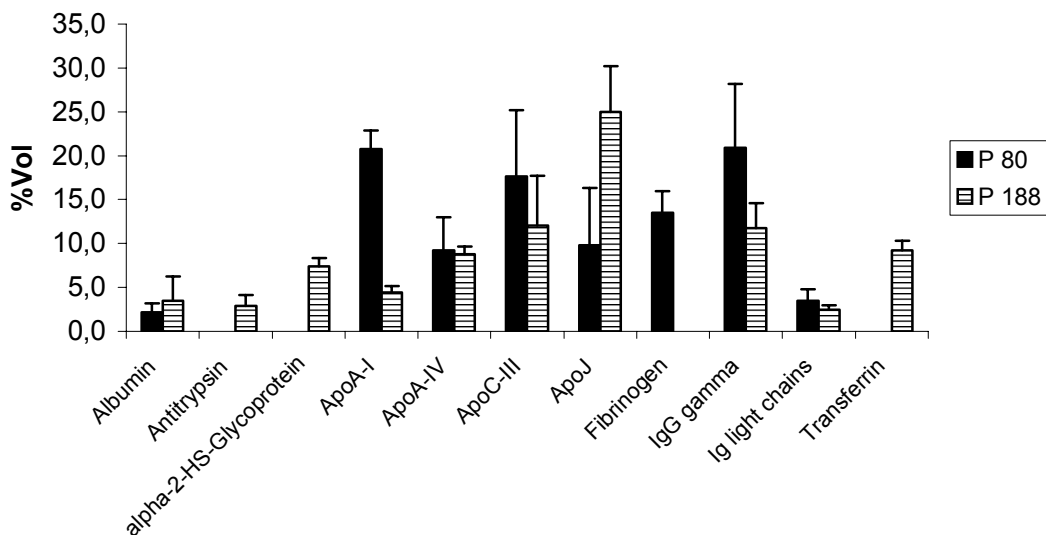


Abbildung 32: Einfluß der Tenside auf das Proteinmuster in Rattenplasma auf unbeladenen PBCA-Partikeln

Die Anwesenheit von Poloxamer 188 auf der Partikeloberfläche führte zur Adsorption von drei Proteinen, die auf den Gelen der Partikel, die mit Polysorbat inkubiert waren,

nicht detektiert werden konnten. Es handelt sich um α -1-Antitrypsin, α -2-HS-Glykoprotein und Transferrin. Dafür fand sich bei Polysorbat 80 eine sehr große Menge an Fibrinogen. Außerdem konnten relativ große Unterschiede bei der Adsorption von ApoA-I und ApoJ festgestellt werden. Weitestgehende Übereinstimmungen fanden sich hingegen bei der Adsorption von Albumin, ApoA-IV, ApoC-III und IgG γ .

5.2.4.2.3.2 Beladene PBCA-Partikel

Für die spätere Korrelation der 2-D-PAGE-Daten mit den Ergebnissen der Tierstudie ist dieser Vergleich sicherlich am wichtigsten!

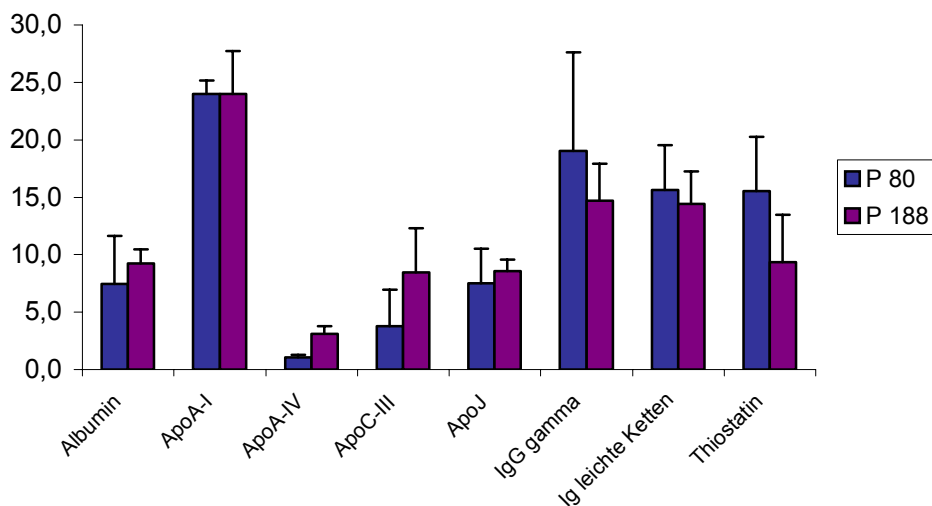


Abbildung 33: Einfluß der Tenside auf das Proteinmuster in Rattenplasma auf Dox-beladenen PBCA-Partikeln

Die Gemeinsamkeiten der erhaltenen Proteinmuster sind deutlich zu erkennen. Auf beiden Gelen befindet sich eine außergewöhnlich hohe, nahezu identische, Menge an ApoA-I und ApoJ und Albumin. Zusätzlich finden sich auf beiden Gelen ApoA-IV und ApoC-III in erwähnenswerten Mengen. Auch die schweren Ketten der Immunglobuline G und M finden sich in nahezu gleicher prozentualer Zusammensetzung. Abweichungen lassen sich nur feststellen im Hinblick auf die

Adsorption von Antitrypsin und Transthyretin. Die Mengen von Thiostatin sind abweichend. Die Bedeutung von Thiostatin für einen *in-vivo*-Effekt darf aber als eher gering eingestuft werden (vgl. Kap. 5.2.4.1.3).

Es kann festgestellt werden, dass sich die Proteinmuster der mit Doxorubicin beladenen PBCA-Partikel, die mit Polysorbat 80 und Poloxamer 188 inkubiert wurden, im Rattenplasma von einigen wenigen Ausnahmen sehr ähnlich sind.

5.2.4.3 Vergleich der Proteinmuster zwischen beladenen und unbeladenen Partikeln.

5.2.4.3.1 Humanplasma

Der Vergleich der Proteinmusters zwischen beladenen und unbeladenen Partikeln in Humanplasma ergab, dass die Anwesenheit von Doxorubicin auf den Partikeloberflächen zu einem in erheblichem Maße verändertem Proteinmuster führte. Sowohl auf den mit Polysorbat 80, wie auch auf den mit Poloxamer 188 inkubierten, mit Doxorubicin beladenen PBCA-Partikeln dominierten Albumin, Fibrinogen und IgG γ und IgM. Auf beiden Gelen betrug der Gesamtanteil über 80% der insgesamt adsorbierten Proteinmenge. Die restlichen 20% verteilten sich auf die Apolipoprotein und die Proteine des Komplementsystems. ApoC-III stellte mit 5% am Gesamtprotein-volumen hier die größte Fraktion.

Die unbeladenen PBCA-Partikel zeigten zwar auch eine hohe Adsorption von IgG γ , allerdings konnten auch sehr große Mengen an Apolipoproteinen, darunter v.a. ApoA-I detektiert werden.

5.2.4.3.2 Rattenplasma

Der Vergleich zwischen unbeladenen und Dox-Partikeln im Rattenplasma zeigte nicht so große Unterschiede im Proteinmuster wie auf den Gelen mit Humanproteinen. Sowohl bei Polysorbat 80 als auch bei Poloxamer 188 dominierten die Apolipoproteine die Pherogramme. Bei den Partikeln, die mit Poloxamer 188 inkubiert wurden, zeigte sich auf den unbeladenen Carriern eine hohe Menge an

ApoJ von 24,9%Vol und eine Menge von 4,4%Vol an ApoA-I. Die Anwesenheit von Doxorubicin schien die Mengen der beiden Proteine genau ins Gegenteil zu verschieben. Hier fanden sich 24%Vol ApoA-I und 8,6%Vol ApoJ.

5.2.5 Ergebnisse der Tierstudie

Für die Tierstudie wurden den Ratten Glioblastomzellen vom Typ 101/8 intrakranial appliziert. Glioblastomen gehören zu den aggressivsten Krebsarten überhaupt. Sie zeichnen sich durch schnelles Wachstum und einer hohen Neigung zu Blutungen aus.

Die Ratten wurden in unterschiedliche Gruppen von jeweils fünf bis acht Tieren unterteilt. Für die Studie wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 200-250 g Körpergewicht eingesetzt. Für die Tumorinjektion wurden die Ratten mit 50 mg/kg Pentobarbital anästhesiert. Nach Tumorinjektion wurden den Ratten an Tag 2, 5 und 8 unterschiedliche Doxorubicin-Formulierungen appliziert. Die Konzentration an Doxorubicin betrug je Injektion 1,5 mg/kg Körpergewicht. Der Arzneistoff wurde den Ratten in die Schwanzvene injiziert (Steiniger, Kreuter et al. 2004). Die unterschiedlichen Formulierungen waren:

Für Polysorbat 80:

Doxorubicin-Lösung

Doxorubicin-Lösung + Polysorbat 80

Doxorubin-PBCA

Doxorubicin-PBCA + Polysorbat 80

Für Poloxamer 188:

Doxorubicin-PBCA_{Dex} + Poloxamer 188¹

Doxorubicin-PBCA + Poloxamer 188²

Doxorubicin-Lösung + Poloxamer 188

¹ Nanopartikel wurden unter Zusatz von Dextran 70.000 synthetisiert

² Nanopartikel wurde nur unter Zusatz von Poloxamer 188 synthetisiert

5.2.5.1 Ergebnisse der Formulierungen mit Polysorbat 80

5.2.5.1.1 Effekt der einzelnen Formulierungen gegen Glioblastom

Die Ergebnisse der Studie mit Polysorbat zeigt Abbildung 34. Die Kontrollgruppe, die nicht mit Doxorubicin therapiert wurde, ist im Diagramm nicht eingezeichnet. Nach 21 Tagen waren 100% der Ratten aus dieser Gruppe verstorben.

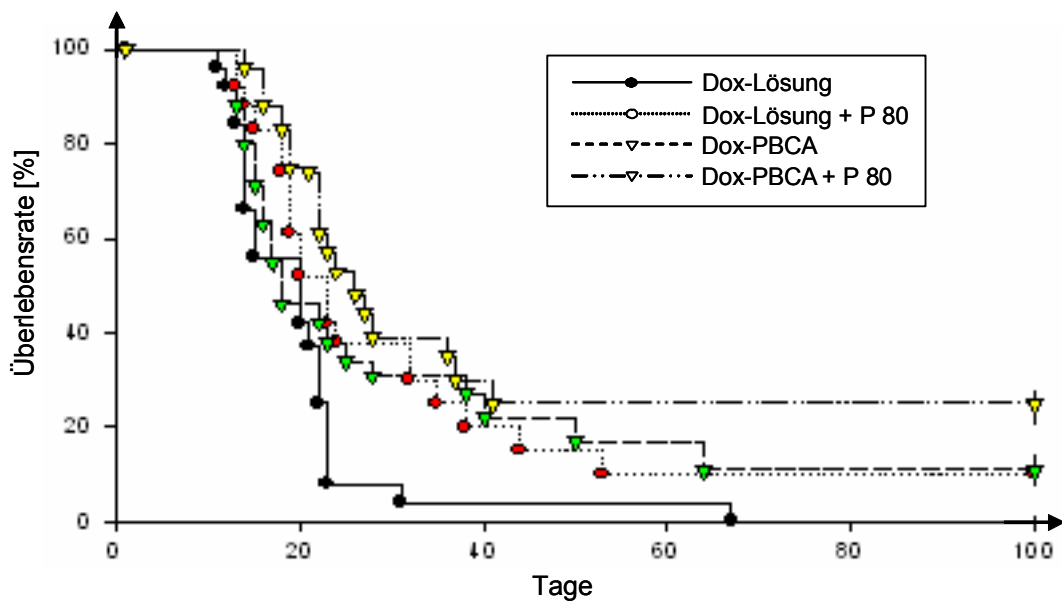


Abbildung 34: Überlebensrate der Ratten als Kaplan-Meier-Kurve nach (Steiniger, Kreuter et al. 2004)

Die Graphik zeigt, dass die Nanopartikelformulierung in Kombination mit Polysorbat 80 gegenüber allen anderen getesteten Formulierungen überlegen war. Hier betrug die Überlebensrate nach 100 Tagen noch 23%. Aus dieser Gruppe waren nach 180 Tagen noch 5% der Tiere am Leben. Interessanterweise zeigte sich aber auch eine Wirksamkeit der Formulierung der reinen Doxorubicin-Nanopartikel sowie der Doxorubicinlösung, der Polysorbat 80 beigemischt wurde. Aus der Gruppe, die mit der Lösung behandelt wurden, waren nach 180 Tagen noch 2% der Tiere am Leben. Die Wirksamkeit der Doxorubicinlösung kann mit der hemmenden Wirkung von Polysorbat 80 auf das P-Glykoprotein erklärt werden.

5.2.5.1.2 Organverteilung der einzelnen Formulierungen

Zusätzlich wurden für die einzelnen Formulierungen Organverteilungsstudien durchgeführt. Hierzu wurden 6 Gruppen zu jeweils fünf Ratten gebildet und die Organverteilung in Leber, Lunge, Milz und Niere nach 10 min, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden bestimmt. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der Studie.

Tabelle 19: Doxorubicinkonzentrationen in Leber, Milz, Lunge und Nieren nach i.v.-Gabe in Ratten (n=5) nach (Gulyaev and G.Ya. & Kreuter 1999)

Detektierte Menge [$\mu\text{g/g}$]						
Zubereitung	10 min	1h	2h	4h	6h	10h
Leber						
Dox-Lösung	4,2 \pm 0,64	12,40 \pm 0,82	12,60 \pm 0,82	5,7 \pm 0,33	3,10 \pm 0,4	2,05 \pm 0,06
Dox-Lösung + P80	10,20 \pm 1,70	14,70 \pm 1,30	10,50 \pm 1,20	4,50 \pm 0,60	2,70 \pm 0,43	1,71 \pm 0,14
Dox-PBCA	6,80 \pm 0,75	18,20 \pm 0,90	15,80 \pm 1,20	10,20 \pm 0,70	6,50 \pm 0,53	4,80 \pm 0,50
Dox-PBCA + P80	5,10 \pm 0,42	19,50 \pm 1,10	10,60 \pm 1,30	8,60 \pm 0,96	6,20 \pm 0,47	4,00 \pm 0,21
Milz						
Dox-Lösung	3,60 \pm 0,50	10,50 \pm 1,30	6,80 \pm 0,57	4,20 \pm 0,40	2,10 \pm 0,13	1,40 \pm 0,08
Dox-Lösung + P80	6,80 \pm 0,01	11,60 \pm 0,80	8,40 \pm 0,22	2,80 \pm 0,13	1,68 \pm 0,11	0,56 \pm 0,10
Dox-PBCA	8,00 \pm 0,57	20,20 \pm 1,70	26,50 \pm 1,45	18,90 \pm 1,60	18,50 \pm 1,80	10,40 \pm 1,40
Dox-PBCA + P80	7,40 \pm 0,61	18,00 \pm 1,38	20,50 \pm 1,70	16,10 \pm 1,30	14,90 \pm 1,50	8,20 \pm 0,96
Lunge						
Dox-Lösung	19,40 \pm 2,20	30,10 \pm 2,70	25,30 \pm 1,73	14,30 \pm 1,11	9,70 \pm 1,30	3,57 \pm 0,70
Dox-Lösung + P80	12,50 \pm 0,14	27,50 \pm 3,20	20,60 \pm 1,20	15,30 \pm 1,60	10,20 \pm 1,40	3,40 \pm 0,50
Dox-PBCA	8,60 \pm 0,25	29,50 \pm 1,42	42,80 \pm 3,20	30,60 \pm 4,40	24,20 \pm 1,50	16,70 \pm 1,80
Dox-PBCA + P80	5,10 \pm 0,90	19,70 \pm 2,10	37,20 \pm 4,23	34,50 \pm 3,30	20,60 \pm 1,75	13,40 \pm 1,40
Nieren						
Dox-Lösung	16,40 \pm 1,70	40,70 \pm 3,60	42,10 \pm 4,27	20,70 \pm 2,50	16,70 \pm 2,10	8,60 \pm 0,62
Dox-Lösung + P80	23,80 \pm 2,46	32,90 \pm 3,40	40,50 \pm 2,75	26,80 \pm 3,00	20,20 \pm 1,67	10,10 \pm 1,30
Dox-PBCA	8,40 \pm 0,70	36,50 \pm 4,30	28,30 \pm 2,20	26,50 \pm 1,90	22,70 \pm 2,40	18,50 \pm 1,40
Dox-PBCA + P80	12,70 \pm 1,56	32,40 \pm 2,91	36,50 \pm 3,70	24,10 \pm 1,65	20,50 \pm 2,10	16,70 \pm 1,53

Aus Tabelle 19 geht hervor, dass die höchsten Konzentrationen von Doxorubicin nach 60 - 120 min in den Nieren und Lungen der Tiere nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise galt dies auch für die Nanopartikelformulierungen. Hier hätte man eine höhere Kumulation von Doxorubicin in den Organen des RES erwarten können. Insbesondere in der Leber, deren Kupffer-Zellen ca. 90% der Elimination von körperfremden Partikeln übernehmen (O'Mullane, Artursson et al. 1987) zeigt sich, teilweise sogar gegenüber der Dox-Lösung (nach 2h), eine niedrigere Konzentration an Arzneistoff.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer Studie, die von Brigger et al. durchgeführt wurde (Brigger, Morizet et al. 2004). Brigger untersuchte damals mit PEG gecoatete Poly(hexadecylcyanoacrylat)-NP, die ebenfalls mit Doxorubicin beladen waren.

Hier könnte einerseits der dysopsonisierende Effekt des Albumin zum tragen kommen, zum anderen bewirkt die starke Präsenz von ApoA-I auf der Partikeloberfläche, dass der Partikel vor den Lebermakrophagen geschützt wird. Dieser Effekt wurde bereits von Bisgaier beschrieben (Bisgaier, Siebenkas et al. 1989), der einen verminderte Aufnahme von Liposomen, auf denen ApoA-I und ApoA-IV gebunden waren, nachweisen konnte.

Weiterhin interessant ist eine genauere Betrachtung der beiden Formulierungen der Nanopartikel. Offensichtlich fanden sich in allen Organen, von wenigen Ausnahmen (z.B. Niere, 2h) abgesehen, niedrigere Werte von Doxorubicin der Partikel, die mit Polysorbat 80 gecoatet waren als die der reinen Formulierung. Hier wirkt sich anscheinend auch die Anwesenheit von Polysorbat 80 aus.

Aufgrund der geringen Menge der damals gelieferten Proben, liegen leider keine Daten der reinen Doxorubicin-NP in Rattenplasma vor. Eine Klärung ist hier noch dringend erforderlich.

Außerdem wurde die Aufnahme von Doxorubicin im Gehirn und im Herz der Ratten bestimmt. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen des Gehirns, Abbildung 36 diejenigen der Untersuchungen der Herzen. Da Doxorubicin

erwiesenermaßen sehr stark kardiotoxisch ist (Forth, Henschler et al. 1996), ist diese zusätzliche Untersuchung sehr sinnvoll.

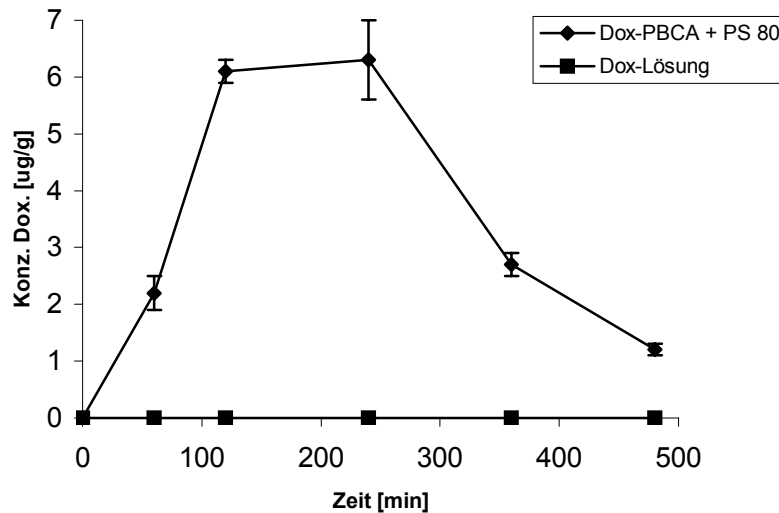


Abbildung 35: Konzentrationen an Dox im Gehirn (n=8) nach (Gulyaev and G.Ya. & Kreuter 1999)

Die Ergebnisse dieser Studie sind sehr positiv zu bewerten. Gegenüber allen anderen Formulierungen konnten lediglich die mit Polysorbat gecoateten Partikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Gemessen an der Konzentration, die nach 2 und 4 Stunden in der Leber gemessen wurde, ist das ein sehr hoher Wert.

Auch die Untersuchungen bezüglich der Kardiotoxizität hatten auch sehr positive Ergebnisse. Die Doxorubicinkonzentration in den Herzen war bei beiden NP-Formulierungen nicht nachweisbar. Hier zeigt sich ein deutlicher Vorteil gegenüber den Dox-Lösungen.

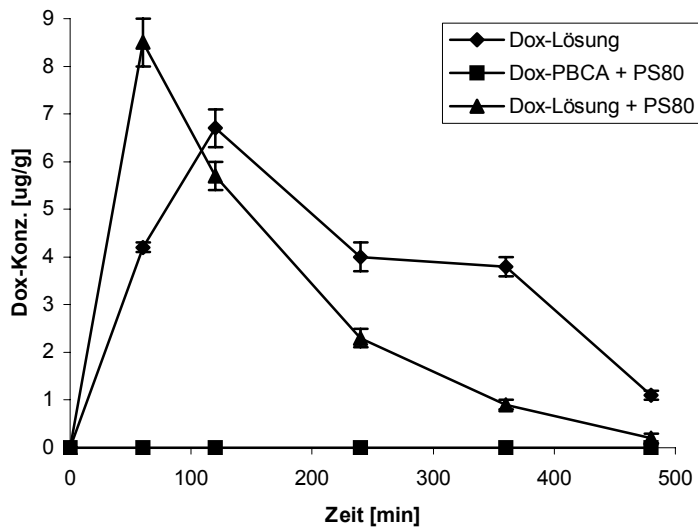


Abbildung 36: Konzentrationen an Dox im Herz (n=8) nach (Gulyaev and G.Ya. & Kreuter 1999)

5.2.5.2 Ergebnisse der Formulierungen mit Poloxamer 188

5.2.5.2.1 Effekt der einzelnen Formulierungen gegen Glioblastom

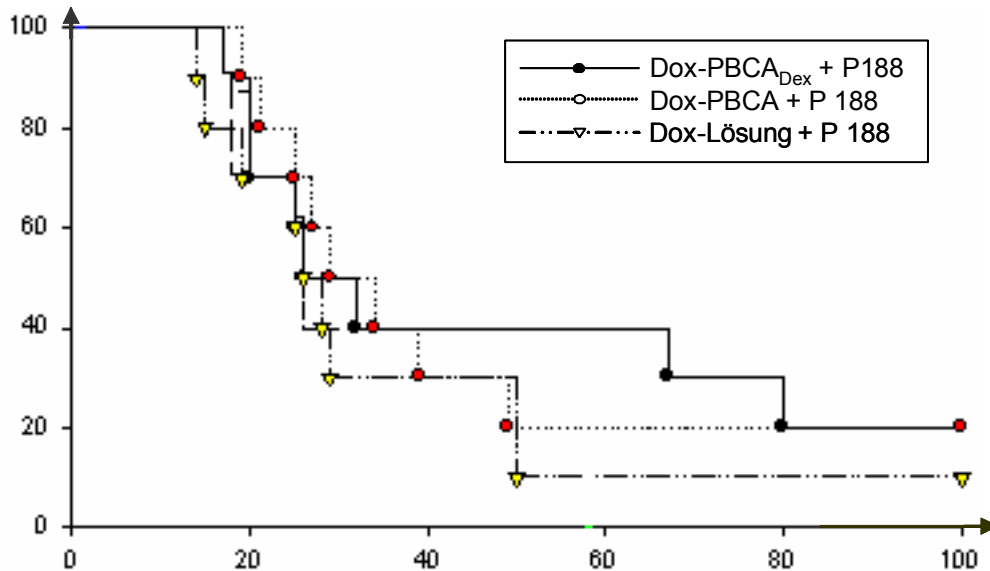


Abbildung 37: Überlebensrate der Ratten als Kaplan-Meier-Kurve nach (Steiniger, Kreuter et al. 2004)

Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der in-vivo-Studie, die mit Dox-PBCA mit Poloxamer 188 durchgeführt wurde. Die Resultate sind mit der in-vivo-Studie, die mit Polysorbat 80 durchgeführt wurden, nahezu identisch. Auch hier lag die Überlebensrate der Tiere, die mit Tensid gecoateten Nanopartikeln behandelt wurden bei ca. 20% nach 100 Tagen. Interessant ist hier aber auch, dass die Überlebensrate der Tiere, die mit der Dox-Lösung, der 1% Tensid beigemischt war, ebenfalls bei ca. 10% lag. Dies ist vergleichbar mit dem Resultat der Polysorbat-Studie. Allerdings ist Poloxamer 188 kein Hemmstoff des Pgp. Verantwortlich für die teilweise Wirksamkeit der Lösung sind vermutlich kleine Risse in der Blut-Hirn-Schranke, die durch den Tumor verursacht werden. Durch diese undichten Stellen kann Doxorubicin in das Gehirn gelangen (Brigger, Morizet et al. 2004). Leider liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine Daten über die Organverteilung von Dox-PBCA-Partikeln, die mit Poloxamer gecoatet wurden vor, sodass hier noch keine Korrelation zwischen Proteinmuster und in-vivo-Verteilung getroffen werden kann.

5.3 Diskussion

5.3.1 Allgemeine Betrachtung

Die Ergebnisse dieser Plasmaproteinadsorptionsstudie haben eine Reihe neuer Erkenntnisse gebracht, aber es sind auch neue Fragen entstanden. Wie in Kapitel 5.2.4.1. gezeigt, ist es nicht ohne weiteres möglich, die Proteinadsorption der Species Ratte auf die Proteinadsorption des Menschen zu übertragen. Die Proteinadsorptionsmuster, v.a. der mit Doxorubicin beladenen PBCA-Partikel, unterschieden sich ganz erheblich. Diese Feststellung könnte zu erheblichen Komplikationen führen, da das „Konzept der differentiellen Adsorption“ die Plasmaproteinadsorption als entscheidenden Schlüsselschritt beinhaltet (Blunk 1994). Darüber hinaus war die Affinität der Apolipoproteine der Species Ratte an die Partikeloberfläche meist deutlich niedriger als die der menschlichen Lipoproteine

Es darf als sicher angesehen werden, dass die Plasmaproteine für den Transport des Arzneistoffes über die Blut-Hirn-Schranke einen, wenn nicht, den entscheidenden Schritt darstellen (Lück 1997; Kreuter 2001; Kreuter, Shamenkov et al. 2002; Kreuter 2002a). Eine erhebliche Veränderung des Proteinmusters beim Übergang auf eine andere Species würde zur Folge haben, dass eine im Tierversuch wirksame Arzneiform in der klinischen Anwendung völlig unwirksam sein könnte. Dies könnte nur dadurch verifiziert werden, wenn ein Präparat, das Nanopartikel enthält, eine Zulassung zur klinischen Phase I erhalten würde. Bereits Gessner wies auf die beträchtlichen Unterschiede im Proteinadsorptionsmuster gleicher Partikel hin, die in Human- und Mäuseserum inkubiert wurden (Gessner 2001). Es darf bezweifelt werden, dass die Art und Weise, wie der Arzneistoff die BBB passiert, bei beiden Species unterschiedlicher Natur ist. Bislang gibt es über den Mechanismus der Arzneistoffaufnahme an der BBB aus dem Nanopartikel viele Theorien aber noch keinen endgültigen Beweis für eine der diskutierten Möglichkeiten.

Es muss darüber hinaus bei weiteren Studien berücksichtigt werden, dass die Affinität, bzw. die Adsorptionskinetik der Proteine des Ratten- und Humanplasmas sehr unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Zur weiteren Klärung des

Mechanismus sollte in die Untersuchungen neben Humanplasma auch immer Rattenplasma einbezogen werden. Die dazu nötigen Vergleichskarten stehen zur Verfügung (Haynes, Miller et al. 1998; Miller, Haynes et al. 1998; Miller, Haynes et al. 1999)

Ein zweiter Aspekt, der durch die Studie aufgezeigt werden konnte ist die Deckungsgleichheit der Proteinmuster von Polysorbat 80 und Poloxamer 188. Obwohl beide Emulgatoren aus unterschiedlichen Emulgatorfamilien kommen, führen sie, adsorbiert auf den PBCA-Partikeln zu nahezu identischen Proteinmustern. Allerdings ist die Menge an Gesamtprotein bei Poloxamer 188 deutlich höher. Dies könnte mit den unterschiedlichen Dicken der adsorbierten Schichten zu tun haben. Das Coating-Layer von Poloxamer 188 beträgt 77 Å, der von Polysorbat 80 lediglich 22 Å (Müller 1991).

Die Ähnlichkeiten im Proteinmuster der Partikel, die mit Polysorbat 80 und Poloxamer 188 inkubiert waren, sowie die Ähnlichkeiten in der Wirksamkeit der beiden Nanopartikelformulierungen können als weiteres Indiz für die große Bedeutung der Plasmaproteine zur Überwindung der BBB gewertet werden.

Basierend auf der Studie, die von Lück durchgeführt wurde, lag das Hauptaugenmerk auf Apolipoprotein E (Lück 1997). Die Relevanz von ApoE für das Gehirntargeting konnte in zahlreichen Studien zweifelsfrei belegt werden (Müller, Lück et al. 1997; Kreuter, Shamenkov et al. 2002; Kreuter 2002a). In der hier vorgliegenden Studie konnte auch ein signifikanter Transport von Doxorubicin über die BBB nachgewiesen werden. Allerdings fanden sich auf den untersuchten relevanten Gelen der beladenen PBCA-Partikeln in Rattenplasma keine Spuren von ApoE. Eine Wirkung, einzig durch die Hemmung des Pgp kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Partikel, die mit Poloxamer 188 gecoatet waren die gleiche Wirksamkeit aufwiesen wie die, die mit Polysorbat 80 überzogen waren. Poloxamer 188 bewirkt, im Gegensatz zu Polysorbat 80, keine Hemmung des Pgp.

Demnach müssen also noch andere Plasmaproteine, die auf Partikeln adsorbiert sind, in der Lage sein, mit den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke in

Wechselwirkung zu treten und dadurch einen Übertritt über des Arzneistoffes über die Blut-Hirn-Schranke zu ermöglichen.

Die Frage, die sich nun stellt, ist:

Welche weiteren Proteine sind ausreichend auf den Gelen vorhanden und sind in der Lage mit Rezeptoren an der Blut-Hirn-Schranke in Wechselwirkung zu treten?

Betrachtet man die Adsorptionsmuster der beiden mit Doxorubicin beladenen Nanopartikel, die mit den unterschiedlichen Tensiden und in Rattenplasma inkubiert wurden, so kommen mengenmäßig Albumin, ApoA-I, ApoJ und IgG γ in Frage. Albumin und IgG γ können hier wohl ausgeschlossen werden. Die Aufnahme von Albumin und IgG γ über die BBB erfolgt höchstwahrscheinlich durch passive Diffusion (Poduslo, Curran et al. 1994; Poduslo, Curran et al. 1999). Dass diese beiden Proteine also die Aufnahme eines Nanopartikels in die Endothelzellen vermitteln, ist sehr unwahrscheinlich, da es natürlich aktiver Carrierproteine für die Aufnahme der Nanopartikel in das Gehirnendothel bedarf. Somit rücken also die beiden übrigen Lipoproteine ApoA-I und ApoJ in den Fokus als Vermittler eines Übertritts von Doxorubicin über die BBB.

5.3.2 ApoA-I und ApoJ als mögliche Vermittler eines Gehirntargetings

5.3.2.1 ApoA-I

Wie bereits beschrieben, fand sich auf den Pherogrammen der mit Doxorubicin beladenen Partikeln eine bemerkenswert hohe Menge an ApoA-I. ApoA-I gehört zur Gruppe der „high-density lipoproteine“ (HDL) und kommt im Blut in einer Konzentration von ca. 1,27 g/l bei Männern und 1,46 g/l bei Frauen vor (Haeberli 1992-1995). Es ist somit das HDL, welches im Plasma in der höchsten Konzentration vorliegt. Es liegt in monomerer Form als einzelne Polypeptidkette aus 243 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 28.000 Da vor. Es wird hauptsächlich

in der Leber synthetisiert. Die Hauptfunktion von ApoA-I kann darin gesehen werden, überschüssiges Cholesterin und Lecithin an sich zu binden. Dies geschieht mit Hilfe der Lecithin-Cholesterin Acetyltransferase, die wiederum durch ApoA-I aktiviert wird (Scanu, Byrne et al. 1982; Putnam 1987). Das gebundene Cholesterin wird dann als Ester zu den Zellen transportiert. Die Rolle von ApoA-I im Fettstoffwechsel kann nicht unterschätzt werden. Ein Synthesedefekt von ApoA-I zeigt sich in der sogenannten „Tangier-Krankheit“. Die Tangier-Krankheit führt zu einem Mangel an ApoA-I, zu Hypocholesterinämie und Cholesterinablagerungen in verschiedenen Organen, besonders im Monozyten-Makrophagen-System. Patienten mit dieser Krankheit leiden unter anderem an Polyneuropathien, Muskelatrophie und besitzen eine deutlich geringere Lebenserwartung (Hildebrandt 1994). In neueren Studien zeigte sich auch, dass ApoA-I die Agglomeration von Amyloid β hemmen kann. Somit scheint es auch beim der Entstehung und dem Verlauf der Alzheimer-Erkrankung eine Rolle zu spielen (Koldamova, Lefterov et al. 2001)

5.3.2.2 Scavenger-Rezeptor

Als HDL ist ApoA-I ein Ligand des sogenannten Scavenger-Rezeptors der Klasse B, Typ I (SR-BI). SR-BI ragt in Form einer „Schleife“, die aus ca. 403 Aminosäuren besteht und in der Zellwand verankert ist in die Gefäße. Das mit Cholesterin angereicherte ApoA-I, welches die Zelle passiert, kann dann aus dem Plasma „herausgefischt“ und an die Zelle gebunden werden (Kozarsky, Donahee et al. 1997; Krieger 1999). Um nun die Zelle mit Cholesterin zu versorgen, wird nicht etwa der gesamte Lipidpartikel in die Zelle endozytiert, sondern nur der Cholesterylester aufgenommen. Der Ester wird intrazellulär gespalten und die Zelle wird mit Cholesterin versorgt. Zusätzlich fungiert der SR-BI auch als Effluxsystem, welches in der Lage ist überflüssiges Cholesterin aus der Zelle heraus zu pumpen. Das Cholesterin wird dann wieder auf das Cholesterin-arme ApoA-I gebunden und zu anderen Zellen transportiert. SR-BI wird auf einer Reihe von Geweben exprimiert. So finden sich beispielsweise viele dieser Rezeptoren in der Leber, den Ovarien, Testes aber auch an der Blut-Hirn-Schranke (Panzenboeck, Balazs et al. 2002; Balazs, Panzenboeck et al. 2004).

Durch Andocken der mit ApoA-I beladenen Doxorubicin-Partikel mit entsprechender Verweilzeit am Rezeptor, könnte hier bei allmählicher Freigabe des Doxorubicins eine Aufnahme des Arzneistoffes über die Blut-Hirn-Schranke erfolgen. Da der gesamte Partikel hier nicht in die Zelle aufgenommen wird, erfolgt dies aufgrund des sich ausbildenden Konzentrationsgradienten vor und hinter den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke.

5.3.2.3 ApoJ

ApoJ (auch Clusterin genannt) ist ein heterodimeres Protein, das sich aus 449 Aminosäuren zusammensetzt. Es besteht aus einer α - und β -Einheit und hat ein Molekulargewicht von 80 kDa (Haeberli 1992-1995; Calero, Tokuda et al. 1999). ApoJ wird sich in den unterschiedlichsten Geweben des Körpers gespeichert, wie z.B. Gehirn, Ovarien, Leber, Testes. Eine hohe Expression konnte im ZNS festgestellt werden. Im Plasma liegt es entweder gebunden an HDL oder an Thrombozyten vor. Obwohl die Genstruktur und die Aminosäuresequenz sich deutlich von denen der übrigen Lipoproteine unterscheiden, wird es trotzdem zu ihnen gerechnet, da einige Merkmale des Clusterins mit denen der Apolipoproteine übereinstimmen: Es liegt gebunden an Fetten vor, wird in der Leber gebildet und ist der Ligand eines LDL-Rezeptors, dem Glycoprotein 330 (Megalin). Im Vergleich zu den Funktionen der anderen Apolipoproteine ist über ApoJ bisher weniger bekannt. Ursprünglich nahm man an, dass es vorwiegend dazu da war, um Zellen miteinander zu verkleben (engl. Cluster = Haufen). Außerdem wird es auch mit dem programmierten Zelltod (Apoptose) in Verbindung gebracht. Hohe ApoJ-Konzentrationen fanden sich bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Hirntumoren und der Alzheimer Erkrankung (Lidstrom, Bogdanovic et al. 1998; Lidstrom, Hesse et al. 2001). Außerdem ist es in der Lage mit dem Amyloid β , welches die charakteristischen Alzheimer-Plaques bildet, in einem stabilen Komplex zu binden und, vermittelt durch Megalin, dies über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren.

5.3.2.4 Megalin-Rezeptor

Der Megalin-Rezeptor kommt in vielen Geweben vor, an denen Rezeptor-vermittelte Endocytose stattfindet. Der ursprüngliche Name dieses Rezeptors war Glykoprotein 330. Aufgrund seiner bemerkenswerten Größe von 517.715 Da wurde der Namen Megalin gewählt. Er wird besonders exprimiert im proximalen Tubulus der Niere, in der Lunge und im Innenohr sowie an den Epithzellen der Blut-Hirn-Schranke (Farquhar 1995). Megalin gehört zur Familie der LDL-Rezeptoren. Ein Ligand des Megalins ist, unter anderem, das Clusterin, das beispielsweise im

Komplex mit Amyloid β endozytotisch über die BBB ins Gehirn transportiert wird (Kounnas, Loukinova et al. 1995; Zlokovic, Martel et al. 1996; Calero, Tokuda et al. 1999). Außerdem ist Megalin ein Rezeptor für einige mehrbasische Arzneistoffe, wie Aminoglykoside und Polymyxin B (Moestrup, Cui et al. 1995).

Megalin könnte die Endozytose des vollständigen Partikels über eine Reaktion mit Clusterin in die Endothelzelle ermöglichen. In der Zelle erfolgt durch Änderung des pH-Milieus und durch Enzyme der Abbau des Partikels. Der dadurch frei werdende Arzneistoff könnte durch passive Diffusion in das Gehirn gelangen.

5.4 Fazit

Nach den Ergebnissen der durchgeführten Studie muss die Theorie bezüglich ApoE, die 1997 von Lück entwickelt wurde, um mindestens ein, wenn nicht zwei weitere Plasmaproteine erweitert werden. Da man auf den relevanten Pherogrammen kein ApoE nachweisen konnte, muss ein anderes Medium für den Übertritt ins ZNS verantwortlich sein. Die erhaltenen Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass hier dem Plasmaprotein ApoA-I eine entscheidende Bedeutung zukommt, aber womöglich auch dem Clusterin. Bereits Gessner wies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Adsorption auf LDC-Partikeln und erhöhter ZNS-Gängigkeit hin, brachte diesen aber lediglich mit einem protektiven Effekt des ApoA-I in der Leber in Zusammenhang (Gessner, Olbrich et al. 2001). Die Theorie, dass ApoA-I die Aufnahme von Arzneistoff in das Gehirn vermittelt, ist auch deshalb wahrscheinlicher, weil hier der in diesem Zusammenhang wichtige Scavenger-Rezeptor keine Endozytose vermittelt. Es müsste also nicht, wie bei ApoE und Clusterin, der gesamte Partikel endozytiert werden, um dann einen Arzneistofftransport zu gewährleisten, sondern der Nanopartikel wird vor der Zelle „geparkt“ und gibt dort seinen Arzneistoff frei. Durch den sich dann ausbildenden Konzentrationsgradienten zwischen Lumen und Ablumen würde der Arzneistoff durch die Endothelzelle diffundieren.

Über diesen neuen Denkansatz hinaus, brachte die Studie eine Reihe weiterer Erkenntnisse. Da beide Tenside gleichwertige Wirksamkeit gegen Glioblastom aufwiesen, kann auch die Hemmung des Pgp durch Polysorbat 80 als entscheidender Mechanismus für den Übertritt ins Gehirn ausgeschlossen werden.

Außerdem zeigte sich, dass die hier durchgeführten Tierstudien in ihrer Wirksamkeit nicht auf den Menschen übertragbar sein dürften. Die Proteinmuster beider Spezies sind zu unterschiedlich, um sie miteinander vergleichen zu können. ApoA-I war auf den Gelen mit Humanplasma in nicht erwähnenswerter Menge vorhanden. Sollte sich ApoA-I tatsächlich als Vermittler für ein Gehirntargeting herausstellen, müssen für eine Anreicherung von ApoA-I auf Nanopartikeln neue Formulierungen gefunden werden.