

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Plasmaproteinadsorption auf festen Lipidnanopartikeln (SLN)

5.1.1 Methodische Aspekte der 2-DE mit SLN

5.1.1.1 Partikelseparation

Die zu untersuchenden Arzneistoffträger wurden in einer Proteinlösung inkubiert, aus der heraus die Proteine auf den Partikeln adsorbieren. Deshalb ist die Grundvoraussetzung für die Analyse der Proteinadsorptionsmuster die Verfügbarkeit einer Methode zur Abtrennung des überschüssigen Plasmas von den Partikeln nach erfolgter Inkubation. Dabei muss einerseits gewährleistet sein, dass durch das Separationsverfahren keine ursprünglich adsorbierten Proteine abgeschert werden und andererseits dass das freie Plasma auch wirklich vollständig entfernt wird. Die für diesen Zweck als Standardmethode entwickelte Zentrifugation (Blunk et al., 1993, Harnisch und Müller, 1998) konnte bei den meisten SLN-Formulierungen nicht angewendet werden, da die Dichten der verwendeten Lipide oft im Bereich des Wassers lagen. Eine Trennung vom Inkubations- bzw. Waschmedium war deshalb auf diese Weise nicht möglich oder verlief nur unzureichend. Weyhers und Lück versuchten das Problem mit Hilfe einer Dichtezentrifugation zu lösen (Weyhers, 1995). Hierzu wurde die Dichte des Humanplasmas durch Zugabe von 10% (m/m) Glucose erhöht. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass die Glucose als osmotisch wirksame Substanz einen Einfluss auf die Hydratisierung der Plasmaproteine haben kann. Mögliche Konformationsänderungen der Proteine mit verändertem Adsorptionsverhalten wären unerwünschte Folgen. Tatsächlich wurden für die untersuchten oberflächenmodifizierten SLN eine außerordentlich geringe Interaktion mit Plasmaproteinen festgestellt, was sich als nicht ganz schlüssiges Ergebnis darstellte (Weyhers, 1995). In der folgenden Studie wurde deshalb, basierend auf dem Protokoll von Diederichs (1996) zur Abtrennung von Liposomen mittels Gelfiltration, ein Separationsverfahren für SLN entwickelt.

5.1.1.1.1 Gelfiltration als Alternativmethode zur Separation von SLN

Um zu überprüfen, ob die Gelfiltration eine im Vergleich zur Zentrifugation gleichwertige Methode zur Probenaufbereitung von SLN ist, musste zunächst ein festes Lipid gefunden werden, mit dem auch eine Separation nach der Standardmethode möglich war, um die dann resultierenden 2-DE-Gele vergleichen zu können. Mit den meisten festen Lipiden, die zur Herstellung von SLN verwendet werden, wie z. B. Triglyceride (z. B. Dynasane), Partialglyceride (z. B. Compritol, Witepsol) oder Fettsäuren (z. B. Stearinsäure), war dies nicht möglich. Zu beachten war außerdem, dass die Dichte von vielen SLN im Vergleich zur Bulkware des Lipids durch optimierte Packungsdichte erhöht ist (Jenning et al., 2000). Trotzdem war die Dichte von Cetylpalmitat gering genug (0,816-0,819 g/cm³), so dass sich Cetylpalmitat-SLN mittels Zentrifugation problemlos vom Plasma bzw. Waschmedium abtrennen ließen. Entsprechend den O/W-Emulsionen ergab sich nach 1 h Zentrifugation bei 22.940 g eine scharf abgegrenzte „Lipid-Schicht“ als Überstand mit einem klaren Unterstand aus Plasma (Göppert und Müller, 2004a). Das weitere Vorgehen entsprach dann dem Protokoll zur Probenaufbereitung von O/W-Emulsionen (Harnisch und Müller, 1998) (vgl. Kapitel 4.2.1.1.2.1 Zentrifugation). Zusätzlich erfolgte die Abtrennung der Cetylpalmitat-SLN vom Inkubationsmedium mittels Gelfiltration. Die Mischung wurde vorsichtig auf das Gelbett (10 ml Sepharose 2B) aufgebracht und bei einer Flussrate von 18 ml/h nach der Größe der Partikel bzw. Moleküle in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Die SLN konnten dabei aufgrund ihrer Größe von ca. 200 nm nicht in die Poren der Gelmatrix eindringen und wurden im Gegensatz zu den freien Plasmaproteinen rasch durch die Säule gespült. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 1 ml aufgefangen und anschließend photometrisch vermessen, um den Anteil von Partikel bzw. Plasma in den einzelnen Fraktionen berechnen zu können. Dafür musste die UV-Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen erfolgen, was die Anwendung des folgenden Gleichungssystems ermöglichte (Thode und Müller, 1997):

$$(1) \quad A_x = [\text{SLN}] \times AC_{\text{SLN}, x} + [\text{CP}] \times AC_{\text{CP}, x}$$

$$(2) \quad A_y = [\text{SLN}] \times AC_{\text{SLN}, y} + [\text{CP}] \times AC_{\text{CP}, y}$$

Dabei ist A die gemessene Absorption bei der Wellenlänge x bzw. y und AC der spezifische Absorptionskoeffizient der Partikel (AC_{SLN}) bzw. von Plasma (AC_{CP}) bei

der Wellenlänge x bzw. y . Man erhält zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten (Partikel- [SLN] und Plasmakonzentration [CP]) und kann folglich die Konzentrationen der einzelnen Komponenten in den jeweiligen Fraktionen berechnen.

Um die geeigneten Wellenlängen für die UV-Messung festzulegen, wurde ein UV-Absorptionsspektrum von verschiedenen SLN-Dispersionen und verdünntem Humanplasma aufgenommen (Abb. 5.1-1). Dabei zeigte sich, dass SLN das typische

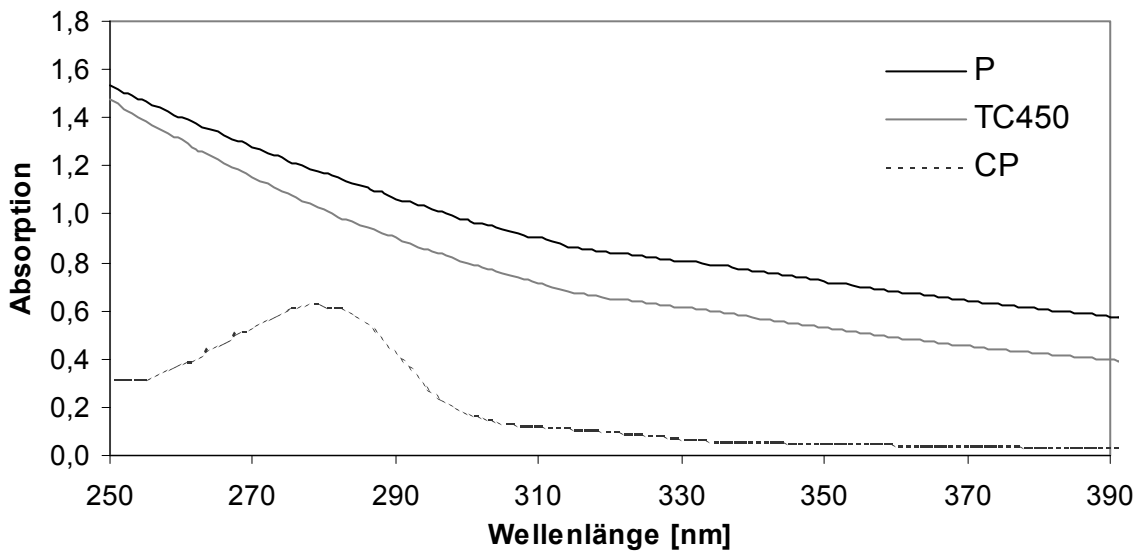


Abb. 5.1-1: Absorptionsspektren von Poloxamer 188- (P) bzw. Tego Care 450-stabilisierten Cetylpalmitat-SLN (TC450)) und von Citrat-stabilisiertem Humanplasma (CP).

Absorptionsspektrum von Partikeldispersionen besitzen, mit stetig zunehmender Absorption bei abnehmender Wellenlänge. In früheren Studien wurden zur Bestimmung der Konzentrationen von Nanopartikeln die Wellenlängen 400 nm bzw. 350 nm verwendet (Müller, 1997). Unter Berücksichtigung der sehr niedrigen Partikelkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen, wurde die UV-Messung aufgrund des höheren Absorptionskoeffizienten bei 350 nm durchgeführt. Plasma besitzt ein Absorptionsmaximum bei 279 nm, weshalb dies als zweite Wellenlänge verwendet wurde.

Exemplarisch für die auf diese Weise untersuchten SLN-Dispersionen sind im folgenden die Auftrennungsprofile von Poloxamer 188- (P188-SLN) und Tego Care 450-stabilisierten SLN (TC450-SLN) dargestellt. Tab. 5.1-1 zeigt die Zusammensetzung, die Größencharakteristik und die Oberflächenladung der ausgewählten Formulierungen. Dabei repräsentierten die P188-SLN mit einem mittleren Durchmesser von ca. 230 nm den Größenbereich, der in dieser Arbeit am

häufigsten untersucht wurde. Die zweite Formulierung wurde ausgewählt, weil durch den viel geringeren mittleren Teilchendurchmesser eine schwierigere Abtrennung vom Plasma zu erwarten war.

Tab. 5.1-1: Zusammensetzung, Größencharakteristik (LD und PCS) und Oberflächenladung (ZP) von P188-SLN und TC450-SLN

	P188-SLN	TC450-SLN
	Cetylpalmitat 10% Poloxamer 188 1,2% Aqua purif. ad 100%	Cetylpalmitat 5% Tego Care 450 1% Aqua purif. ad 100%
D50% [μm]	0,245	0,105
D90% [μm]	0,415	0,182
D95% [μm]	0,459	0,207
D99% [μm]	0,539	0,251
PCS [nm]	230 \pm 5	159 \pm 3
PI	0,122	0,105
ZP [mV]	-26,8	-39,3

Abb. 5.1-2 zeigt die gemessenen UV-Absorptionswerte der einzelnen Fraktionen bei der Abtrennung von überschüssigem Plasma von P188-SLN (A) bzw. TC450-SLN (B). Unter Berücksichtigung der Absorptionsspektren der beiden Komponenten (Abb. 5.1-1) war ersichtlich, dass bei 279 nm sowohl die Partikel als auch das Plasma absorbierten, während bei 350 nm der Absorptionskoeffizient von Plasma annähernd Null ist. Dies erklärt, warum die gemessenen Absorptionswerte bei 279 nm durchweg höher waren und man zwei Peaks erhielt (einen für die eluierten Partikel und einen für das Plasma), während bei 350 nm nur ein Peak gemessen wurde.

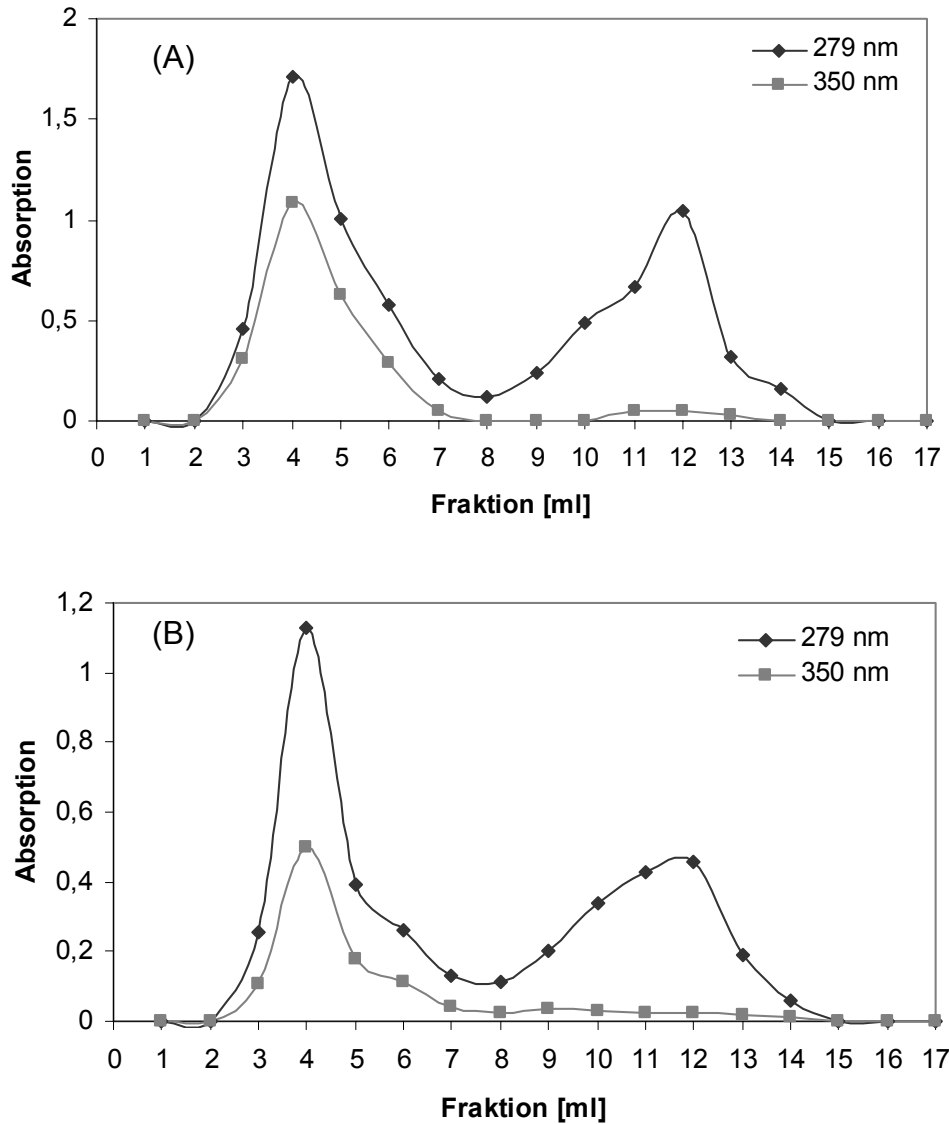


Abb. 5.1-2: UV-Absorptionswerte der Fraktionen 1-17 bei 279 nm bzw. 350 nm. (A) zeigt die Abtrennung von P188-SLN und (B) die Abtrennung von TC450-SLN von überschüssigem Plasma.

Mit Hilfe des oben genannten Gleichungssystems und der ermittelten spezifischen Absorptionskoeffizienten (Tab. 5.1-2) wurden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten in den jeweiligen Fraktionen berechnet (Abb. 5.1-3).

Tab. 5.1-2: Spezifische Absorptionskoeffizienten von den Partikeldispersionen bzw. von Citrat-stabilisiertem Humanplasma (CP) bei 279 bzw. 350 nm

	P188-SLN	TC450-SLN	CP
279 nm	11,382	4,217	0,4432
350 nm	5,532	2,048	0,0355

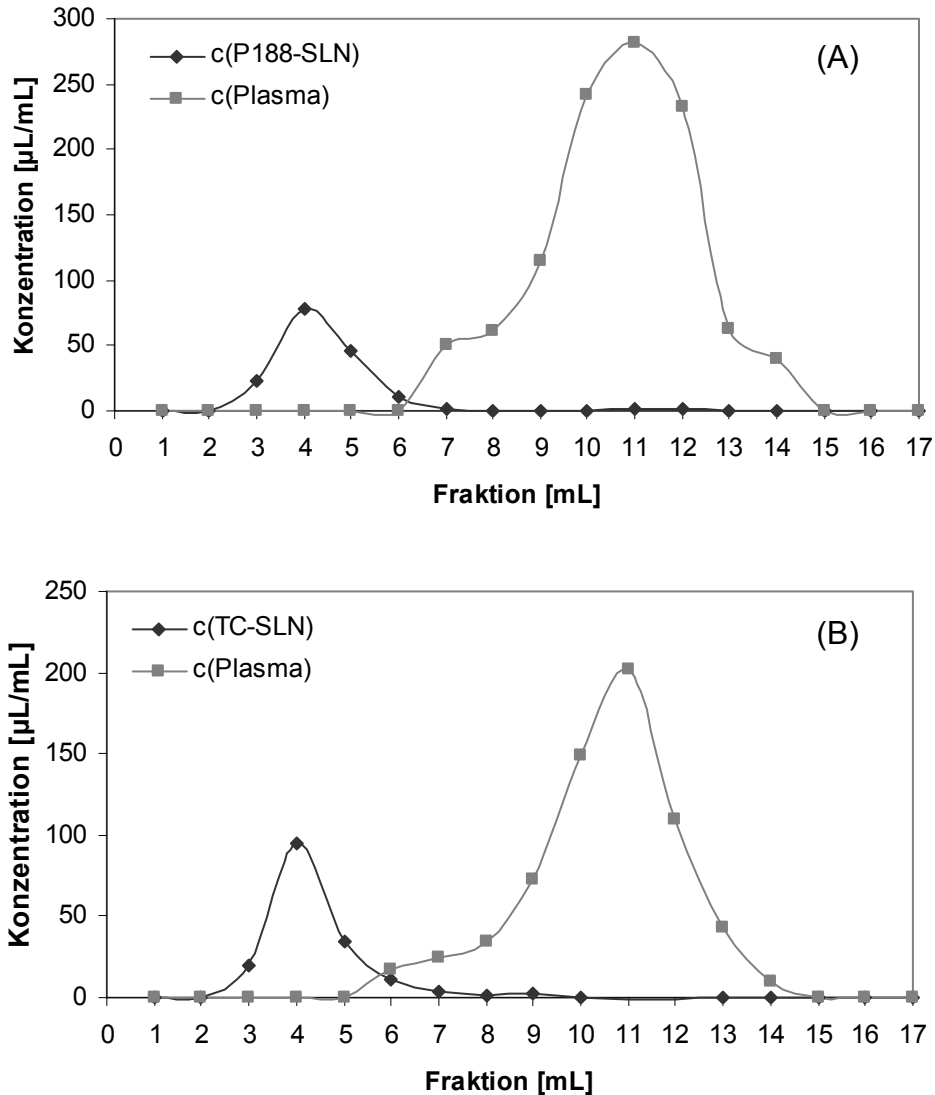


Abb. 5.1-3: Berechnete Konzentrationen von Plasma und P188-SLN (A) bzw. TC450-SLN (B) in den einzelnen Fraktionen.

Bei der Partikeldispersion mit dem größeren mittleren Teilchendurchmesser (P188-SLN, ca. 230 nm) fand im Vergleich zu TC450-SLN (ca. 159 nm) eine klarere Trennung der beiden Komponenten statt. Nur in den Fraktionen 6 und 7 waren sowohl SLN als auch Plasma zu finden, während es beim anderen Profil eine Überlappung in den Fraktionen 5 bis 10 gab. Die Größenmessung mittels LD (Tab. 5.1-1) verdeutlichte den feineren Größencharakter der TC450-SLN. Ungefähr 95% der Partikel waren kleiner als 0,21 μm (vgl. bei P188-SLN 0,46 μm) und ca. 50% kleiner als 0,11 μm (vgl. bei P188-SLN 0,25 μm). Die kleineren Partikel der TC450-SLN wurden relativ spät von der Säule eluiert, weshalb sie bis in die Fraktion 10 zu finden waren.

Basierend auf der Tatsache, dass bei allen Profilen die Fraktionen 3 und 4 absolut frei von Plasma waren und gleichzeitig die höchste Partikelkonzentrationen enthielten, wurden diese Fraktionen für die 2-DE ausgewählt (Göppert und Müller, 2004a).

Ein Vergleich der nach Zentrifugation bzw. Gelfiltration erhaltenen 2-DE-Gele von P188-SLN zeigte, dass die erhaltenen Plasmaproteinadsorptionsmuster qualitativ völlig identisch waren (Abb. 5.1-4). Die Gelfiltration (Abb. 5.1-4 B) führte im Vergleich zur Zentrifugation (Abb. 5.1-4 A) weder zu zusätzlichen Proteinspots, noch wurden durch die Gelfiltration irgendwelche Proteine von der Oberfläche der SLN entfernt.

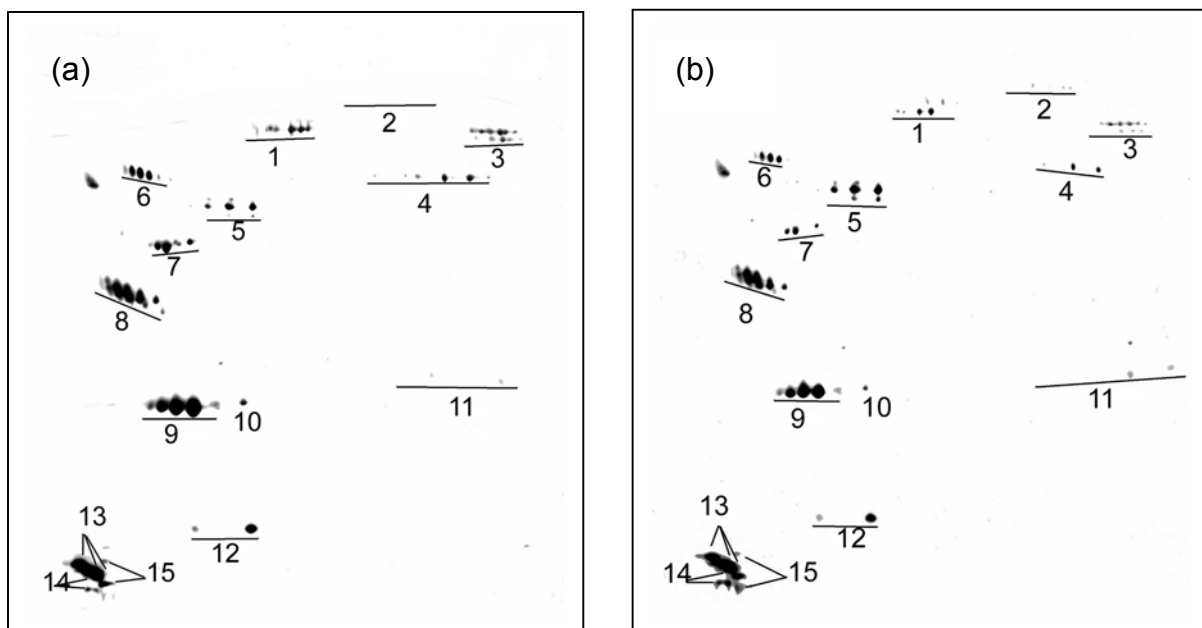


Abb. 5.1-4: 2-D-Pherogramme der Plasmaproteinadsorption auf P188-SLN (die ganzen Gele sind gezeigt, d. h. (wird im folgenden nicht mehr speziell erwähnt) Abszisse: pH 4-9 (von links nach rechts), Ordinate: MW 250 kDa-6 kDa (von oben nach unten)). Untersuchung des Einflusses der Proben-aufbereitung: (a) Zentrifugation, (b) Gelfiltration. (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) α 1-Antitrypsin, (7) ApoA-IV, (8) ApoJ, (9) ApoA-I, (10) ProapoA-I, (11) Ig leichte Ketten, (12) Transthyretin, (13) ApoC-III, (14) ApoC-II, (15) ApoA-II.

Bei Betrachtung der Gele unter quantitativen Gesichtspunkten fiel auf, dass alle Proteinspots auch mehr oder weniger gleich stark gefärbt waren. Die semiquantitative Auswertung mit MELANIE III ergab das in Abb. 5.1-5 dargestellte Balkendiagramm, in welchem die prozentualen Anteile der auf den Gelen detektierten Hauptproteine verglichen werden. Die aufgezeigten Proteine repräsentierten über 95% des insgesamt detektierten Adsorptionsmusters. Allgemein

zeigten die prozentualen Anteile nur sehr geringe Unterschiede, die unter Berücksichtigung der Analysegenauigkeit nicht signifikant waren.

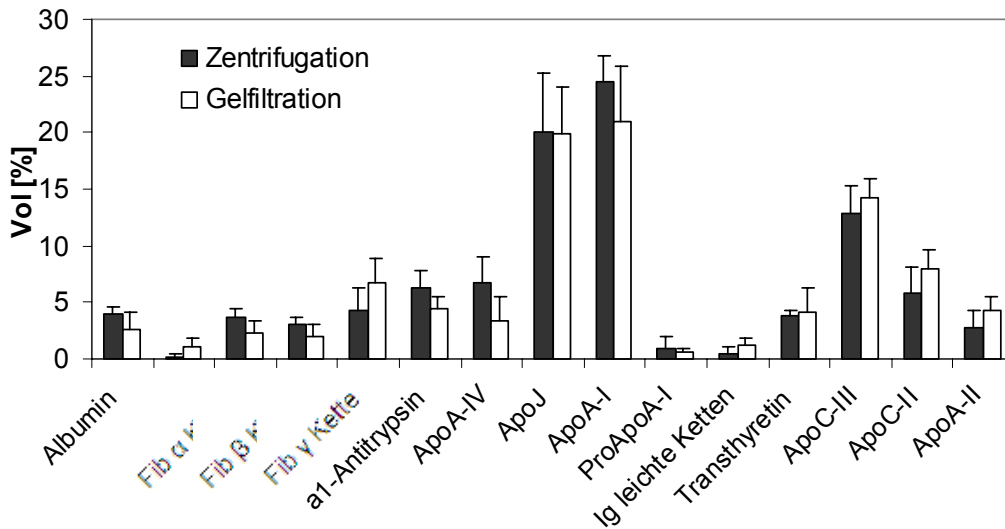


Abb. 5.1-5: Semiquantitative Auswertung der 2-DE-Pherogramme der Plasmaproteinadsorption auf P188-SLN. Untersuchung des Einflusses der Probenaufbereitung auf die 2-DE: Y-Achse: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Proteinmuster (in Volumen [%]), n = 3.

Zum gleichen Ergebnis kam man bei der Betrachtung der 2-DE-Gele von TC450-SLN und deren semiquantitativen Auswertung nach Zentrifugation bzw. Gelfiltration (Abb. 5.1-6 und Abb. 5.1-7).

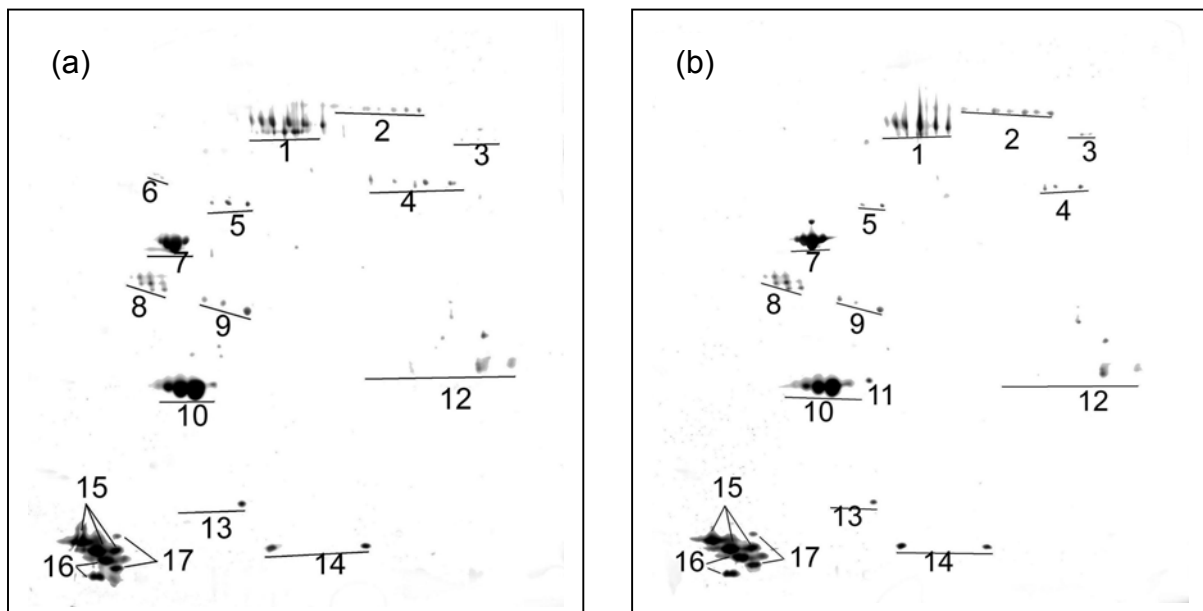


Abb. 5.1-6: 2-D-Pherogramme der Plasmaproteinadsorption auf TC450-SLN. Untersuchung des Einflusses der Probenaufbereitung: (a) Zentrifugation, (b) Gelfiltration. (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) α 1-Antitrypsin, (7) ApoA-IV, (8) ApoJ, (9) ApoE, (10) ApoA-I, (11) ProapoA-I, (12) Ig leichte Ketten, (13) Transthyretin, (14) Haptoglobin α 1 Kette, (15) ApoC-III, (16) ApoC-II, (17) ApoA-II.

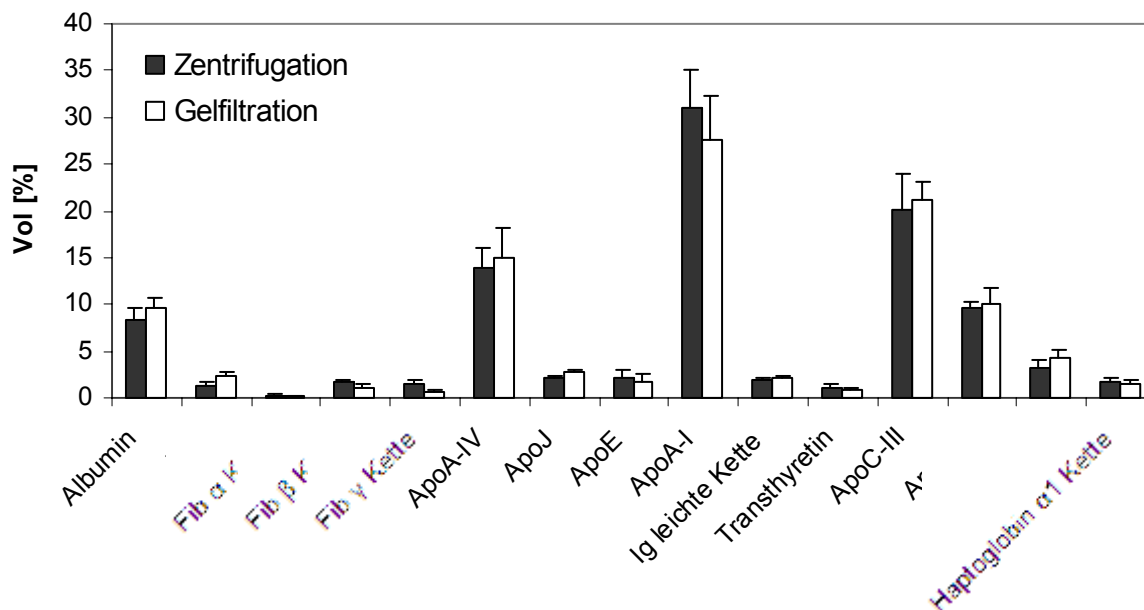


Abb. 5.1-7: Semiquantitative Auswertung der 2-DE-Gele von TC450-SLN. Y-Achse: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Proteinmuster, n = 2.

Wiederum waren die erhaltenen 2-DE-Gele qualitativ und (unter Berücksichtigung der typischen Standardabweichung der 2-DE (Blunk, 1994)) quantitativ identisch.

5.1.1.1.2 Fazit

Die erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die in dieser Form durchgeführte Gelfiltration eine zuverlässige Methode zur Abtrennung von SLN von überschüssigem Plasma ist (Göppert und Müller, 2004a).

Von großem Nachteil bei der Gelfiltration im Vergleich zur Zentrifugation ist jedoch der bei weitem höhere Zeitaufwand. Während bei der Zentrifugation alle (i. d. R. 8) Proben gleichzeitig aufbereitet werden können, kann bei der Gelfiltration immer nur eine Probe nach der anderen vom Plasma abgetrennt werden. Zusätzlich ist nach jeder Auftrennung eine Regeneration der Säule mit mindestens dem dreifachen Bettvolumen notwendig (vgl. Kapitel 4.2.1.1.2.2). Auch ist es hin und wieder notwendig, die Gelmatrix auszutauschen und die Säule entsprechend neu zu kalibrieren, was nicht nur wiederum sehr zeitaufwändig, sondern im Falle der meisten Trennungsmethoden (wie z. B. Sepharose 2B) auch sehr kostspielig ist.

Da jedoch bereits die 2-DE eine sehr aufwändige und teure Analytik ist, ist die Gelfiltration keine geeignete Methode, um ein intensives Screening von mehreren Einflussfaktoren auf die Adsorption von Plasmaproteinen auf SLN durchzuführen (Göppert und Müller, 2004a). Da jedoch genau dies das Ziel dieser Arbeit war, wurde an dieser Stelle für das weitere Vorgehen entschieden, zur Klärung grundlegender

Fragen, SLN aus Cetylpalmitat zu verwenden, da man diese mit Hilfe der Zentrifugation aufbereiten konnte. Dies wurde nicht nur aus praktischer Sicht begründet, sondern auch aufgrund der guten physiologischen Verträglichkeit von Cetylpalmitat. So wurde in Tierversuchen mit Mäusen nach sechs Bolus-Injektionen von 1,33 g Cetylpalmitat/kg Körpergewicht weder eine akute Toxizität noch eine Zunahme des Leber- oder Milzgewichts festgestellt (Weyhers, 1995, Weyhers et al., 1995).

5.1.1.1.3 Waschmedium

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass dem verwendeten Waschmedium bei der Probenaufbereitung von Polystyrol-Partikeln mittels Zentrifugation eine große Bedeutung zukommt (Blunk, 1994). So führte z. B. das Waschen der Partikel mit HEPES-Puffer zu ungewöhnlichen Veränderungen des Erscheinungsbildes der Spots für Fibrinogen α und β im Vergleich zu reinem Plasma, weshalb dieser Puffer verworfen wurde. Als geeigneter stellte sich Phosphatpuffer pH 7,4 heraus, der allerdings im Vergleich zu reinem destilliertem Wasser zu einem bedeutend geringeren Anteil von IgG auf den Gelen führte. Es wurde festgestellt, dass dies nicht etwa auf eine Desorption von IgG durch den Phosphatpuffer zurückzuführen war, sondern vielmehr auf eine bessere Löslichkeit dieses Proteins im Puffer während der Waschschriffe (Blunk, 1994). D. h. beim Waschen der Partikel mit destilliertem Wasser kam es aufgrund der geringen Löslichkeit von IgG in reinem Wasser nachträglich zu einer Adsorption auf der Partikeloberfläche, da durch einen solchen Waschvorgang eine Adsorption schließlich doch energetisch günstiger war. Bestätigt wurde dies durch die resultierenden Gele nach Filtration der Polystyrol-Partikel, bei denen der IgG-Anteil ebenfalls stark reduziert war. Sie zeigten auch insgesamt eine gute Übereinstimmung mit den Gelen nach Waschen mit Phosphatpuffer.

Da man in der Literatur trotzdem widersprüchliche Angaben zur Verwendung des Waschmediums findet (Gessner, 2001), wurden in dieser Studie die Proteinmuster auf SLN nach Probenaufbereitung mit 20 mM und 5 mM Phosphatpuffer, sowie mit bidestilliertem Wasser bestimmt, um das optimale Waschmedium für SLN festzulegen. Abb. 5.1-8 zeigt die dabei resultierenden 2-DE-Pherogramme.

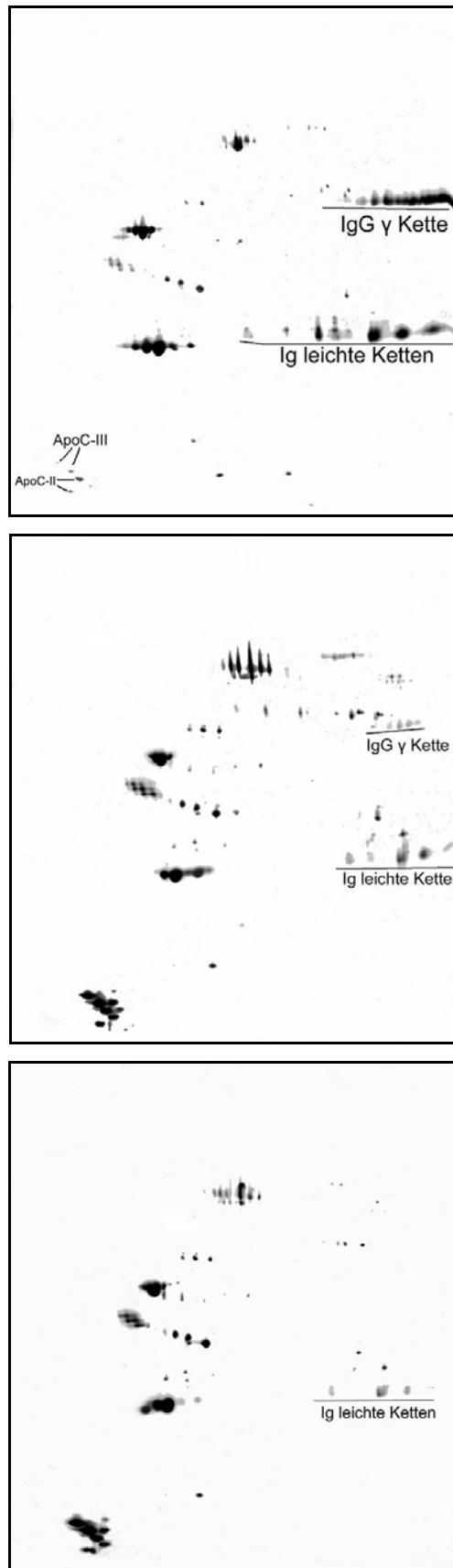


Abb. 5.1-8: Einfluss des Waschmediums auf das Proteinadsorptionsmuster auf TC450-SLN: Probenaufbereitung mit bidestilliertem Wasser (oben), 5 mM Phosphatpuffer pH 7,4 (Mitte) bzw. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 (unten).

Bereits vor der semiquantitativen Analyse war eindeutig zu erkennen, dass sich nach Waschen der SLN mit bidestilliertem Wasser ebenfalls eine große Menge IgG (IgG γ Kette und Ig leichte Ketten) auf dem Gel befand. Die Probenaufbereitung mit 5 mM Phosphatpuffer pH 7,4 reduzierte die Menge an IgG zwar erheblich, jedoch konnten die entsprechenden Spots immer noch auf dem Gel detektiert werden, was nach Probenaufbereitung mit 20 mM nicht mehr der Fall war. Ansonsten schienen die Proteinmuster insgesamt sehr ähnlich zu sein. Eine Ausnahme bildeten dabei die Apolipoproteine mit geringem MW (ApoC-III, ApoC-II, ApoA-II), welche nach Waschen mit bidestilliertem Wasser deutlich reduziert waren (vgl. Abb. 5.1-8 oben). Ein genaueres Bild ergab die Auswertung mit MELANIE (Abb. 5.1-9).

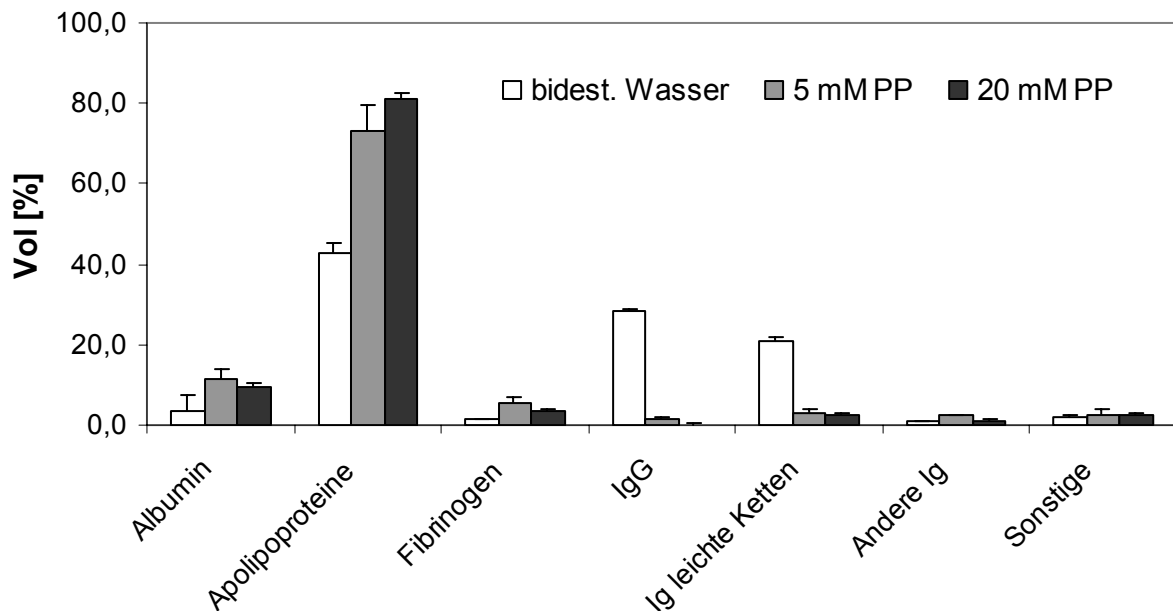


Abb. 5.1-9: Quantitativer Vergleich der Hauptgruppen adsorbierter Plasmaproteine auf TC450-SLN nach Probenaufbereitung mit unterschiedlichen Waschmedien (PP = Phosphatpuffer pH 7,4), n = 2.

Der Anteil von IgG γ an der Gesamtmenge adsorbierter Proteine wurde von 28,4% nach Waschen mit bidestilliertem Wasser auf 1,6% nach Waschen mit 5 mM- bzw. auf 0,2% mit 20 mM Phosphatpuffer reduziert. Ähnliches ergab sich für die leichten Ketten (von 21,1% auf 2,9% bzw. 2,3%)*. Da diese Diskrepanz noch viel stärker ausfiel als bei den Polystyrol-Partikeln (Reduktion von IgG γ von 12,0% auf 2,3% (Blunk, 1994)), scheint bei SLN die Auswahl des richtigen Waschmediums noch wichtiger zu sein. Die Adsorption von IgG nach Waschen mit bidestilliertem Wasser

*Anmerkung: Die leichten Ketten sind bei allen Antikörpern identisch, d. h. IgM, welches auf allen drei Gelen zu finden war, führt zu den gleichen Spots. Deswegen ging der Wert nicht auf Null nach Waschen mit 20 mM Phosphatpuffer.

ging vor allem auf Kosten der Apolipoproteine (Reduktion des Anteils von 81,0% bzw. 73,4% auf 42,6%) und da in erster Linie auf Kosten von ApoC-III, ApoC-II und ApoA-II (siehe Abb. 5.1-8 und Abb. 5.1-10). Da aber nicht nur IgG, sondern auch ApoC-III und ApoC-II, die Organverteilung entscheidend beeinflussen (vgl. Kapitel 5.1.1.3), hat diese „Verfälschung“ des Proteinmusters durch die Wahl des falschen Waschmediums einen sehr großen Einfluss auf die Interpretation der Daten und muss deshalb unbedingt vermieden werden.

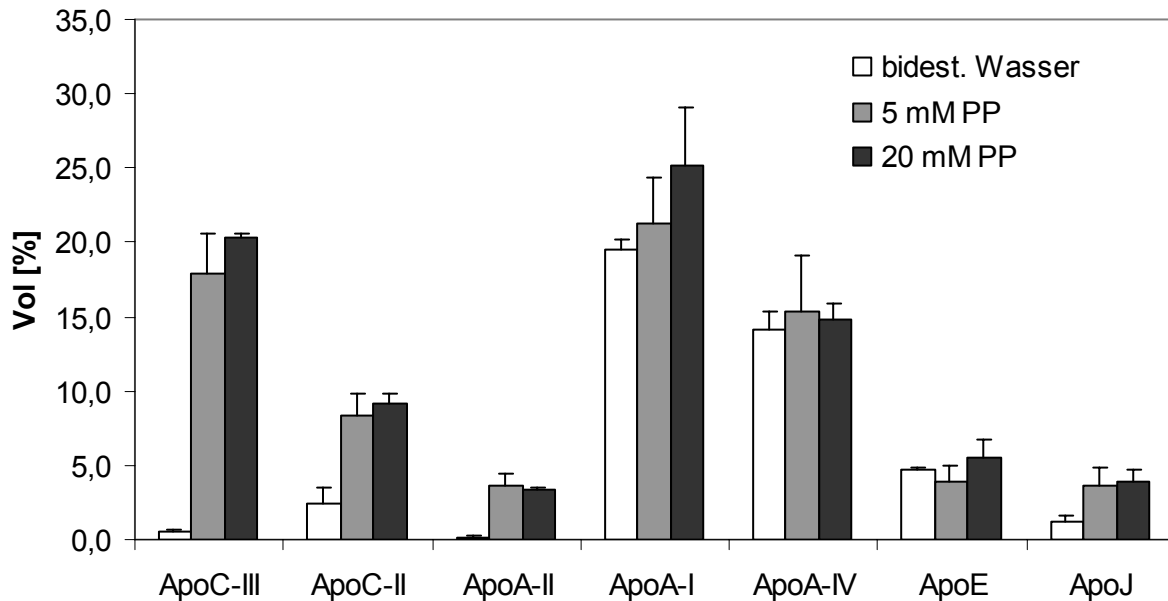


Abb. 5.1-10: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Apolipoproteine auf TC450-SLN nach Probenaufbereitung mit unterschiedlichen Waschmedien, n = 2.

Es blieb die Frage zu klären, ob der 20 mM oder der 5 mM Puffer das „wahre“ Adsorptionsmuster lieferte. Da nach Abtrennung der gleichen SLN mittels Gelfiltration auch kein IgG auf dem 2-DE-Pherogramm zu detektieren war und auch insgesamt die Gele eine sehr gute Übereinstimmung mit den Gelen nach Waschen mit 20 mM Puffer zeigten, wurden die SLN in dieser Arbeit mit diesem Puffer gewaschen. Der gleiche Puffer wurde auch in früheren Studien zur Bestimmung der Plasmaproteinadsorptionsmuster auf O/W-Emulsionen verwendet (Harnisch und Müller, 1998).

5.1.1.1.4 Waschschritte

Um die optimale Anzahl an Waschschritten bei der Probenaufbereitung von SLN mittels Zentrifugation zu ermitteln, wurden vier Waschschritte durchgeführt und nach

jedem Waschschrift die jeweiligen Proteinmuster bestimmt. Die dabei erhaltenen 2-DE-Gele sind in Abb. 5.1-11 dargestellt.

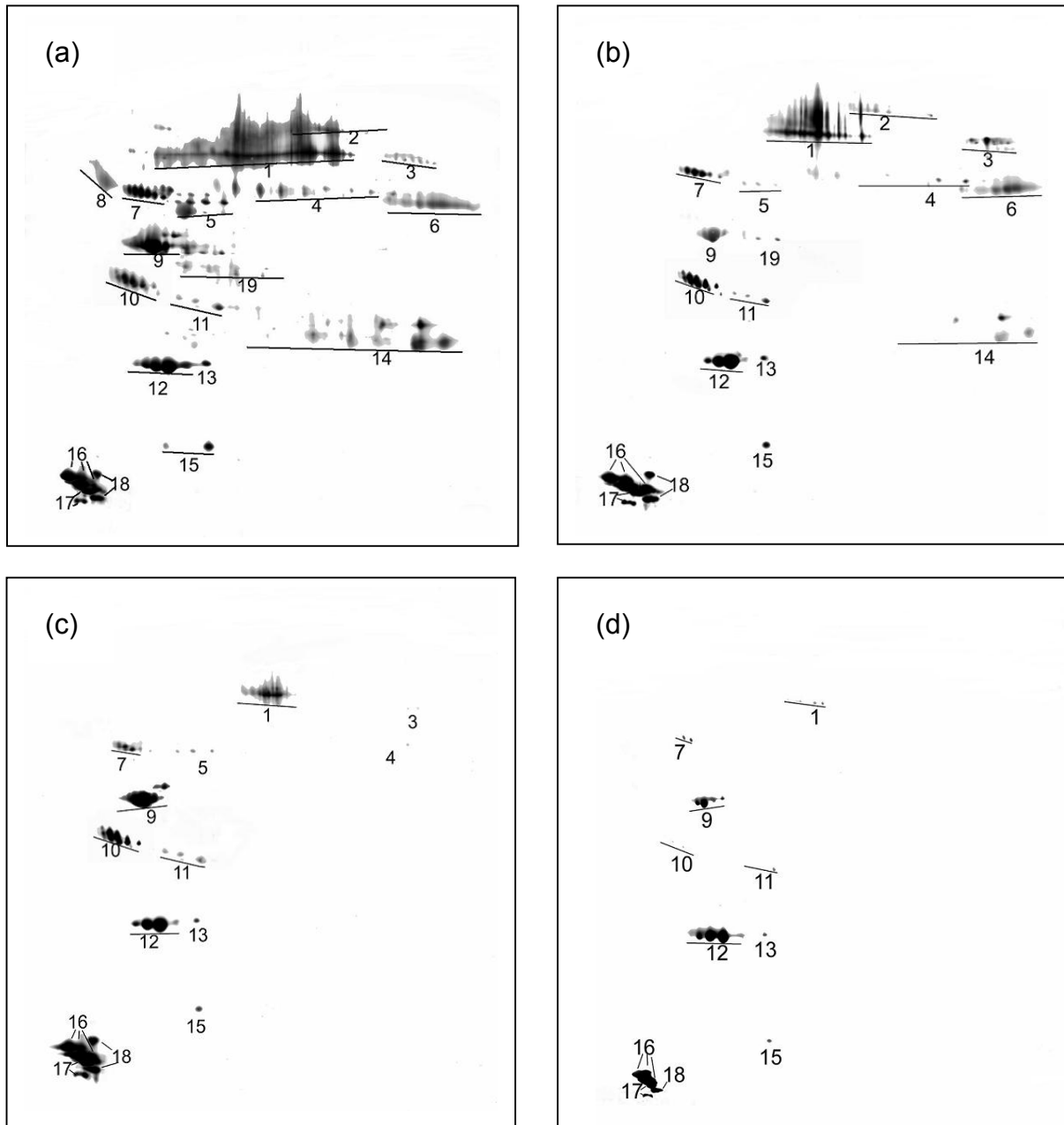


Abb. 5.1-11: Proteinadsorptionsmuster auf TC450-SLN nach den Waschschriften 1 (a), 2 (b), 3 (c) und 4 (d). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) IgG γ Kette, (7) α 1-Antitrypsin, (8) α 2-HS-Glycoprotein, (9) ApoA-IV, (10) ApoJ, (11) ApoE, (12) ApoA-I, (13) ProapoA-I, (14) Ig leichte Ketten (15) Transthyretin, (16) ApoC-III, (17) ApoC-II, (18) ApoA-II, (19) Haptoglobin β Kette.

Es war deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Anzahl an Waschschriften nicht nur die detektierte Proteingesamtmenge abnahm. Vielmehr wurden auch die Spots einiger Proteinspezies immer kleiner bzw. verschwanden schließlich fast völlig. Dies traf vor allem auf die Spots von Albumin, IgG und Fibrinogen zu. Da diese Proteine

im Plasma in großen Mengen vorkommen, ist davon auszugehen, dass sie nicht auf der Oberfläche der SLN adsorbiert waren, sondern dass diese Spots lediglich aufgrund von Plasmaresten in der Probe detektiert wurden. Dagegen blieben die Spots der Apolipoproteine über drei Waschschrte in ihrem Erscheinungsbild relativ stabil, so dass angenommen werden kann, dass diese Proteine eine richtige Wechselwirkung mit der Oberfläche der Proteine eingingen. Zum gleichen Schluss kamen auch Harnisch und Müller (1998), die das gleiche Phänomen bei der Untersuchung einer O/W-Emulsion (Lipofundin MCT 20%) feststellten.

Die semiquantitative Auswertung der Gele in Abb. 5.1-12 verdeutlicht nochmals die Mengenabnahme (Abb. 5.1-12 (A)) bzw. Mengenkonzanz (Abb. 5.1-12 (B)) bestimmter Proteine mit zunehmender Anzahl an Waschschrten. Es war deutlich zu erkennen, dass die absoluten Mengen an Albumin, Fibrinogen und Immunglobulin mit zunehmender Anzahl an Waschschrten stetig abnahmen. Bereits nach drei Waschschrten wurden, mit Ausnahme von Albumin, die genannten Spots nicht mehr auf den entsprechenden Gelen detektiert. Auffällig waren die vergleichsweise hohen Standardabweichungen (v. a. bei Albumin), was ein weiteres Indiz dafür war, dass diese Proteine keine Bindungen mit der Oberfläche der SLN eingingen, sondern dass die Bestimmung der absoluten Mengen dieser Proteine davon abhängig war, wie viel Protein „zufällig“ nach dem Waschen in der Probe zurückblieb. Ein anderes Bild lieferte der Vergleich der absoluten Mengen der Apolipoproteine (Abb. 5.1-12 (B)). Über drei Waschschrte blieben die entsprechenden Werte relativ konstant. Auch die Standardabweichungen lagen im Rahmen der für die 2-DE-Analytik üblichen Schwankungen. Eine Ausnahme bildete dabei ApoA-IV, dessen detektierte Menge durch den zweiten Waschschrte vergleichsweise stark verringert wurde. Auch die Standardabweichungen waren bei ApoA-IV bei den ersten drei Waschschrten relativ groß. Die Gründe für dieses Phänomen blieben unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Bindungskräfte von ApoA-IV zur Oberfläche nicht so groß waren wie bei den anderen Apolipoproteinen und es deshalb während des Waschvorgangs leichter von der Oberfläche abgeschert bzw. abgewaschen wurde. Dass ApoA-IV aber - ähnlich wie die in Abb. 5.1-12 (A) aufgeführten Proteine - gar nicht auf der Oberfläche gebunden war, ist jedoch eher unwahrscheinlich, da es sich aufgrund seiner sehr niedrigen Konzentration im Plasma erst einmal auf der Oberfläche der SLN anreichern musste, um auf die auf dem ersten Gel bestimmten Werte zu kommen.

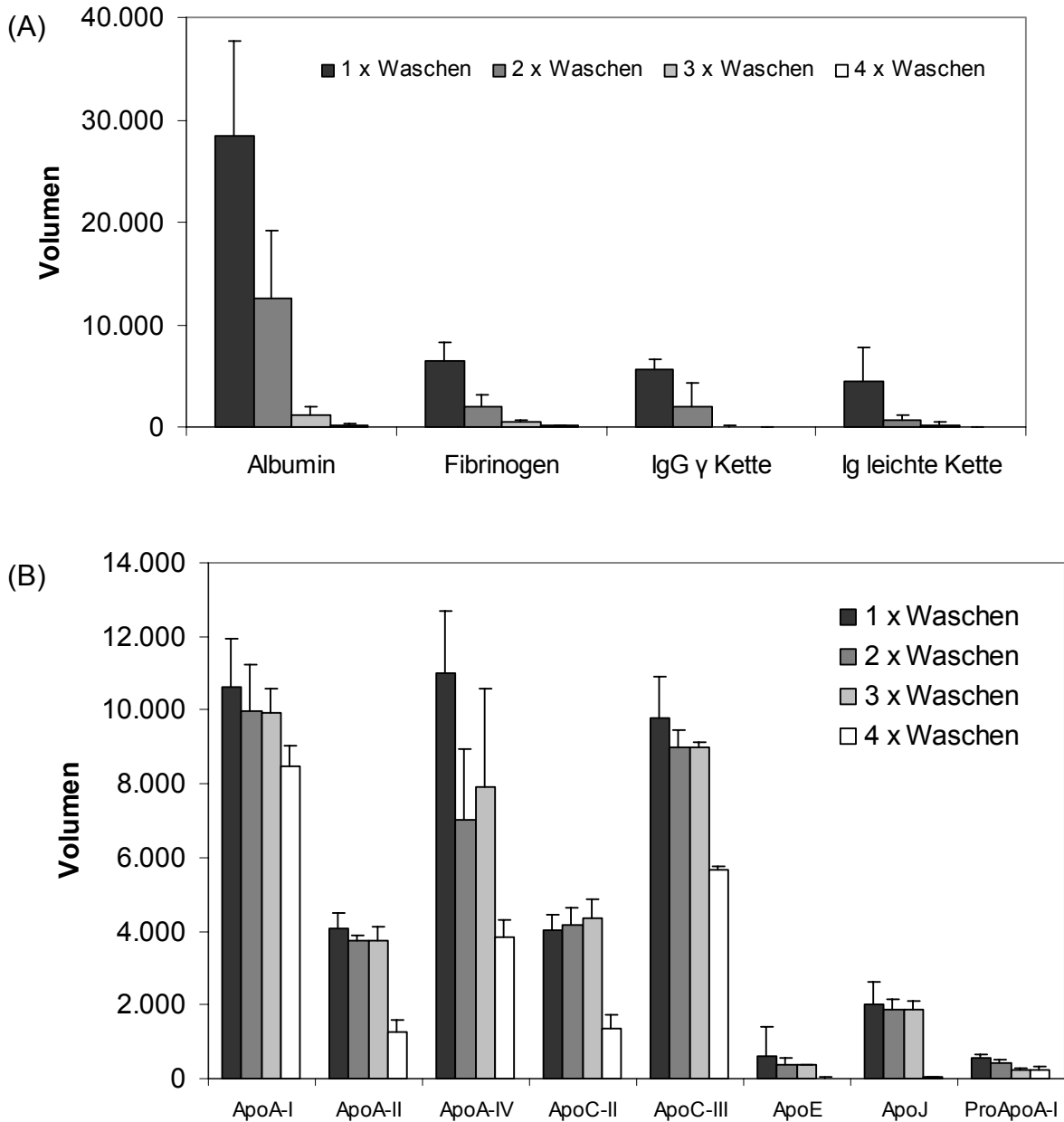


Abb. 5.1-12: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Hauptproteine auf TC450-SLN mit zunehmender Anzahl an Waschschrirte. Dargestellt sind die absoluten Mengen in Volumen. (A) zeigt die Mengenabnahme der Proteine, die nicht auf der Oberfläche adsorbiert waren und (B) die Apolipoproteine, die eine stärkere Wechselwirkung mit der Oberfläche eingingen, n = 2.

Allgemein war bei allen Apolipoproteinen ein starker Rückgang der detektierten absoluten Mengen durch den vierten Waschschrirte zu verzeichnen. Die Spots von ApoE und ApoJ verschwanden dadurch sogar völlig. Deshalb wurde die optimale Anzahl an Waschschrirten für die Probenaufbereitung von SLN auf drei festgelegt, da diese Anzahl auch ausreichend war, um die nicht auf der Oberfläche adsorbierten Proteine zu entfernen (vgl. Abb. 5.1-12 (A)). Die gleiche Anzahl an Waschschrirten

wurde bereits bei der Untersuchung von O/W-Emulsionen als optimal bestimmt (Harnisch und Müller, 1998).

5.1.1.2 Inkubationsmedium

Die Auswahl des Inkubationsmediums richtet sich nach der Fragestellung, der man nachgeht. Wenn die Korrelation mit den *In-vivo*-Daten eines Tierversuchs (z. B. Maus oder Ratte) im Vordergrund stand, erfolgte in den bisherigen Studien die Bestimmung der Proteinadsorption unter Verwendung des Plasmas/Serums des entsprechenden Versuchstieres (Gessner et al., 2001, Schöler et al., 2001). Um festzustellen, ob die Partikel zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen, müssen sie in Serum inkubiert werden (Lück et al., 1999). Für Routinestudien wurde jedoch humanes Vollplasma verwendet, um den Verhältnissen *in vivo* möglichst nahe zu kommen.

5.1.1.2.1 Verwendung von Humanplasmen unterschiedlicher Spender

Um eventuelle Variationen der Adsorptionsmuster in Abhängigkeit des verwendeten humanen Vollplasma zu detektieren, fand die Inkubation zusätzlich zu dem routinemäßig verwendeten und vom DRK gepoolten Humanplasma (DRK-Plasma) in mittels Eigenspende gewonnenem Plasma statt (E-Plasma). Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass E-Plasma nicht wie vom DRK mit Natriumcitrat, sondern mit Natrium-EDTA stabilisiert wurde.

Abb. 5.1-13 stellt die beiden Adsorptionsmuster auf P188-SLN nach Inkubation in den beiden unterschiedlichen Plasmen gegenüber. Insgesamt ergab sich eine gute Übereinstimmung der Gele. Auffällig war jedoch die etwas niedrigere Adsorption von Fibrinogen nach Inkubation in E-Plasma. MELANIE quantifizierte diesen Unterschied mit 5,4% Anteil von Fibrinogen an der Gesamtmenge adsorbierter Proteine gegenüber 9,9% nach Inkubation in DRK-Plasma (vgl. Abb. 5.1-14). Dies legte die Vermutung nahe, dass das verwendete DRK-Plasma einen im Vergleich zum E-Plasma erhöhten Anteil an Fibrinogen enthielt. Da das DRK-Plasma nicht nur ein „Naturprodukt“, sondern auch die zufällige Mischung der Plasmen unterschiedlicher Spender darstellt, sind Schwankungen der Anteile verschiedener Proteine in den unterschiedlichen Chargen durchaus zu erwarten. Es wurde bereits durch Inkubation von Polystyrol-Partikeln in Humanplasma von vier unterschiedlichen Individuen eine Spenderspezifität hinsichtlich des Anteils verschiedener Proteine gezeigt (Blunk, 1994). Doch auch in der zitierten Studie zeigten die Proteinadsorptionsmuster insgesamt eine gute Übereinstimmung.

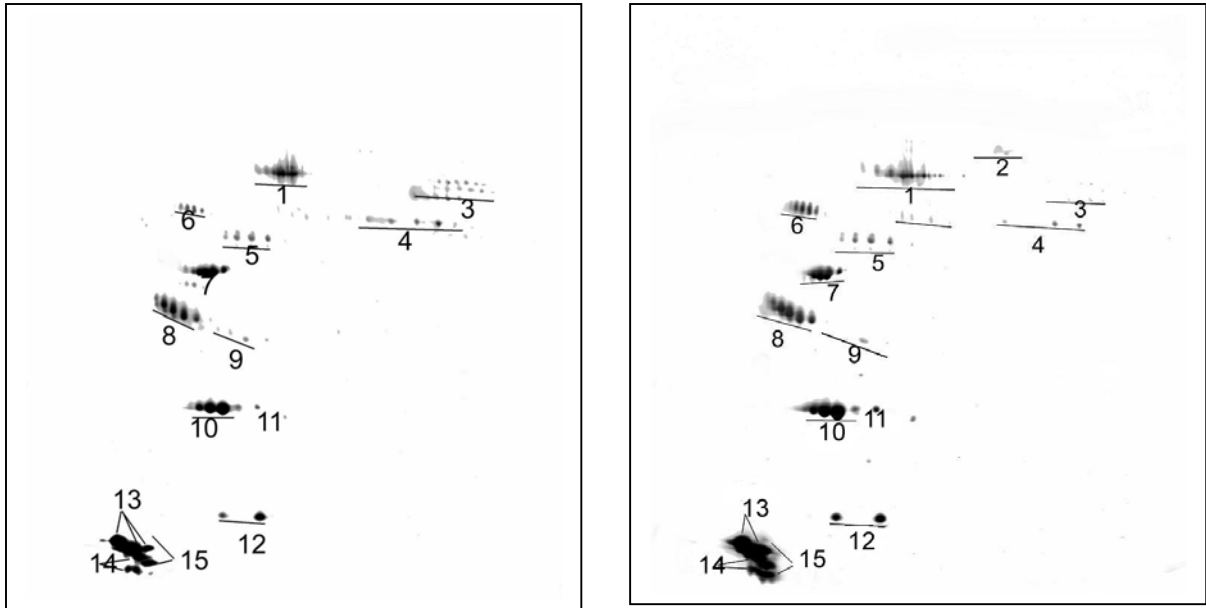


Abb. 5.1-13: Vergleich der Adsorptionsmuster auf P188-SLN nach Inkubation in DRK-Plasma (links) bzw. in E-Plasma (rechts). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) α 1-Antitrypsin, (7) ApoA-IV, (8) ApoJ, (9) ApoE, (10) ApoA-I, (11) ProapoA-I, (12) Transthyretin, (13) ApoC-III, (14) ApoC-II, (15) ApoA-II.

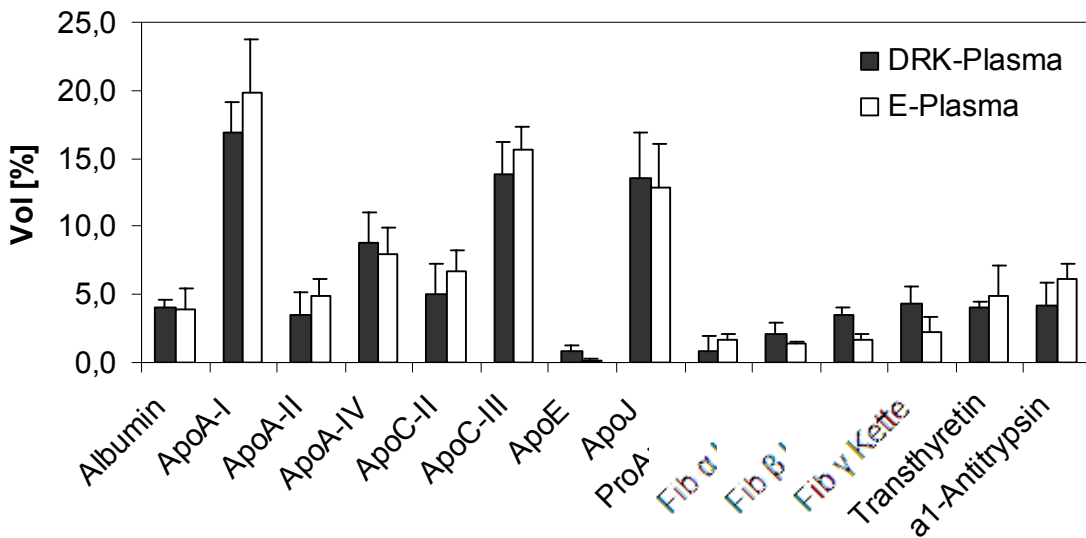


Abb. 5.1-14: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine auf P188-SLN nach Inkubation in DRK-Plasma bzw. in E-Plasma, n = 2.

Die Inkubation von TC450-SLN in DRK-Plasma bzw. E-Plasma bestätigte die Vermutung einer erhöhten Konzentration von Fibrinogen im DRK-Plasma nicht. Der prozentuale Anteil von auf der Oberfläche adsorbiertem Fibrinogen erreichte Mittelwerte von 2,3% (DRK-Gel) bzw. 2,0% (E-Gel), was im Rahmen der üblichen Schwankungen lag. Zudem waren auch hier die Gele qualitativ und quantitativ sehr

ähnlich (Abb. 5.1-15), was auf keine generellen Abweichungen bzw. einen systematischen Fehler durch die Verwendung verschiedener Plasmen schließen ließ. Auch der Zusatz von EDTA statt Citrat zur Stabilisierung des Plasmas schien keinen Einfluss auf die resultierenden Plasmaproteinadsorptionsmuster zu haben.

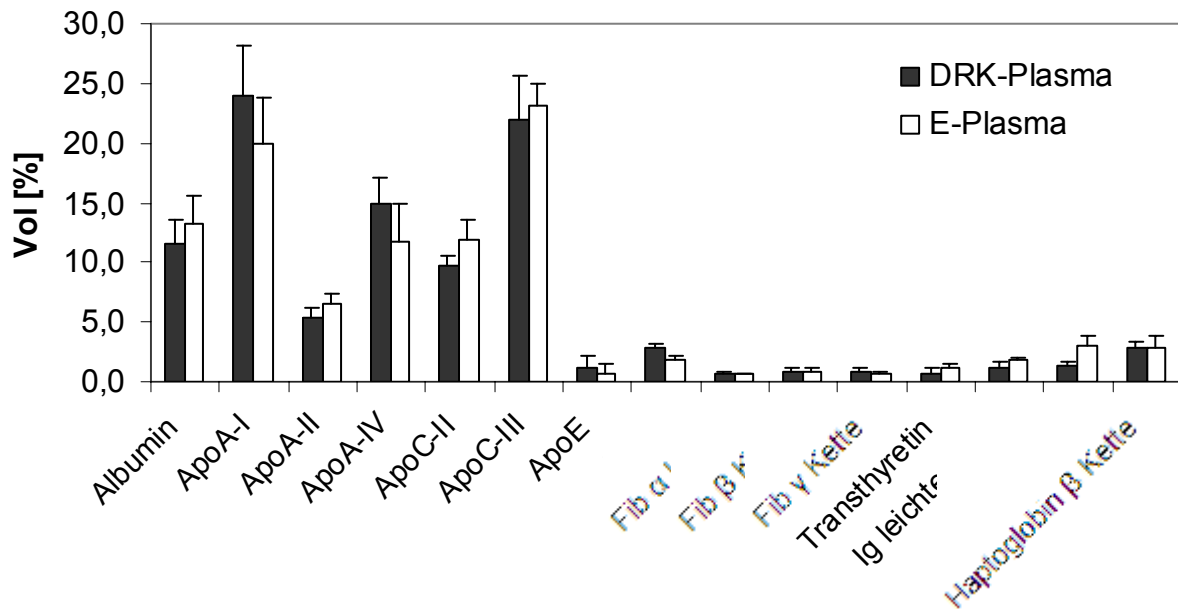


Abb. 5.1-15: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine auf TC450-SLN nach Inkubation in DRK-Plasma bzw. in E-Plasma, n = 2.

Trotzdem muss bei der Verwendung unterschiedlicher Chargen von DRK-Plasma immer mit natürlichen Schwankungen gerechnet werden, was bei Auffälligkeiten beim Vergleich unterschiedlicher Studien nicht vernachlässigt werden darf.

Um diese Schwankungen in akzeptablen Grenzen zu halten, wurde für Routinestudien ausschließlich Plasma von gesunden Spendern verwendet, da sich infolge einer Krankheit (z. B. Infektion oder Hyperlipidämie) die Konzentration bestimmter Plasmaproteine erheblich ändern kann. Auch sind die Konzentration der meisten Proteine (z. B. Fibrinogen; Ausnahme z. B. α_2 -Macroglobulin) im Plasma stark davon abhängig, ob es sich bei dem Spender um einen Erwachsenen oder ein Kind handelte (Cornelius et al., 2002b). Auch dieser Einfluss wurde durch ausschließliche Verwendung von Plasma von Erwachsenen ausgeschlossen.

5.1.1.2.2 Vergleich zwischen Frischplasma und gefrorenem Plasma

Um die beschriebenen Schwankungen bei der Benutzung unterschiedlicher Plasma-Chargen von vornherein zu vermeiden, wurden längere Versuchsreihen (über mehrere Läufe hinaus) mit der gleichen Charge durchgeführt. Damit dies möglich

war, musste das Plasma bei -70°C eingefroren werden. Das in einem Infusionsbeutel bezogene Plasma wurde sofort portioniert, damit jede Plasmaprobe nur einmal aufgetaut werden musste. Es wurde zwar gezeigt, dass sowohl die Gele des reinen Plasmas (Tracy et al., 1982) als auch die Adsorptionsmuster auf Polystyrol-Partikeln (Blunk, 1994) nach dem Einfrieren nur unwesentliche Veränderungen aufwiesen, jedoch sollten diese Ergebnisse auch für die Studien mit SLN verifiziert werden.

Deshalb wurden TC-SLN (10% Cetylpalmitat, 1,2% Tego Care 450, Aqua purificata ad 100%) in aufgetautem Plasma inkubiert, welches zuvor vier Monate bei -70°C eingefrorenen war. Die dadurch resultierenden Gele wurden mit Gelen verglichen, die durch Inkubation der Partikel in frisch vom DRK bezogenem Plasma erhalten wurden (Abb. 5.1-16).

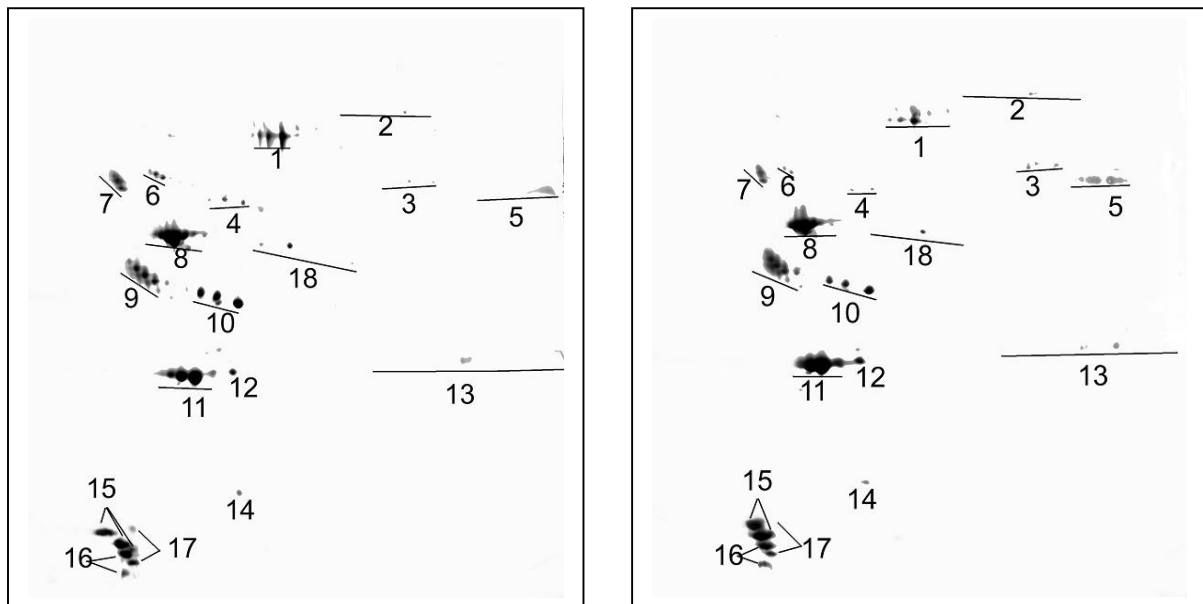


Abb. 5.1-16: Vergleich der Adsorptionsmuster auf TC-SLN nach Adsorption aus Frischplasma (links) und aus über vier Monate gefrorenem Plasma (rechts). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen β Kette, (4) Fibrinogen γ Kette, (5) IgG γ Kette, (6) α 1-Antitrypsin, (7) α 2-HS-Glycoprotein, (8) ApoA-IV, (9) ApoJ, (10) ApoE, (11) ApoA-I, (12) ProapoA-I, (13) Ig leichte Ketten (14) Transthyretin, (15) ApoC-III, (16) ApoC-II, (17) ApoA-II, (18) Haptoglobin β Kette.

Bei qualitativer Betrachtung der Gele waren keine Unterschiede zu verzeichnen. Trotz des Einfrierens über vier Monate bei -70°C wurden weder zusätzliche Proteinspots detektiert, noch fehlten Spots auf dem Gel.

Auch nach semiquantitativer Analyse waren nur geringe Unterschiede in den Mengenverhältnissen der adsorbierten Plasmaproteine erkennbar (Abb. 5.1-17), die

unter Berücksichtigung der Analysengenauigkeit alle im Rahmen der üblichen Schwankungen lagen.

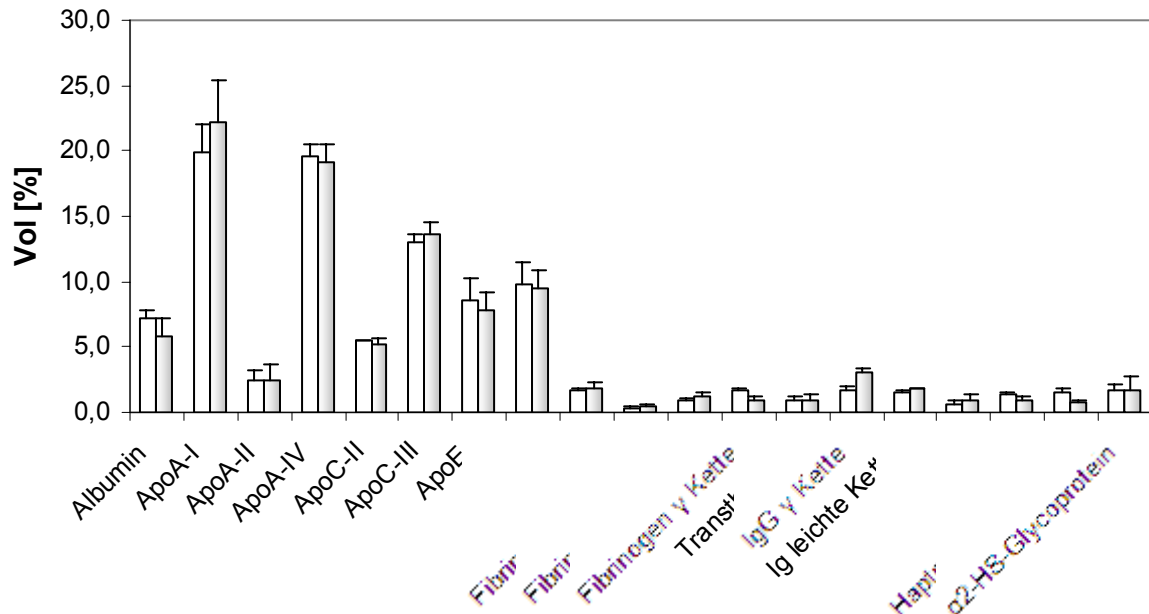


Abb. 5.1-17: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine auf TC-SLN nach Adsorption aus Frischplasma (linke Balken) und aus 4 Monate bei -70°C gefrorenem Plasma (rechte Balken), $n = 2$.

Daraus wurde gefolgert, dass das Einfrieren von Humanplasma und dessen Lagerung bei -70°C keine Auswirkungen auf die Adsorptionseigenschaften der Proteine auf SLN hat. Zur Sicherheit wurde im folgenden trotzdem kein Plasma verwendet, das länger als vier Monate eingefroren war.

5.1.1.2.3 Humanserum

Leroux et al. (1995) fanden in humanen Monozytenkulturen in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium (Plasma vs. Serum) drastische Unterschiede in den Phagozytoseraten von PLA-Partikeln und PEG-modifizierten PLA-Partikeln. Die modifizierten Partikel wurden im Vergleich zu den unmodifizierten nach jeweiliger Inkubation in Plasma deutlich geringer von den Monozyten phagozytiert. Im Gegensatz dazu wurde dieser Unterschied nach Inkubation in Serum kaum noch festgestellt. In Serum wurden beide Partikel-Sorten stark phagozytiert. Dieses Phänomen wurde auf eine Beteiligung des Komplementsystems an der Phagozytose der Partikel zurückgeführt. Beide Partikel-Sorten aktivieren das Komplementsystem gleichermaßen, was aber bei Inkubation in Plasma aufgrund des Zusatzes von Antikoagulantien (Komplexierung zweiwertiger Ionen unterdrückt das Komplementsystem) nicht festgestellt werden konnte.

Mit Hilfe der 2-DE gelang es, eine solche Komplementaktivierung an einer Partikeloberfläche nachzuweisen (Lück et al., 1999). Es wurden Polystyrol-Partikel mit Hydroxylgruppen an der Oberfläche in Plasma, Serum sowie in hitzeinaktiviertem Serum inkubiert. Das Adsorptionsmuster der in Plasma inkubierten Partikel wurde von Fibrinogen dominiert. Die 2-DE-Gele nach Inkubation in Serum waren dagegen nicht nur – wie erwartet – frei von Fibrinogen, sondern es wurden in beträchtlicher Menge Spaltprodukte des Komplementfaktors C3 (v. a. C3 β) detektiert, die erheblich größer waren, als im Falle einer „normalen“ Adsorption von C3 auf einer nicht-komplementaktivierenden Oberfläche oder einer normalen Adsorption aus Plasma. Der Grund für diese Akkumulation von C3 ist ein Rückkopplungsmechanismus der bei einer Aktivierung des Komplementsystems zu weiterer Adsorption von C3 auf der Oberfläche führt. Da die Komplementfaktoren hitzelabil sind, wurden die C3-Fragmente auf dem 2-DE-Gel der in hitzebehandelten Serum inkubierten Partikel erwartungsgemäß kaum noch bzw. nicht mehr detektiert (Lück et al., 1999).

Aus dieser Sicht scheint Serum das bessere Inkubationsmedium zu sein, da es keine Antikoagulantien enthält und somit den Nachweis einer Aktivierung des Komplementsystems durch Partikelkontakt zulässt. Allerdings zeigten mehrere Studien zur Plasmaproteinadsorption, dass Fibrinogen sehr häufig präferentiell auf Partikeloberflächen adsorbiert (Blunk et al., 1993, Blunk et al., 1996, Lück et al., 1998b, Lind et al., 2002, Gessner et al., 2003). Da diese Adsorption eine ebenfalls große Bedeutung für das Verhalten der Partikel *in vivo* hat, kamen die Autoren der beschriebenen Artikel zu dem Schluss, dass die Inkubation von Partikeln in Plasma für Routineuntersuchungen ein geeigneter Kompromiss ist. Diese Entscheidung wurde durch eine Studie von Lind et al. (2001a) bekräftigt, die zeigte, dass die Adsorptionsmuster auf superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln nach Inkubation in Plasma *in vitro* sehr gut mit den Adsorptionsmustern der Partikeln, die *ex vivo* gewonnen wurden, übereinstimmten.

Trotzdem muss dieser Einfluss des Inkubationsmediums auf die Proteinmuster der Partikel berücksichtigt werden, vor allem wenn die *in vitro* bestimmten Proteinmuster direkt mit dem *In-vivo*-Verhalten der Partikel korreliert werden sollen. Deshalb müssen im Zweifelsfall immer beide Adsorptionsmuster (nach Inkubation in Plasma und in Serum) bestimmt werden. Aus beschriebenen Gründen ist dies aber in der Praxis nicht umsetzbar, weshalb derartige „Doppelstudien“ nur mit ausgewählten Formulierungen unternommen wurden, wie z. B. mit Poloxamer 235-stabilisierten

SLN (P235-SLN), da diesen ein großes Potential zur Überwindung der BHS zugeordnet wird (vgl. Kapitel 5.1.2.2).

Abb. 5.1-18 zeigt die resultierenden Proteinadsorptionsmuster auf P235-SLN nach Inkubation in Plasma bzw. Serum.

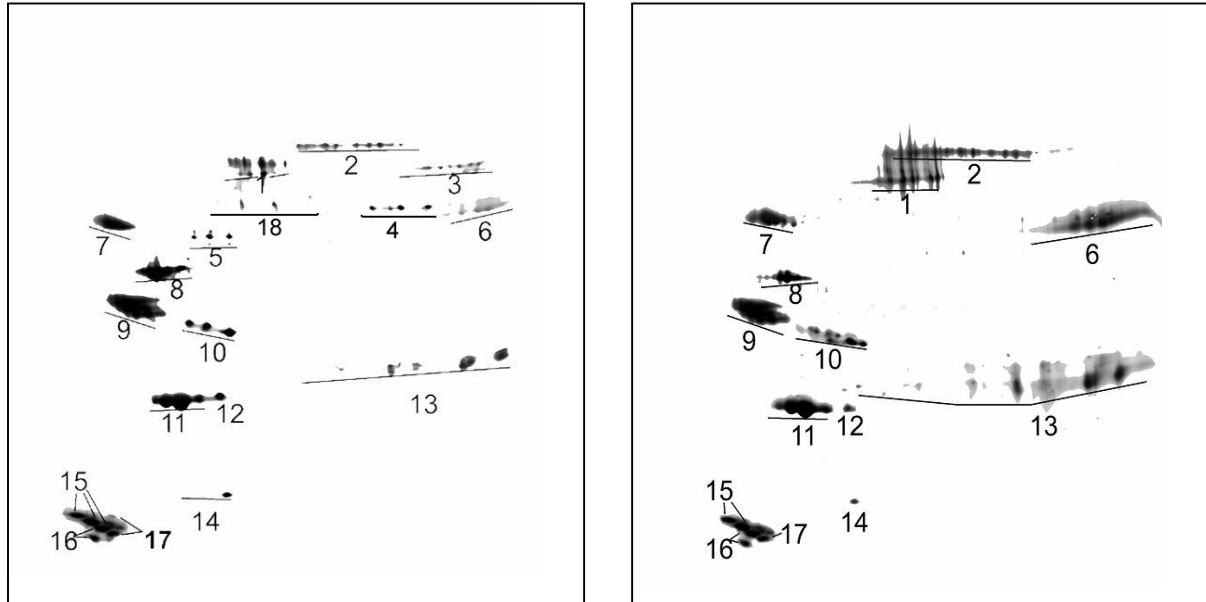


Abb. 5.1-18: Proteinadsorptionsmuster auf P235-SLN nach Inkubation in Plasma (links) bzw. Serum (rechts). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) IgG γ Kette, (7) α 1-Antitrypsin, (8) ApoA-IV, (9) ApoJ, (10) ApoE, (11) ApoA-I, (12) ProapoA-I, (13) Ig leichte Ketten (14) Transthyretin, (15) ApoC-III, (16) ApoC-II, (17) ApoA-II, (18) ApoH.

Das Proteinmuster der in Plasma inkubierten Partikel wurde (wie bei den meisten SLN) von Apolipoproteinen dominiert (vgl. Abb. 5.1-19). Die drei Fibrinogen-Ketten erreichten zusammen einen Mittelwert von 5,1%. Abgesehen von dem fehlenden Fibrinogen, ergab sich nach Inkubation in Serum ein ähnliches Bild. Auch hier dominierten die Apolipoproteine das Adsorptionsmuster. Im Gegensatz zu den beschriebenen oberflächenmodifizierten Polystyrol-Partikeln kam es hier aber zu keiner Anreicherung von Komplementfaktoren auf der Oberfläche, d. h. zu keiner Aktivierung des Komplementsystems durch P235-SLN. Auffällig war, dass sich der Anteil des fehlenden Fibrinogen nicht gleichmäßig auf die anderen Proteine verteilte. Während der Anteil an adsorbierten Apolipoproteinen und Albumin ungefähr gleich blieb, kam es vor allem zu einer Zunahme der adsorbierten Menge an Immunglobulin, insbesondere IgG γ .

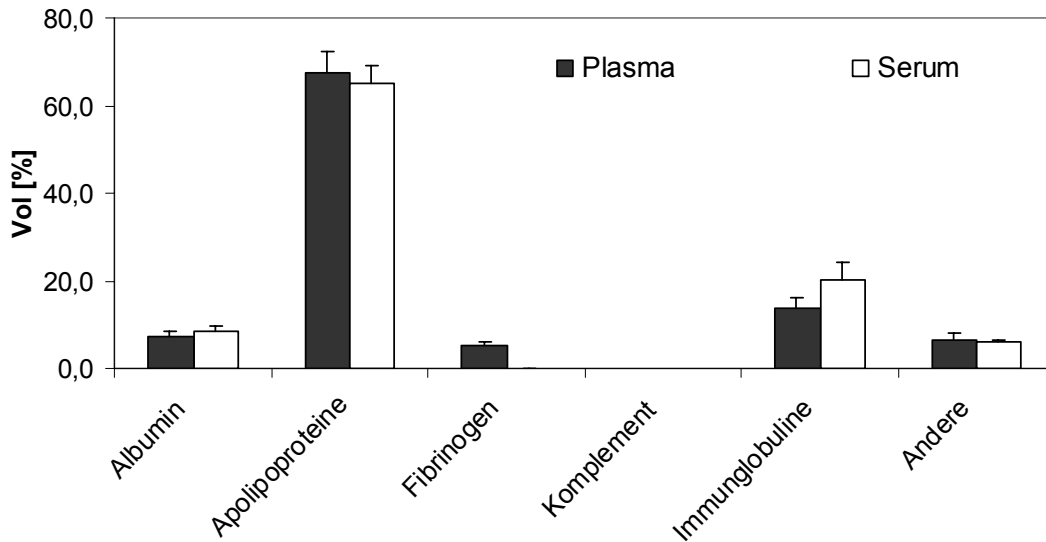


Abb. 5.1-19: Quantitativer Vergleich der Hauptgruppen adsorbierter Plasmaproteine auf P235-SLN nach Inkubation in Plasma bzw. Serum, n = 2.

Eine mögliche Erklärung dafür könnten die ähnlichen Eigenschaften von Fibrinogen α bzw. β und IgG γ hinsichtlich MW und pI sein (Tab. 5.1-3). Da die Ketten deshalb wohl in Konkurrenz um die gleichen Bindungsplätze stehen, wirkt sich die Inkubation von SLN in Serum, bei ausbleibender Komplementaktivierung, offensichtlich in erster Linie in einer Zunahme der Adsorption von IgG aus.

Tab. 5.1-3: Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der Spots der Fibrinogen α -, Fibrinogen β - und IgG γ Kette (Haerberli, 1995)

	Fibrinogen α -Kette	Fibrinogen β -Kette	IgG γ Kette
MW	66.100	52.300	52.000
pI	6,7 – 7,3	6,0 – 6,9	6,3 – 8,2

Bei der Interpretation von 2-DE-Gelen, die aus der Inkubation von Partikeln in Serum resultieren, muss dies unbedingt berücksichtigt werden. Die dabei mögliche hohe Detektion von IgG bedarf deshalb immer der Überprüfung durch zusätzliche Inkubation der Partikel in Plasma, da dieses Medium die Konzentrationsverhältnisse der Proteine im Blut besser widerspiegelt. Nur so kann vermieden werden, dass (ähnlich wie bei der Verwendung des falschen Waschmediums) falsche Rückschlüsse aus dem bestimmten Adsorptionsmuster auf die Organverteilung geschlossen werden.

5.1.1.3 Isoelektrische Fokussierung mit IPG's: nichtlinearer vs. linearer Gradient

In den bisherigen 2-DE-Studien wurden routinemäßig immer IPG-Gelstreifen mit einem nichtlinearen Gradienten verwendet, bei denen der neutrale pH-Bereich, in dem sich die meisten Plasmaproteine wiederfinden, aufgeweitet und so besser aufgelöst ist.

Vor allem Lipidsysteme wie O/W-Emulsionen oder SLN weisen aber die Besonderheit auf, dass ihr Adsorptionsmuster große Mengen der kleinen Apolipoproteine (ApoC-III, ApoC-II, ApoA-II) enthalten, die außerhalb dieses aufgeweiteten Bereichs liegen. Diese drei Proteinspezies haben sehr ähnliche Positionen auf dem 2-D-Pherogramm (Tab. 5.1-4, vgl. Abb. 5.1-21) und werden zudem durch die Denaturierung bei der 2-DE in mehrere Ketten zerlegt, führen also jeweils zu mehreren Spots auf dem Gel (Lück et al., 1997).

Tab. 5.1-4: Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der Spots (S) von ApoC-III, -C-II und -A-II (Haeberli, 1995, Lück et al., 1997)

	ApoC-III	ApoC-II	ApoA-II
MW	S1: 9.980		
	S2: 9.250	S1: 7.250	S1: 10.530
	S3: 8.960	S2: 8.530	S2: 7.950
pI	S1: 4,50		
	S2: 4,80	S1: 4,82	S1: 5,00
	S3: 5,00	S2: 4,90	S2: 5,10

Wenn sich diese Proteine in großen Mengen auf der Partikeloberfläche anreichern, kommt es deshalb zu einem fließenden Übergang der Spots ineinander, wodurch es schwierig wird, die einzelnen Proteine richtig abzugrenzen und zu quantifizieren (vgl. Abb. 5.1-21). In Anbetracht der unterschiedlichen physiologischen Funktionen, vor allem von ApoC-III und ApoC-II, ist dies aber sehr wichtig. Dies soll im folgenden näher erläutert werden.

Im exogenen und endogenen Fettstoffwechsel werden die im wässrigen Milieu des Blutplasmas schwer löslichen Lipide (v. a. Triacylglycerole und Cholesterol(ester)) in eine geeignete Transportform überführt. Durch Assoziation mit Phospholipiden und Apolipoproteinen kommt es zur Bildung von wasserlöslichen Lipoproteinen unterschiedlicher Dichte und Partikelgröße (z. B. Chylomikronen 75 nm-1 µm, LDL-

Partikel 20 nm-22 nm) (Rimpler, 1999) (Abb. 5.1-20). Die Apolipoproteine zeigen ein typisches Verteilungsmuster auf die verschiedenen Lipoproteinklassen und befinden sich an der Oberfläche der Lipoproteine, da sie für die Erkennung der Partikel durch die Zielzellen von entscheidender Bedeutung sind (Abb. 5.1-20). Während des Aufenthalts im Blut findet ein Austausch von Apolipoproteinen zwischen den verschiedenen Lipoproteinklassen statt. So nehmen z. B. Chylomikronen Apolipoproteine der Gruppen C und E auf. Erst nach Abgabe von Apolipoprotein C bindet dann ApoE an den LDL-Rezeptor (Rimpler, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass von den Apolipoproteinen der Gruppe C nur ApoC-I und ApoC-II die Bindung von ApoE an den LDL-Rezeptor verhindern (Weisgraber et al., 1990). ApoC-III hat dagegen darauf keinen Einfluss.

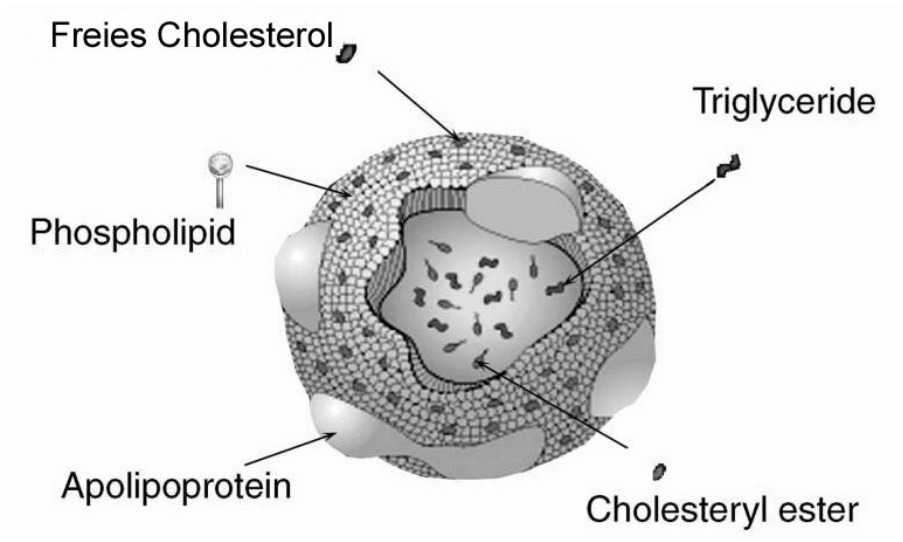


Abb. 5.1-20: Schematische Darstellung eines Lipoprotein-Partikels (Kostner, 2002).

ApoC-III wirkt außerdem inhibitorisch auf die Lipoproteinlipase (LPL) und hemmt damit die Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber bzw. in das periphere Gewebe (Aalto-Setälä et al., 1992, Rimpler, 1999). ApoC-III könnte deshalb an der geringen Aufnahme einiger oberflächenmodifizierter Trägersysteme durch das MPS beteiligt sein (Blunk, 1994). Dagegen ist ApoC-II ein potenter Aktivator der LPL (Rimpler, 1999), was deren Hemmung durch ApoC-III und der daraus eventuell resultierenden MPS-Umgehung entgegensteht.

Demnach ist für einen Arzneistoffcarrier, der an den LDL-Rezeptor der BHS binden soll, nicht nur die gebundene Menge ApoE, sondern auch die gebundene Menge ApoC-II entscheidend. Für die Analytik der Plasmaproteinadsorptionsmuster hat das die Konsequenz, dass es von großer Bedeutung ist, die adsorbierten Mengen an ApoC-III und ApoC-II genau zu unterscheiden. Deshalb wurden neben IPG's mit

nichtlinearen Gradienten auch solche mit linearen Gradienten eingesetzt, um eine genaue Differenzierung zwischen den „kleinen“ Apolipoproteinen zu ermöglichen (Abb. 5.1-21).

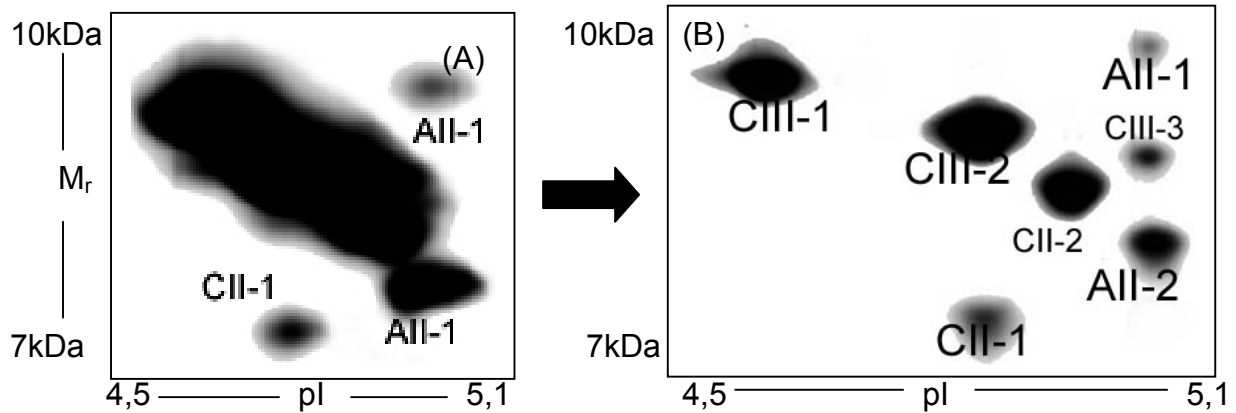


Abb. 5.1-21: Aufweitung des pH-Bereichs zwischen pH 4,5 und pH 5,1: (A) IPG's mit nichtlinearem pH-Gradienten weiten den neutralen pH-Bereich auf, was zu Lasten des (abgebildeten) sauren pH-Bereichs geht (B) IPG's mit linearem pH-Gradienten stauchen den sauren pH-Bereich nicht, deshalb kommt es auch bei großen Mengen ApoC-III, ApoC-II und ApoA-II zu einer klaren Trennung der einzelnen Spots: ApoC-III bestehend aus CIII-1, CIII-2 und CIII-3, ApoC-II bestehend aus CII-1 und CII-2 und ApoA-II bestehend aus AII-1 und AII-2.

Abb. 5.1-21 (A) zeigt die Schwierigkeit der Differenzierung der Spots bei entsprechend großen Mengen auf dem Gel. Während die beiden Spots von ApoA-II und ein Spot von ApoC-II noch relativ klar abgegrenzt sind, gehen alle Spots von ApoC-III mit einem von ApoC-II fließend ineinander über. Diese Schwierigkeit besteht nicht bei Verwendung von IPG's mit linearen pH-Gradienten (Abb. 5.1-21 (B)). Alle angesprochenen Spots sind auch bei größeren Mengen eindeutig voneinander getrennt und deshalb leicht zu differenzieren und zu quantifizieren.

Zu beachten ist, dass die Verwendung von IPG's mit linearen pH-Gradienten trotzdem nicht allgemein erfolgen kann, da die Aufweitung im sauren Bereich klar auf Kosten des neutralen pH-Bereichs geht, indem sich weitaus mehr Proteine wiederfinden (z. B. ApoE, ApoJ, ApoA-I, ApoA-IV oder Albumin), deren Bedeutung für das Gehirn-Targeting noch wichtiger ist. Deshalb sollte die Verwendung dieser Gel-Streifen nur eine Erweiterung der 2-DE-Methode zur Analytik von Apolipoproteinen darstellen.

5.1.1.4 Zusammenfassung und Fazit

Die Gelfiltration wurde als zuverlässige und universell einsetzbare Methode zur Abtrennung von SLN von überschüssigem Plasma etabliert. Da aber eine

Probenaufbereitung von Cetylpalmitat-SLN auch mit Hilfe der schnelleren und preiswerteren Zentrifugation möglich war, wurden die grundlegenden 2-DE-Studien mit derartigen SLN durchgeführt. Vor den eigentlichen Untersuchungen der Adsorptionsmuster unterschiedlicher SLN wurden die optimalen Parameter der Probenaufbereitung bestimmt. Dabei lieferten drei Waschschrte mit einem 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 2-DE-Gele, die weder artifiziell adsorbierte Proteine noch Proteine aus restlichem Plasma enthielten. Die Inkubation von SLN in Plasmen unterschiedlicher (gesunder) Spender hatte ebenso wenig einen Einfluss auf die resultierenden Proteinmuster, wie die unterschiedliche Stabilisation der Plasmen mit Natriumcitrat bzw. Natrium-EDTA. Auch die Inkubation in über vier Monate bei -70°C eingefrorenem Plasma lieferte im Vergleich zum Frischplasma qualitativ und quantitativ gleichwertige Gele. Obwohl die Inkubation in Citrat-stabilisiertem Plasma im Gegensatz zur Inkubation in Serum keine Erkennung einer Aktivierung des Komplementsystems zulässt, wurde Plasma für Routinestudien mit SLN vorgezogen, da Fibrinogen auf einigen Formulierungen in großen Mengen adsorbierte. Das Ziel war den tatsächlichen Verhältnissen *in vivo* auf diese Weise möglichst nahe zu kommen. Zusätzlich wurden jedoch auch ausgewählte SLN-Formulierungen in Serum inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass keine Aktivierung des Komplementsystems stattfindet. Des weiteren wurde festgestellt, dass die Verwendung von IPG-Strips mit linearem Gradienten in der ersten Dimension der 2-DE eine gute Alternative zu denen mit nichtlinearem Gradienten ist, um die adsorbierten Mengen von ApoC-III, ApoC-II und ApoA-II zu differenzieren.

5.1.2 Einfluss des Tensids auf die Adsorptionsmuster

In zahlreichen Studien wurde bereits versucht, durch Modifikation der Oberflächeneigenschaften des Adsorbens die Proteinadsorption zu beeinflussen (Lee et al., 1989, Cook und Retzinger, 1992, Moghimi et al., 1993, Tan et al., 1993, Vadorpe et al., 1997, Peracchia et al., 1999). Mit Hilfe der 2-DE-Analytik genau charakterisierter Modell-Polymerpartikeln gelang es, Korrelationen der Proteinadsorption mit den neu erworbenen Oberflächeneigenschaften festzustellen und davon erste Gesetzmäßigkeiten abzuleiten (Blunk et al., 1993, Lück et al., 1998a, Gessner et al., 2000, Gref et al., 2000, Gessner et al., 2002). Besonderes Interesse erlangte dabei das Polyethylenglykol (Polyoxyethylen) (PEG bzw. POE), das aufgrund seiner allgemein akzeptierten niedrigen Proteinadsorption (Jeon und

Andrade, 1991, Jeon et al., 1991) auf verschiedene Weisen zur Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln und Liposomen verwendet wurde (Allen et al., 1991, Gref et al., 1994, Verrecchia et al., 1995, Zalipsky et al., 1996). Poloxamer 188 und Polysorbat 80 sind POE-enthaltende Tenside, die gleichzeitig für den parenteralen Gebrauch zugelassen sind. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit in erster Linie Tenside aus den Gruppen der Block-Copolymere und Polysorbate zur Oberflächenmodifikation von SLN ausgewählt. Darüber hinaus kamen weitere, vor allem nichtionische (z. B. Cremophor) bzw. parenteral gut verträgliche Tenside (z. B. Lecithin) zum Einsatz. Es sollten die Auswirkungen der unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen auf die Proteinadsorption auf SLN untersucht und mit den zuvor bei anderen Systemen beobachteten Korrelationen verglichen werden.

5.1.2.1 Block-Copolymere

Ein wesentlicher Beweggrund für die Entwicklung einer Analytik von adsorbierten Plasmaproteinen auf potentiellen Arzneistoffträgern waren zwei *In-vivo*-Studien Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts, in denen mit Block-Copolymeren modifizierte 60 nm Polystyrol-Partikel ein unterschiedliches Verhalten zeigten: Im Kaninchenmodell wurde mit Partikeln, überzogen mit Poloxamine 908 (PS 60-908), eine Zirkulation im Blutkreislauf erreicht (Illum et al., 1987), während mit Poloxamer 407 überzogene Partikel (PS 60-407) eine verstärkte Aufnahme ins Knochenmark zeigten (Illum und Davis, 1987). Als Mechanismus wurde hierfür die Aufnahme und folgende Akkumulation der Partikel in Endothelzellen der Sinusoide (= weite Kapillargefäße) beschrieben (Porter et al., 1992, Moghimi, 1995b). Selbst durch intensive physikochemische Charakterisierung konnten keine relevanten Unterschiede gefunden werden, die das *In-vivo*-Verhalten der beiden ähnlichen Modellpartikel plausibel erklärt hätten (Müller, 1991). Das gleiche *In-vivo*-Verhalten wurde später noch mal mit PS 60-908 im Rattenversuch (Moghimi, 1999) bzw. im Mausmodell mit Poloxamer 407-oberflächenmodifizierten PLGA-Partikeln (Park et al., 2003) festgestellt.

In Anlehnung an das Konzept der „Differenzierenden Adsorption“ wurde die Hypothese aufgestellt, dass die geringfügigen Unterschiede der Oberflächeneigenschaften zu unterschiedlichen Adsorptionsmustern führen, die ihrerseits das *In-vivo*-Verhalten entscheidend beeinflussen können. Deshalb wurde kurze Zeit später die 2-D PAGE als Methode zur Bestimmung der Plasmaproteinadsorption entwickelt, um die Adsorptionsmuster auf den entsprechenden Partikeln zu analysieren und

durch mögliche Unterschiede einen Ansatz zur Erklärung des Phänomens zu erhalten (Blunk, 1994). Für beide Partikel wurde eine alleinige Adsorption von Apolipoproteinen detektiert. Während auf PS 60-908 ApoC-III dominierte (32,1% vs. 19,8% auf PS 60-407) und ebenfalls eine größere Menge ApoJ detektiert wurde (12,5% vs. 1,0%), dominierte auf PS 60-407 ApoA-IV (45,7% vs. 17,8% auf PS 60-908), und es wurde eine größere Menge ApoE verzeichnet (3,8% vs. 0,4%). Unter Einbeziehung der in Kapitel 5.1.1.3 beschriebenen physiologischen Funktion von ApoC-III als Inhibitor der LPL, ergaben sich so erste Hinweise darauf, dass die Adsorption von ApoC-III möglicherweise für eine Umgehung des MPS verantwortlich sein könnte (Blunk, 1994).

Ein weiteres sehr interessantes Tensid aus der Reihe der Block-Copolymere ist Poloxamer 235. *In-vitro*-Studien an bovinen, zerebralen Endothelzellen konnten zeigen, dass Poloxamer 235 die Effluxpumpe P-gp hemmt (Miller et al., 1997) und deshalb in der Lage ist den Transport von P-gp-Substraten wie z. B. Doxorubicin durch diese Zellen zu erhöhen (Batrakova et al., 1999). Als pharmazeutische Hilfsstoffe sollten Tenside eigentlich pharmakologisch inert sein. Im Hinblick auf ein angestrebtes Gehirn-Targeting wäre eine solche Wirkung aber von großem Vorteil, da hierdurch die Aufnahmeeffizienz erheblich gesteigert werden könnte (vgl. „Codrugs“ Kapitel 2.1.3.2 Pharmakologische Strategien).

In der folgenden Studie wurden Cetylpalmitat-SLN mit acht verschiedenen Block-Copolymeren - in Anlehnung an die von Blunk (1994) untersuchte Tensid-Reihe - hergestellt und ihre Proteinadsorptionsmuster bestimmt. Tab. 5.1-5 listet die Kennzahlen der verwendeten Block-Copolymere auf.

Tab. 5.1-5: Kennzahlen der verwendeten Block-Copolymere (n = Anzahl Ethylenoxid (EO)-Einheiten, m = Anzahl Propylenoxid (PO)-Einheiten) und gemessene Schichtdicken der Polymerüberzüge auf 60 nm großen Polystyrol-Partikeln (Müller, 1991). P = Poloxamer, 908 = Poloxamine 908

	P184	P235	P237	P188	P238	P407	908	P338
MW	2.900	4.600	7.700	8.350	10.800	11.500	25.000	14.000
n	13	27	62	75	97	98	121	128
m	30	39	35	30	39	67	16	54
n/m	0,43	0,69	1,77	2,5	2,49	1,46	7,56	2,37
Schichtdicke [nm]	2,4	3,5	8,0	7,6	13,2	11,9	14,4	15,4

Die Zusammensetzung und physikochemische Charakterisierung der SLN findet sich in Tab. 5.1-6. Die mittleren Partikeldurchmesser lagen alle im Bereich von 220-280 nm und auch die Partikelgrößenverteilungen der einzelnen Formulierungen waren relativ ähnlich. Obwohl bei den Adsorptionsstudien die Partikelgrößen stets in den Berechnungen berücksichtigt werden, um bei allen Proben eine gleich große Oberfläche zu inkubieren, ist eine ähnliche Partikelgröße trotzdem wichtig, damit der Einfluss der Oberflächenkrümmung auf die Polymeradsorption bzw. auf die resultierende Proteinadsorption möglichst gering gehalten wird (Blunk, 1994).

Tab. 5.1-6. Zusammensetzung, Größencharakteristik (LD und PCS) und ZP der untersuchten SLN. P = Poloxamer, 908 = Poloxamine 908

	10% Cetylpalmitat, 1,2% X							
	X=P184 P184- SLN	X=P235 P235- SLN	X=P237 P237- SLN	X=P188 P188- SLN	X=P238 P238- SLN	X=P407 P407- SLN	X=P338 P338- SLN	X=908 908- SLN
D50% [μm]	0,199	0,280	0,327	0,327	0,350	0,323	0,331	0,332
D90% [μm]	0,386	0,458	0,509	0,522	0,548	0,529	0,531	0,533
D95% [μm]	0,435	0,512	0,563	0,581	0,611	0,590	0,590	0,591
D99% [μm]	0,538	0,613	0,660	0,694	0,719	0,707	0,703	0,702
PCS [nm]	219 \pm 4	237 \pm 3	263 \pm 4	259 \pm 5	264 \pm 4	256 \pm 4	286 \pm 4	255 \pm 4
PI	0,082	0,072	0,101	0,078	0,108	0,131	0,167	0,157
ZP [mV]	-38,9	-28,8	-21,5	-23,8	-23,6	-19,4	-15,9	-11,9

Das höchste ZP mit -38,9 mV hatten P184-SLN. In Übereinstimmung mit der Theorie wurden die ZP mit steigendem MW der Polymere immer kleiner (Müller, 1991), das geringste ZP hatten 908-SLN (-11,9 mV). Die Erklärung hierfür ist die mit zunehmendem MW dicker werdende Schicht der adsorbierten Polymere (vgl. Tab. 5.1-5), wodurch sich die Scherebene immer weiter von der Partikeloberfläche entfernt. Da das ZP der jeweiligen SLN so von den Eigenschaften der einzelnen Polymere abhängt, ist es nicht möglich, eine solche SLN-Reihe mit gleichem ZP herzustellen. Die Oberflächenladung hat aber einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinadsorption (Gessner et al., 2002). Die Hauptunterschiede wurden beim Vergleich von positiv und negativ geladenen Polymerpartikeln gefunden. Partikel mit positiv geladener Oberfläche adsorbierten hauptsächlich Proteine mit $pI < 5,5$ (z. B. Haptoglobin β Kette, Albumin und $\alpha 1$ -Antitrypsin), während solche mit negativer

Ladung hauptsächlich Proteine mit $pI > 5,5$ adsorbierten (z. B. IgG und ApoH) (Gessner, 2001). Da die ZP der untersuchten SLN zumindest alle negativ waren, ist ein derartig großer Einfluss der Ladungen auf die resultierenden Proteinmuster nicht zu erwarten. Es muss dennoch berücksichtigt werden, dass die Adsorptionsmuster der hier untersuchten SLN wohl nicht nur durch die jeweiligen Polymere, sondern auch durch die Oberflächenladung der Partikel beeinflusst werden.

Vor Betrachtung der resultierenden Proteinadsorptionsmuster waren einige Vorüberlegungen zur Struktur der adsorbierten Block-Copolymere notwendig, da neben der POE-Kettenlänge auch Informationen über die Oberflächendichte und Konformationen der Polymerketten nach der Adsorption wichtig waren.

Die Adsorption der Poloxamere geschieht zunächst aufgrund von Van-der-Waals-Kräften zwischen dem hydrophoben Teil des Tensids (POP) und der Partikeloberfläche (exotherm). Letztendlich ausschlaggebend für die Adsorption ist aber die danach stattfindende Wechselwirkung zwischen den Tensidmolekülen, die zwar eine endotherme Phase darstellt, jedoch wird sie durch den Entropiegewinn der Wassermoleküle bei Dehydratation der Tenside zur treibenden Kraft (Wesemeyer et al., 1993). Abb. 5.1-22 veranschaulicht das Prinzip der sterischen Stabilisierung durch Block-Copolymere. Es entsteht eine mechanische Barriere von mehreren Nanometern Dicke (vgl. Tab. 5.1-5).

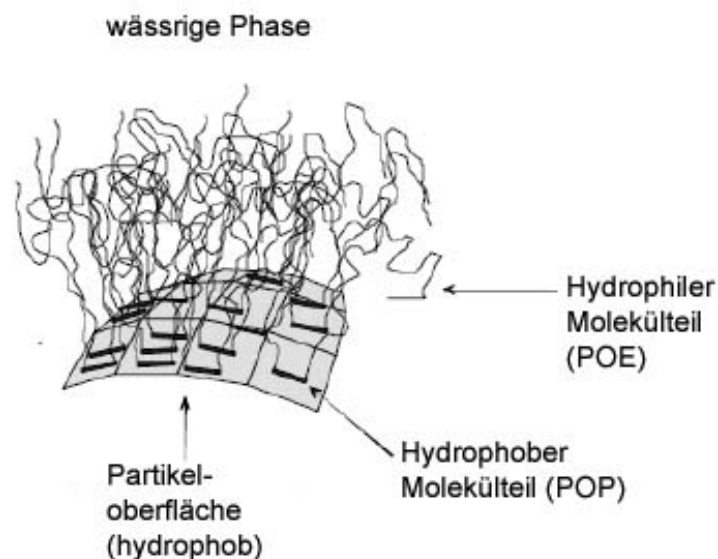


Abb. 5.1-22: Prinzip der sterischen Stabilisierung. Block-Copolymere adsorbieren mit dem zentralen, hydrophoben Molekülteil auf der Partikeloberfläche, die terminalen, hydrophilen Molekülteile ragen in das Dispersionsmedium hinein (Tadros und Vincent, 1980).

Die Konformation der adsorbierten Polymere auf der Partikeloberfläche ist für den stabilisierenden Effekt, d. h. für die physikalische Stabilität der Dispersion, von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus bestimmt die Konformation der Polymere, durch unterschiedliche Exposition der hydrophilen POE-Ketten bzw. hydrophoben POP-Ketten und der daraus resultierenden sterischen Abschirmung der Oberfläche, die Plasmaproteinadsorptionsmuster auf den Partikeln. Lee und Andrade (1988) entwickelten auf der Basis ihrer experimentellen Untersuchungen ein Modell der Konformationen unterschiedlich adsorbierter Block-Copolymere auf einem hydrophoben Substrat. Bei geringer Tensidkonzentration liegen die POE-Ketten relativ flach auf der hydrophoben Oberfläche. Steigt die Konzentration an, so werden sie jedoch von den POP-Ketten der Nachbarmoleküle verdrängt und ragen deshalb ins Dispersionsmedium hinein („Tail“, Abb. 5.1-23). Dabei sind die POE-Ketten jedoch nicht vollständig ausgestreckt, so dass bei steigender POE-Kettenlänge ein erhöhter Platzbedarf resultiert, der mit einer geringeren Menge adsorbierter Poloxamer-Moleküle pro Flächeneinheit einhergeht.

Bei weiterer Verringerung des Platzangebotes (durch Verlängerung der POP-Kettenlänge bzw. durch Erhöhung der Tensidkonzentration) beginnt sich die POP-Struktur auf der Oberfläche aufgrund verstärkter Kohäsionskräfte, d. h. zunehmend hydrophober Interaktion zwischen den seitlichen Methylgruppen, zu knäueln („Loop“). Insgesamt resultiert so bei steigender Tensidkonzentration die in Abb. 5.1-23 dargestellte „Loop-Tail-Konformation“ mit einem verringerten Raumbedarf des Moleküls an der Oberfläche (Göppert und Müller, 2005c).

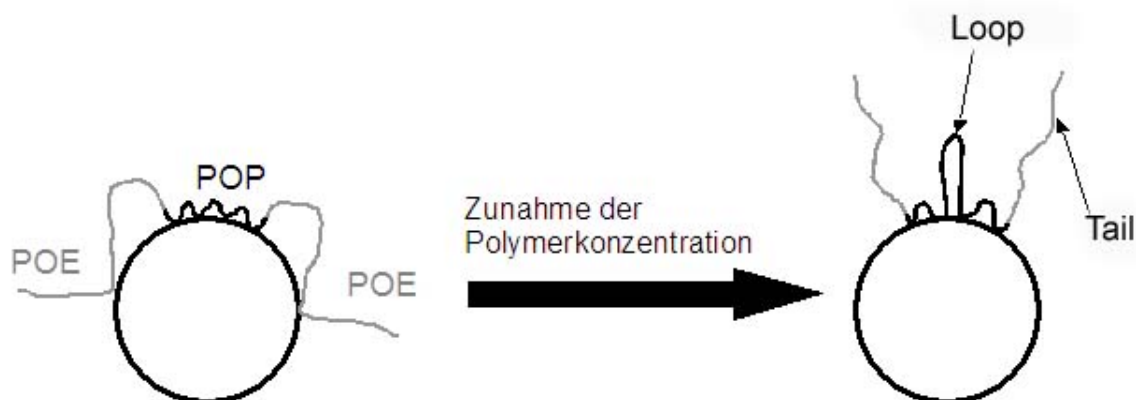


Abb. 5.1-23: Vereinfachte Darstellung der Konformationen von adsorbiertem Poloxamer in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration (Göppert und Müller, 2005c).

In verschiedenen Studien mit POE-oberflächenmodifizierten Polymerpartikeln wurde die Reduktion der Proteinadsorption in Abhängigkeit von der POE-Kettenlänge bzw.

der Oberflächendichte untersucht (Carignano und Szleifer, 2000, Gref et al., 2000, Gessner et al., im Druck 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmaproteinadsorption von beiden Faktoren abhängt. Eine maximale Reduktion der Proteinadsorption wurde bei PLA-Partikeln mit POE mit einem MW von 5.000 erreicht (Gref et al., 2000). Im Gegensatz zur Gesamtmenge adsorbierter Proteine war die qualitative Zusammensetzung der Adsorptionsmuster jedoch relativ unabhängig von der Kettenlänge bzw. der Oberflächendichte, was darauf schließen ließ, dass die Proteine hier vornehmlich auf der mehr oder weniger stark abgeschirmten Partikeloberfläche adsorbierten. Gessner et al. (im Druck 2005) untersuchten den Einfluss von sehr kurzen POE-Ketten (MW 200 bzw. 400) bei hoher Oberflächendichte (0,39-0,31 nm). Trotz der Zunahme der Oberflächendichte konnte keine signifikante Abnahme der adsorbierten Proteingesamtmenge festgestellt werden. Eine Adsorptionsreduktion wurde nur bei den Proteinen mit geringem MW (ApoA-I, ApoA-IV und ApoJ) verzeichnet (z. B. bei ApoJ ein Rückgang um 80% bei Verringerung des Kettenabstandes von 0,39 nm auf 0,33 nm). Trotz der hohen Kettendichte adsorbierten andere Proteine mit MW > 50.000 wie z. B. Albumin oder Fibrinogen auf allen Partikel in gleich großer Menge. Offensichtlich war ein Minimum der Proteinadsorption bereits bei einer Kettenlänge von 200 und einem Abstand von 0,39 nm erreicht. Dies legte die Vermutung nahe, dass im Falle hoher Kettendichte manche Proteine auch auf den POE-Ketten adsorbieren, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Carignano und Szleifer wäre (2000). Dies wurde durch die Beobachtung gestützt, dass z. B. IgG auf allen POE-400 Partikeln stärker adsorbierte als auf den entsprechenden POE-200 Partikeln (Gessner et al., im Druck 2005), was dadurch erklärt werden kann, dass die längere POE-400-Kette mehr Bindungsstellen anbietet.

Bei der Untersuchung von Polymerpartikeln kann die Dicke der Adsorptionsschicht der Block-Copolymere leicht durch Messung der Partikelgrößen mittels PCS vor und nach der Modifizierung ermittelt und daraus Rückschlüsse auf die entsprechende Konformation gezogen werden (Müller und Müller, 1984) (vgl. Tab. 5.1-5 gemessene Schichtdicken auf 60 nm Polystyrol-Partikeln). Diese Methode zur Bestimmung der Schichtdicke der Polymerüberzüge ist auf SLN nicht übertragbar, da entsprechende, tensidfreie SLN nicht herstellbar sind. Sie würden gleich nach der Produktion aggregieren.

Die Messung des Kontaktwinkels ist eine Möglichkeit zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobie (Tröster und Kreuter, 1988). Da die Oberflächenhydrophobie ein Parameter ist, der die Schichtdicke der Polymerüberzüge beeinflusst und ein genaueres Verfahren zur Untersuchung von Nanostrukturen, wie z. B. die Neutronen-Klein-Winkel-Streuung (small-angle neutron scattering, SANS) nicht zur Verfügung stand, erfolgte eine Abschätzung der Schichtdicken über einen Vergleich der Kontaktwinkel auf den entsprechenden Matrixmaterialien. Der Kontaktwinkel von Wasser auf einer glatten Cetylpalmitat-Oberfläche betrug $87,8^\circ (\pm 2,5^\circ)$. Da dieser Wert im Bereich des Kontaktwinkels auf Polystyrol lag ($89,7^\circ$ (Galazka et al., 1987)), wurde von ähnlich ausgeprägter Oberflächenhydrophobie und ähnlichen Schichtdicken ausgegangen (vgl. Tab. 5.1-5). Da zudem die in dieser Studie zur SLN-Stabilisierung verwendete Tensidkonzentration relativ hoch war (1,2%, d. h. bei den meisten Poloxameren mehr als dreißigmal höher als die entsprechende kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)), kann angenommen werden, dass bei allen Formulierungen eine kompakte „Loop-Tail-Konformation“ der Polymere an der Oberfläche der SLN vorlag.

Abb. 5.1-24 zeigt die Adsorptionsmuster auf den SLN, die mit Polymeren mit einem $MW < 10.000$ stabilisiert wurden und Abb. 5.1-25 entsprechend diejenigen mit einem $MW > 10.000$.

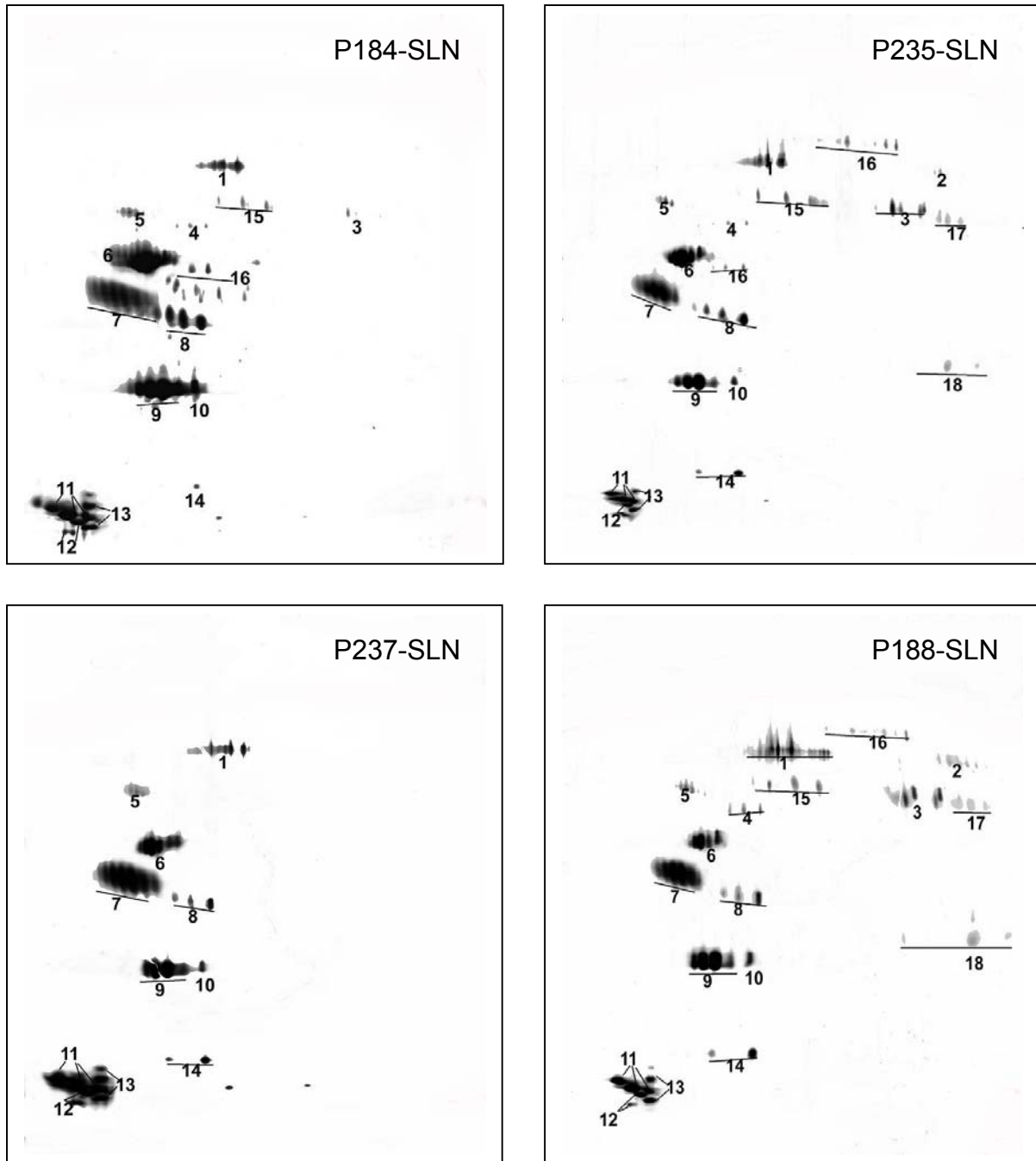


Abb. 5.1-24: Proteinadsorptionsmuster auf mit Block-Copolymeren (MW < 10.000) stabilisierten SLN. (1) Albumin, (2) Fibrinogen α Kette, (3) Fibrinogen β Kette, (4) Fibrinogen γ Kette, (5) α 1-Antitrypsin, (6) **ApoA-IV**, (7) ApoJ, (8) **ApoE**, (9) ApoA-I, (10) ProapoA-I, (11) ApoC-III, (12) ApoC-II, (13) ApoA-II, (14) Transthyretin, (15) ApoH, (16) IgM μ Kette, (17) IgG γ Kette, (18) Ig leichte Ketten.

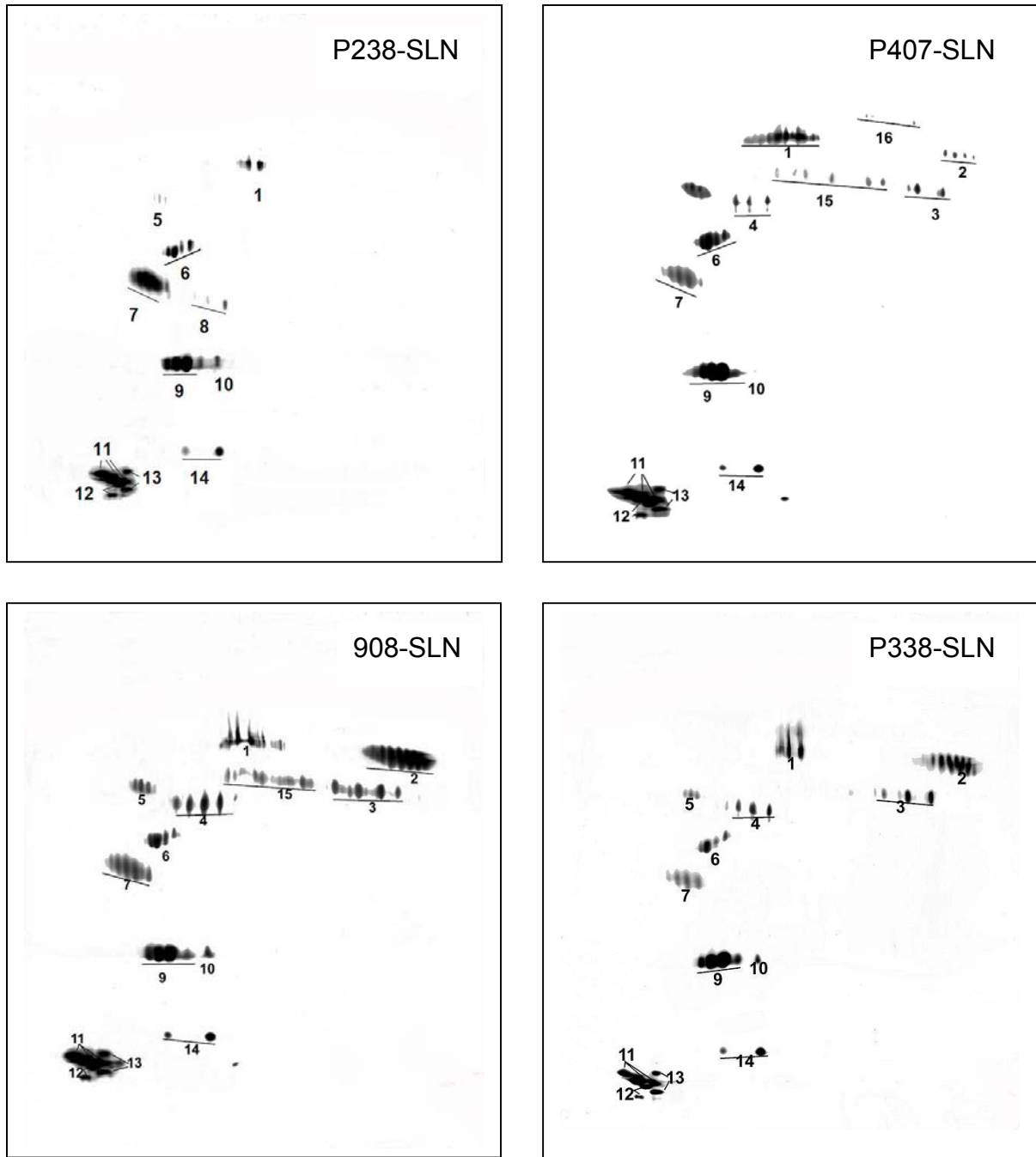


Abb. 5.1-25: Proteinadsorptionsmuster auf mit Block-Copolymeren (MW > 10.000) stabilisierten SLN. (1) Albumin, (2) Fibrinogen α Kette, (3) Fibrinogen β Kette, (4) Fibrinogen γ Kette, (5) α 1-Antitrypsin, (6) **ApoA-IV**, (7) ApoJ, (8) **ApoE**, (9) ApoA-I, (10) ProapoA-I, (11) ApoC-III, (12) ApoC-II, (13) ApoA-II, (14) Transthyretin, (15) ApoH, (16) IgM μ Kette.

Bei qualitativer Betrachtung zeigten sich die Gele untereinander relativ ähnlich. Bei genauerer Betrachtung – v. a. in dieser Anordnung abfallender POE-Kettenlänge - fiel jedoch auf, dass die detektierten Mengen der Spots von ApoE immer geringer wurden und ab P407-SLN (98 EO-Einheiten) schließlich (fast) ganz verschwanden. Die semiquantitative Auswertung bestätigte diesen Eindruck (Tab. 5.1-7).

Tab. 5.1-7: Adsorbierte Hauptproteine auf den mit Block-Copolymeren stabilisierten SLN (prozentuale Anteile an der Gesamtproteinmenge, n = 3). Alle Proteine wurden aufgenommen, deren Anteil an der detektierten Gesamtmenge mehr als 5% auf mindestens einem 2-DE-Gel betrug

	P184- SLN	P235- SLN	P237- SLN	P188- SLN	P238- SLN	P407- SLN	908-SLN	P338- SLN
n	13	27	62	75	97	98	121	128
Albumin	3,4 ± 1,2	7,3 ± 0,7	4,6 ± 0,7	5,5 ± 0,6	9,5 ± 2,2	8,8 ± 1,0	7,2 ± 2,0	8,4 ± 1,5
ApoE	10,6 ± 0,6	6,5 ± 0,4	2,8 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,7	0,3 ± 0,4	0,1 ± 0,1
ApoC-II	6,0 ± 0,7	2,6 ± 0,7	7,8 ± 0,8	6,1 ± 0,5	7,0 ± 0,5	4,7 ± 0,5	3,9 ± 0,5	7,1 ± 4,0
ApoA-IV	22,3 ± 3,3	18,8 ± 1,1	12,7 ± 1,0	10,7 ± 0,4	10,0 ± 0,4	12,4 ± 0,3	6,9 ± 1,7	9,1 ± 2,1
ApoJ	16,3 ± 1,9	22,8 ± 2,0	28,3 ± 5,5	22,1 ± 3,6	25,4 ± 2,6	16,7 ± 2,3	11,7 ± 0,9	14,7 ± 3,4
ApoA-I	17,4 ± 0,6	15,2 ± 0,1	15,3 ± 0,6	19,5 ± 1,1	18,7 ± 2,2	18,6 ± 0,8	11,6 ± 2,1	19,9 ± 2,8
ApoC-III	10,0 ± 2,6	7,0 ± 2,6	13,3 ± 0,8	13,1 ± 2,5	13,7 ± 0,3	13,9 ± 2,4	7,0 ± 0,8	11,9 ± 2,9
ApoA-II	3,7 ± 0,9	3,0 ± 0,7	7,2 ± 0,1	5,7 ± 2,5	6,0 ± 0,8	5,3 ± 0,8	3,5 ± 0,9	5,3 ± 1,4
Fibrinogen	0,6 ± 0,4	3,8 ± 1,7	1,9 ± 1,7	2,6 ± 1,3	0,5 ± 0,3	9,0 ± 3,2	35,6 ± 5,8	15,5 ± 4,9

Um dieses Phänomen graphisch zu verdeutlichen, wurden in Abb. 5.1-26 die relativen Mengen ApoE als Funktion der EO-Einheiten dargestellt. Es ergab sich ein annähernd exponentieller Zusammenhang mit der höchsten ApoE-Adsorption auf P184-SLN bzw. P235-SLN. Sehr interessant war dabei der Vergleich mit den in früheren Studien bestimmten Werten von adsorbiertem ApoE auf mit Block-Copolymeren modifizierten O/W-Emulsionen in Abhängigkeit der EO-Einheiten (Blunk, 1994). Auch wenn die Unterschiede da nicht ganz so ausgeprägt waren, zeigte sich dennoch der gleiche Zusammenhang (Abb. 5.1-26). Interessanterweise wurde bei entsprechend oberflächenmodifizierten Polystyrol-Partikeln dies nicht festgestellt (Blunk, 1994).

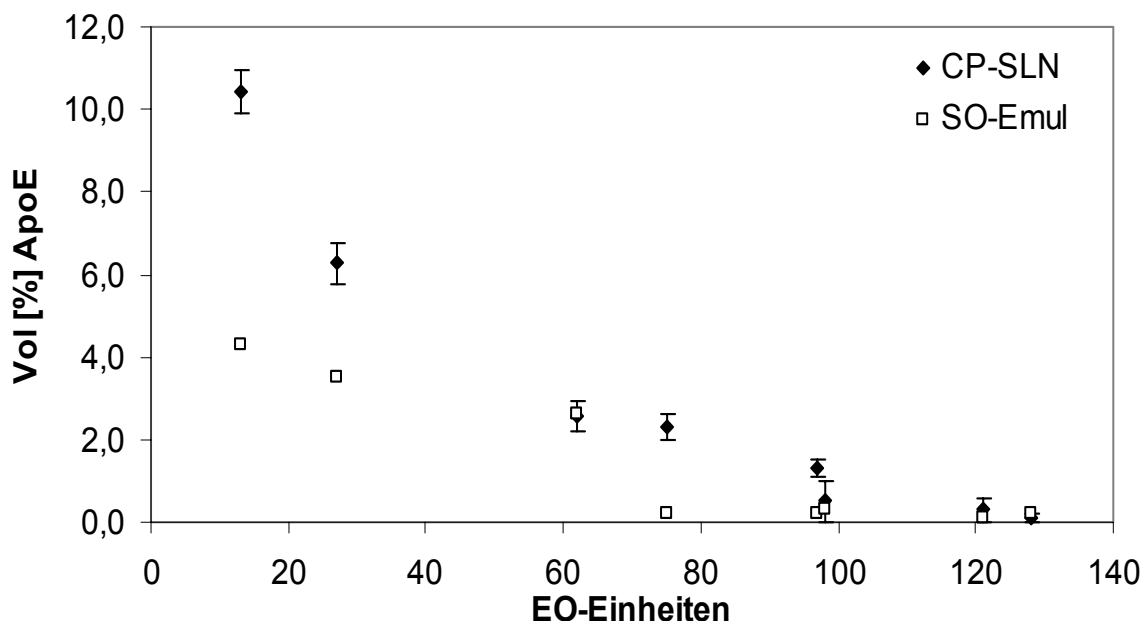


Abb. 5.1-26: Relative Mengen an adsorbiertem ApoE auf Cetylpalmitat-SLN (CP-SLN) bzw. Sojaöl O/W-Emulsionen (SO-Emul) in Abhängigkeit von der POE-Kettenlänge der verwendeten Block-Copolymere. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$). Keine Fehlerbalken bedeutet $n = 1$ (diese Werte wurden von Blunk (1994) bestimmt).

Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf das angestrebte Gehirn-Targeting besonders interessant, denn wie bereits mehrfach erwähnt, kommt ApoE die Schlüsselrolle bei der Überwindung der BHS zu.

Neben der präferentiellen Adsorption einzelner Proteine könnten auch die Mengenverhältnisse zweier oder mehrerer Proteine zueinander für das Verhalten der Partikel *in vivo* relevant sein (Aalto-Setälä et al., 1992). So wurde im vorherigen Kapitel beschrieben, dass ApoC-II wohl als „Gegenspieler“ von ApoE am LDL-Rezeptor wirkt (Weisgraber et al., 1990). Da auch gezeigt wurde, dass die Affinität der Lipoprotein-Partikel zum Rezeptor umso höher ist, je mehr ApoE-Moleküle auf dem Partikel vorhanden sind (vgl. Kapitel 2.4.2) (Weisgraber, 1994), wäre aus dieser Sicht eine möglichst hohe Adsorption von ApoE bei möglichst geringer Adsorption von ApoC-II von Vorteil, um die BHS mittels des LDL-Rezeptor zu überwinden. Deshalb wurden die Quotienten aus den relativen Mengen ApoE zu ApoC-II gebildet und diese als Funktion der EO-Einheiten dargestellt (Abb. 5.1-27). Dabei ergab sich ein ähnliches Bild wie in Abb. 5.1-26, wobei hier der höchste Wert nicht für P184-SLN bestimmt wurde, sondern – aufgrund der geringeren Menge an ApoC-II – für P235-SLN. In Verbindung mit der einleitend beschriebenen Funktion dieses Tensids als

P-gp-Hemmer (Batrakova et al., 1999), führen diese Werte zu dem Schluss, dass den P235-SLN in dieser Reihe wohl das größte Potential zur Überwindung der BHS zugeordnet werden kann (Göppert und Müller, 2005c).

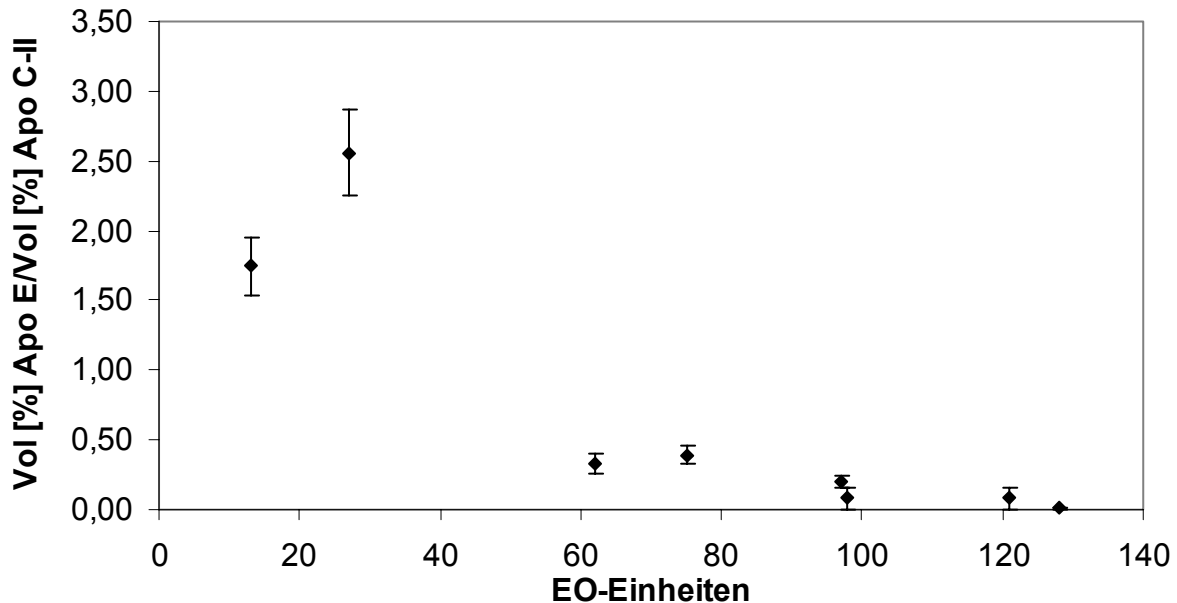


Abb. 5.1-27: Mengenverhältnis von adsorbiertem ApoE zu ApoC-II in Abhängigkeit der POE-Kettenlänge der verwendeten Block-Copolymere, $n = 3$.

Die relativen Mengen der anderen, auf diesen SLN adsorbierten Apolipoproteine wurden ebenfalls als Funktion der POE-Kettenlänge dargestellt, um zu klären, ob ein ähnlicher Zusammenhang wie bei ApoE bestand. In Abb. 5.1-28 ist dies für ApoA-IV und ApoJ dargestellt. Im Falle von ApoA-IV wurde eine ähnliche Korrelation festgestellt wie bei ApoE. Der Abfall mit steigender Kettenlänge war dabei aber nicht exponentiell, sondern annähernd linear. Bemerkenswert ist hierbei, dass ApoA-IV und ApoE ähnliche Koordinaten auf dem 2-D-Pherogramm haben (Tab. 5.1-8), d. h. beide Proteine haben einen ähnlichen Raumbedarf und sind ähnlich geladen, was eine Erklärung für die ähnliche Abhängigkeit der Adsorption von der POE-Kettenlänge sein könnte. Aufgrund der in Kapitel 2.4 beschriebenen Eigenschaften erscheint es nämlich sehr unwahrscheinlich, dass die Apolipoproteine außen an den POE-Ketten adsorbieren, da dort kaum Möglichkeiten der hydrophoben Interaktion für die apolaren Helices gegeben sind. Viel eher denkbar ist die Interaktion mit dem darunter liegenden Cetylpalmitat, zumal auch in früheren Studien die Bindung von Apolipoproteinen an hydrophobe Substrate (z. B. PVC, silikonisiertes Glas oder Polystyrol) beschrieben wurde (Breemhaar et al., 1984, Shen, 1985, Blunk et al.,

1993). Auffällig war die etwa zwei- bis zehnfach höhere Menge an adsorbiertem ApoA-IV, was aber – gleiche Affinität zur Oberfläche vorausgesetzt – durch die etwa viermal höhere Konzentration von ApoA-IV im Plasma erklärt werden könnte.

Tab. 5.1-8: Molekulargewichte, isoelektrische Punkte und Plasmakonzentrationen von ApoA-IV, ApoE und ApoJ (Haeberli, 1995)

	ApoA-IV	ApoE	ApoJ (Clusterin)
MW	46.000	34.200	35.000-40.000
pl	5,1-5,2	5,4-6,1	4,9-5,4
Konz. in Humanplasma [mg/100ml]	16-20	3-6	3,5-10,5

Interessant ist diese Korrelation im Zusammenhang mit ApoA-IV auch deshalb, weil in einer *In-vitro*-Studie gezeigt werden konnte, dass die zusätzliche Adsorption von ApoA-IV und ApoA-I auf ApoE-haltigen Liposomen die Leberaufnahme reduzierte (Bisgaier et al., 1989). Diese Apolipoproteine bewirkten offensichtlich eine Modulation der Aufnahme durch die Hepatozyten. Auch wenn die Expression des LDL-Rezeptors am Gehirnkapillarendothel stärker ist (Dehouck et al., 1994), so stellt doch die

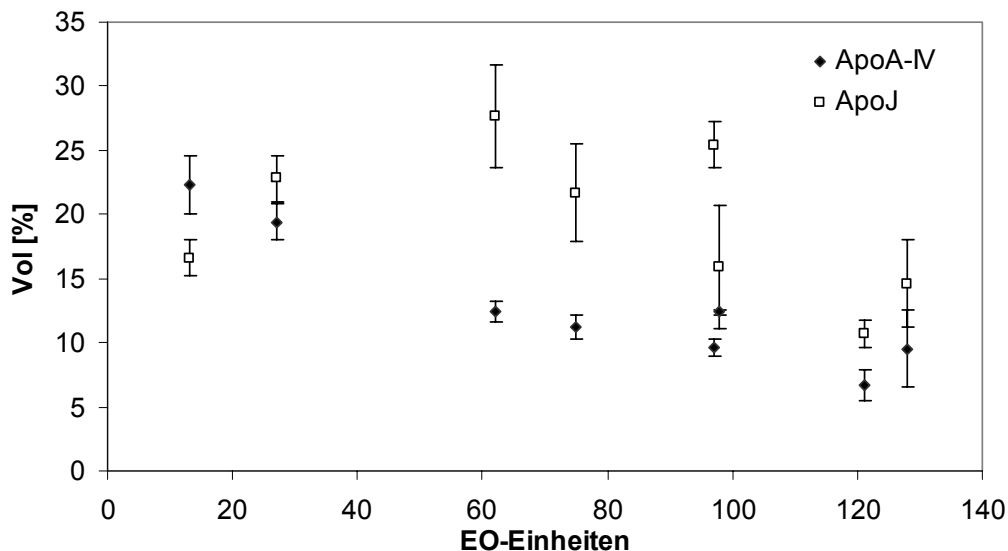


Abb. 5.1-28: Relative Mengen an adsorbiertem ApoA-IV und ApoJ auf Cetylpalmitat-SLN in Abhängigkeit von der POE-Kettenlänge der eingesetzten Block-Copolymere (n = 3).

Leber das Organ mit der höchsten Dichte an Rezeptoren, die ApoE als Liganden erkennen und so die Aufnahme von Lipoproteinen vermitteln (Brown und Goldstein, 1986). Eine verstärkte Adsorption von ApoE auf partikulären Oberflächen sollte dementsprechend auch primär eine verstärkte Aufnahme in die Leber zur Folge

haben. Deshalb wäre eine erhöhte Adsorption von ApoA-IV und ApoA-I von Vorteil, denn möglicherweise wird erst durch das Zusammenspiel dieser Proteine mit ApoE die Voraussetzung dafür geschaffen, dass eine ausreichend große Anzahl von arzneistoffbeladenen SLN die BHS überhaupt erreichen kann (Gessner et al., 2001).

Gegen die Theorie, eines allein durch die sterische Hinderung bzw. durch das Platzangebot bestimmtes Adsorptionsverhalten der (Apolipo)proteine auf der Oberfläche von mit Block-Copolymeren stabilisierten SLN sprach z. B. das festgestellte Adsorptionsverhalten von ApoJ (Abb. 5.1-28). Obwohl ApoJ ähnliche Koordinaten auf dem 2-DE-Gel hat wie ApoE (vgl. Tab. 5.1-8) und ebenfalls aus einem Heterodimer mit mehreren amphipathischen α -Helices besteht, zeigte es nicht den beschriebenen Abfall der adsorbierten Menge mit zunehmender POE-Kettenlänge. Vielmehr wurde zuerst eine Zunahme der relativen Menge ApoJ mit steigender Kettenlänge beobachtet (Abb. 5.1-28). Das Maximum lag bei P237-SLN (62 EO-Einheiten) bzw. P238-SLN (97 EO-Einheiten). Danach kam es – wie bei ApoE und ApoA-IV - wieder zu einem Abfall mit steigender Kettenlänge. Zur Zeit wird diskutiert, ob ApoJ möglicherweise auch eine Bedeutung für die Penetration durch die BHS zukommt, da es vermehrt auf Doxorubicin-beladenen PBCA-Partikeln gefunden wurde, die sich im Tierversuch an der Ratte als gehirngängig erwiesen (Petri, 2005). Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch unklar.

Die adsorbierten Mengen der anderen Apolipoproteine (ApoA-I, ApoC-III und ApoA-II) zeigten keine offensichtlichen Korrelationen zur POE-Kettenlänge (Abb. 5.1-29). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass diese Apolipoproteine ein viel geringeres MW besitzen (Tab. 5.1-9) als ApoE bzw. ApoA-IV (vgl. Tab. 5.1-8). Sie haben also einen viel geringeren Raumbedarf, weshalb die sterische Hinderung durch die POE-Ketten wohl keine so große Rolle spielt. Auffällig waren hier lediglich die Mengenverhältnisse der drei Proteine zueinander, die bei allen untersuchten Block-Copolymeren annähernd konstant zu sein schienen. D. h. bei Reduktion bzw. Zunahme der relativen Menge ApoA-I waren auch immer gleichzeitig die relativen Mengen von ApoA-II und ApoC-III reduziert bzw. erhöht, obwohl sich v. a. ApoA-I in Art und Menge von den beiden anderen Proteinen stark unterscheidet (vgl. Tab. 5.1-9). Der Grund für diesen Zusammenhang blieb unklar, einleuchtend erschien lediglich die in diesem Vergleich jeweils höchste Menge von ApoA-I, da es das im Plasma höchst konzentrierteste Apolipoprotein ist.

Tab. 5.1-9: Molekulargewichte, isoelektrische Punkte und Plasmakonzentrationen von ApoA-IV, ApoE und ApoJ (Haeberli, 1995)

	ApoA-I	ApoC-III	ApoA-II
MW	28.000	ca. 9.000	ca. 9.000
pI	5,4-5,6	4,5-5,0	5,0-5,1
Konz. in Humanplasma [mg/100ml]	100-200	12-14	30-40

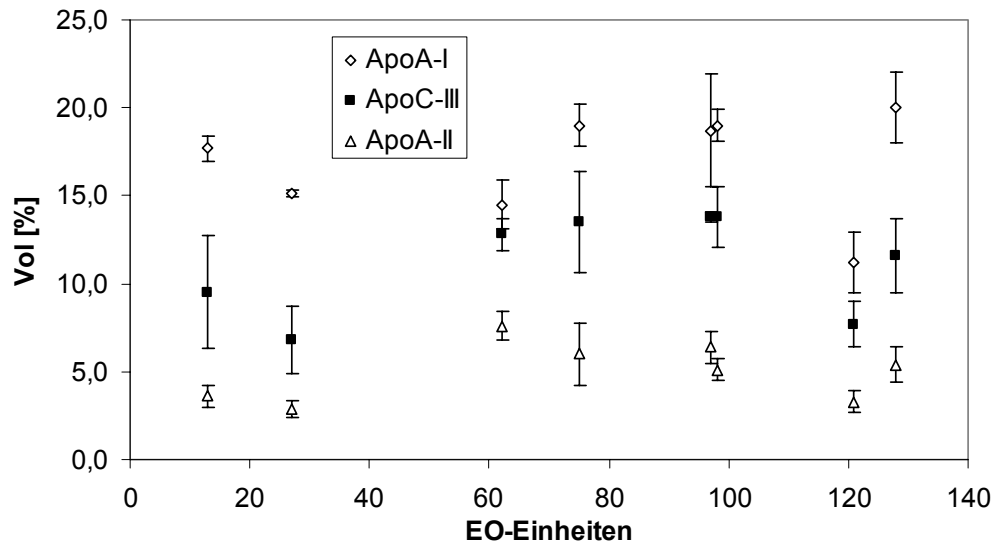


Abb. 5.1-29: Relative Mengen an adsorbiertem ApoA-I, ApoC-III und ApoA-II auf Cetylpalmitat-SLN in Abhängigkeit von der POE-Kettenlänge der eingesetzten Block-Copolymere, n = 3.

Bei der Betrachtung der mittels MELANIE ermittelten Proteingesamtmenen ergab sich ebenso wenig ein offensichtlicher Zusammenhang mit einer der Eigenschaften der Block-Copolymere (Abb. 5.1-30). Lediglich die vergleichsweise hohe absolute Proteinmenge auf den P184-SLN, mit der kürzesten POE-Kette, schien einleuchtend zu sein. Um dieses, auf den ersten Blick, überraschende Ergebnis zu verifizieren, wurde mit den Proben nach entsprechender Inkubation in Plasma und Probenaufbereitung ein BCA-Proteinassay durchgeführt, um die absoluten Proteinmengen zu quantifizieren. Das Ergebnis ist in der gleichen Abbildung dargestellt (Abb. 5.1-30). Obwohl beide Verfahren einen völlig unterschiedlichen Mechanismus zur Proteinquantifizierung haben und die 2-DE wie beschrieben nur als semiquantitative Methode zu betrachten ist, ergaben sich doch sehr gute Übereinstimmungen, d. h. die 2-DE-Ergebnisse wurden bestätigt.

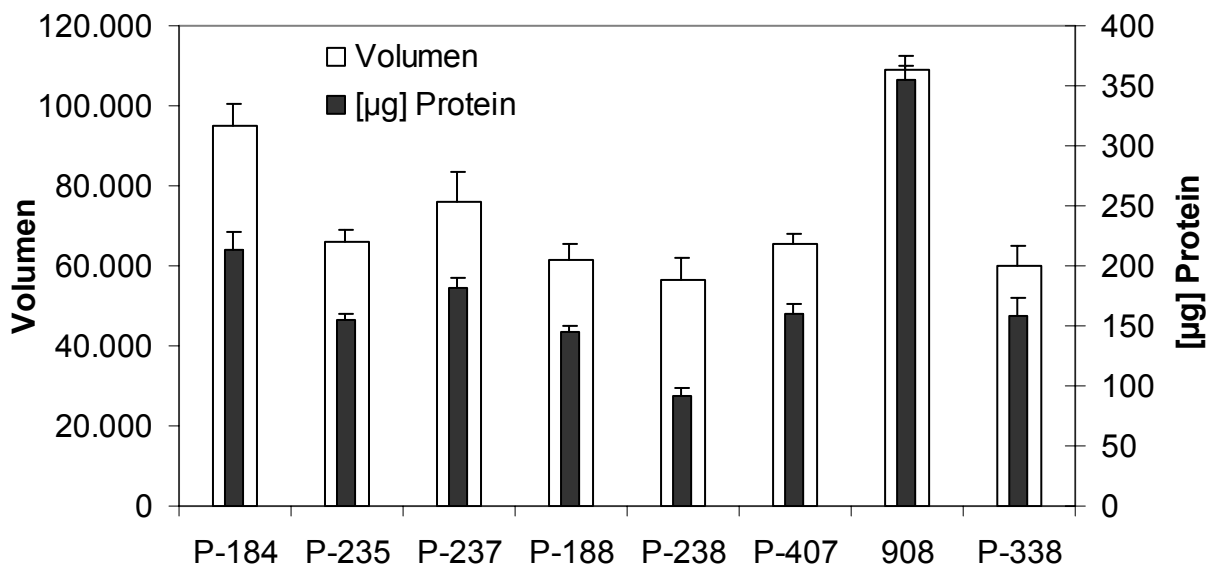


Abb. 5.1-30: Absolute Mengen an adsorbierten Proteinen auf den mit Block-Copolymeren stabilisierten SLN detektiert mittels 2-DE (weiße Balken) bzw. BCA-Assay (schwarze Balken), n = 3.

Besonders widersprüchlich schien deshalb die höchste Proteinadsorption auf den 908-SLN zu sein, da bei entsprechend oberflächenmodifizierten 60 nm Polystyrol-Partikeln eine lange Verweilzeit im Blut festgestellt werden konnte (Illum et al., 1987) (vgl. oben). Jedoch muss dabei beachtet werden, dass nicht die adsorbierte Proteingesamtmenge für die Organverteilung bzw. den Schutz vor Phagozytose entscheidend ist, sondern vielmehr – wie in Kapitel 2.2 dargestellt – die Zusammensetzung des Proteinadsorptionsmuster auf den Partikeln und da zeigten die entsprechenden SLN ebenfalls die fast vollständige Abwesenheit der typischen Oponine, wie IgG oder Komplementfaktoren.

Wie bei den Polystyrol-Partikeln wurden die Proteinmuster der SLN insgesamt von den Apolipoproteinen dominiert, was aufgrund der ähnlich großen Oberflächenhydrophobie beider Materialien nicht verwunderlich war. Dennoch ergaben sich größere Unterschiede in der Zusammensetzung der Apolipoproteine und bei der Adsorption von Fibrinogen. So zeigten 908-SLN bzw. P407-SLN eine relativ hohe Fibrinogen-Adsorption (35,6% bzw. 9,0%), die bei den entsprechenden PS 60-Partikeln nicht detektiert wurde. Auch zeigten 908-SLN nicht die erwähnte, von Blunk mit PS 60-908 festgestellte hohe Adsorption von ApoC-III (7,7% vs. 32,1%) und P407-SLN nicht die mit PS 60-407 festgestellte hohe Adsorption von ApoA-IV (12,4% vs. 45,7%). Dies lässt sich eventuell dadurch erklären, dass zum einen die Krümmungsradien sehr unterschiedlich waren (260 nm vs. 60 nm) und zum anderen,

dass auch hier das Adsorptionsverhalten aus einem komplexen Proteingemisch nicht an einem einzigen Parameter wie der Oberflächenhydrophobie festzumachen ist.

Trotzdem ist festzuhalten, dass die Proteinmuster im Großen und Ganzen eine große Ähnlichkeit zu denen der entsprechenden Polystyrol-Partikel aufwiesen. Basierend auf der Erkenntnis, dass bei allen untersuchten Block-Copolymeren ein weitgehender Schutz der SLN-Oberfläche vor Opsoninen gegeben war, kann dieser Tensidgruppe ein großes Potential für die Umsetzung eines „Controlled Drug Release“ zugesprochen werden (Göppert und Müller, 2005c). Insbesondere der P-gp-Hemmer Poloxamer 235 zeichnete sich durch den in der Reihe höchsten ApoE/ApoC-II-Quotienten in Verbindung mit der zweithöchsten Menge ApoA-IV als für das Gehirn-Targeting sehr interessantes Tensid aus. Zusätzlich zu dieser Erkenntnis wurde mittels der 2-DE eine ausbleibende Komplementaktivierung durch P235-SLN nachgewiesen (vgl. Studie in Kapitel 5.1.1.2.3). Es wurde festgestellt, dass die adsorbierten Mengen von ApoE und ApoA-IV mit steigender POE-Kettenlänge der verwendeten Block-Copolymere exponentiell bzw. annähernd linear abnahmen.

5.1.2.2 Polysorbate

Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde in einer Studie an Ratten das Potential verschiedener Tenside untersucht, die Aufnahme von i. v. applizierten Nanopartikeln durch Zellen des MPS zu verhindern und die Organverteilung zu modifizieren (Tröster et al., 1990). Dabei wurde man zum ersten Mal auf Polysorbat 80 im Zusammenhang mit einem Gehirn-Targeting aufmerksam, da sich Polymethylmethacrylat (PMMA)-Partikel, die mit Polysorbat 80 überzogen waren, besonders stark im Gehirnbereich anreicherten. Die Autoren hielten es aber für ausgeschlossen, dass die Partikel die BHS überwinden und in Gehirnzellen aufgenommen werden können. Später wurde jedoch in einem Zellkulturmodell der BHS gezeigt, dass diese überzogenen Partikel in der Lage waren, in Endothelzellen einzudringen, ohne dabei eine Zellschädigung hervorzurufen (Borchard et al., 1994). Daraufhin ergaben Untersuchungen im Mausmodell („Tail-Flick-Test“ bzw. „Hole-Plate-Test“), dass mit Polysorbat 80-oberflächenmodifizierte PBCA-Nanopartikel (PBCA-PS80) nicht nur die BHS überwinden, sondern dabei auch das analgetisch wirksame Dalargin ins Gehirn transportieren können (Alyautdin et al., 1995, Kreuter et al., 1995, Schröder und Sabel, 1996, Kreuter et al., 1997). Das Hexapeptid Dalargin ist ein Leu-enkephalin (Opioid-Rezeptor-Agonist), das alleine nicht in der

Lage ist, die BHS zu passieren. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch andere Arzneistoffe wie Loperamid (Alyautdin et al., 1997, Alyautdin et al., 1998a), Tubocurarin (Alyautdin et al., 1998b), Doxorubicin (Gulyaev et al., 1999, Steiniger et al., 2004) oder ein neuerer NMDA-Rezeptor Antagonist (MRZ 2/576) (Friese et al., 2000), für die die BHS normalerweise nicht permeabel ist, mit den PBCA-PS80 ins Gehirn transportiert werden können. Als mögliche Erklärung der BHS-Überwindung wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine Schädigung des Endothels durch PBCA-Partikel in Verbindung mit Polysorbat 80 und damit verbundener erhöhter Permeabilität der BHS vorgebracht (Olivier et al., 1999). In der Tat wurde schon früher in Zellkulturen ein gewisser zellschädigender Effekt von Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikeln gezeigt (Lherm et al., 1992), wobei da das Verhältnis von Nanopartikeln zu Zellen sowie die Einwirkzeit ungleich größer waren als bei den beschriebenen Untersuchungen mit Ratten (Kreuter et al., 2003). Kreuter et al. (2003) konnten aber zeigen, dass Dalargin in Verbindung mit den angewendeten Konzentrationen an PBCA-Partikeln und Polysorbat 80 nur die BHS passiert, wenn es zuvor auf den Partikeln adsorbiert wurde. Wäre die erhöhte Permeabilität der BHS der tatsächliche Grund für den Arzneistofftransport ins Gehirn, so wäre diese Präadsorption nicht notwendig gewesen. Vielmehr wurde die Anreicherung von ApoE auf den PBCA-PS80 als Erklärung für die Überwindung der BHS nachgewiesen (vgl. Kapitel 2.2) (Müller et al., 2001, Kreuter et al., 2002).

Da die Anreicherung von ApoE auf Nanopartikeln in engem Zusammenhang mit der Modifikation der Oberfläche mit Polysorbat 80 zu stehen scheint (Lück, 1997), wurde Polysorbat 80 zur Leitsubstanz für den potentiellen Einsatz von Nanopartikeln als Arzneistofftransportsysteme ins Gehirn. Da auch mit anderen Polysorbaten oberflächenmodifizierte PBCA-Partikel zu einem – wenn auch schwächeren - Effekt im Mausmodell führten (Kreuter et al., 1997) und ApoE anreicherten (Lück, 1997), wurden in der folgenden Studie die Adsorptionsmuster auf SLN bestimmt, die mit einer Reihe von Polysorbaten modifiziert wurden. Die resultierenden 2-DE-Gele wurden ausgewertet und mit denen der entsprechenden PBCA-Partikel verglichen.

Tab. 5.1-10 zeigt die Zusammensetzung, die Größencharakteristik und die ZP der untersuchten SLN. Die Partikel waren bezüglich ihres mittleren Teilchendurchmesser und der Größenverteilung sehr ähnlich, d. h. ein Einfluss unterschiedlicher Krümmungsradien auf die Proteinadsorption konnte, wie in der vorherigen Studie,

ausgeschlossen werden. Da auch die Oberflächenladungen der Partikel sehr ähnlich waren (zwischen -35,1 mV und -37,8 mV), konnten Unterschiede in den Adsorptionsmustern direkt auf den Einfluss der verwendeten Tenside zurückgeführt werden (Göppert und Müller, 2005a).

Tab. 5.1-10: Zusammensetzung, Größencharakteristik (LD und PCS) und ZP der untersuchten SLN

	10% Cetylpalmitat, 1,2% Polysorbat X			
	X = 60 PS60-SLN	X = 80 PS80-SLN	X = 40 PS40-SLN	X = 20 PS20-SLN
D50% [μm]	0,274	0,254	0,269	0,267
D90% [μm]	0,461	0,441	0,458	0,466
D95% [μm]	0,518	0,502	0,516	0,526
D99% [μm]	0,626	0,610	0,625	0,638
PCS [nm]	234 \pm 3	230 \pm 5	237 \pm 5	229 \pm 7
PI	0,0911	0,130	0,099	0,148
ZP [mV]	-35,1	-36,4	-37,8	-36,4

Abb. 5.1-31 zeigt die 2-D-Pherogramme von PS60- und PS80-SLN, Abb. 5.1-32 die von PS40- und PS20-SLN. Aus qualitativer Sicht schienen die Proteinmuster alle sehr ähnlich zu sein. Wieder dominierten die Apolipoproteine (v. a. ApoJ, ApoA-I und ApoC-III). Bei genauerer Betrachtung fielen allerdings auch hier (zum Teil starke) unterschiedliche Intensitäten der einzelnen Spots auf. Zu einem genaueren Ergebnis führte die semiquantitative Auswertung, deren Ergebnis in Tab. 5.1-11 gezeigt ist.

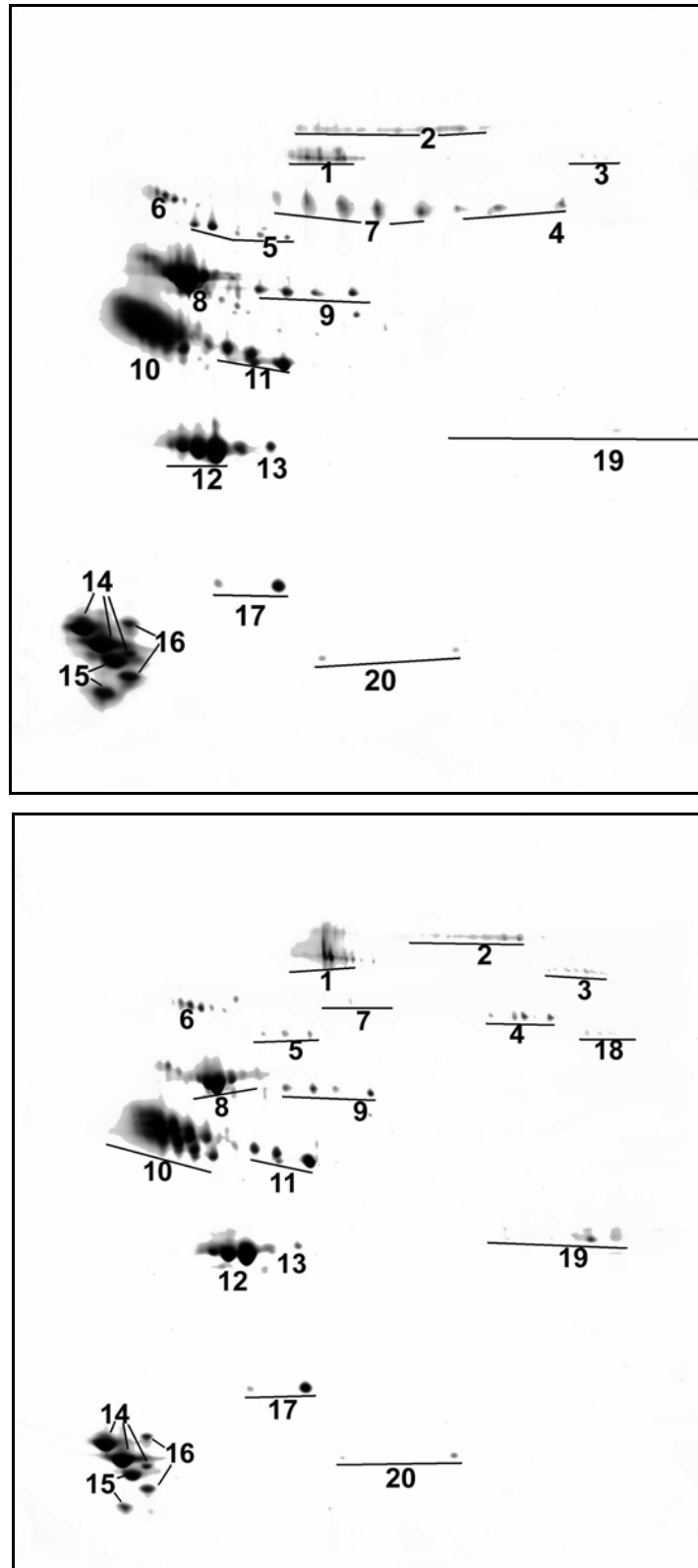


Abb. 5.1-31: 2-D-Pherogramme von PS60-SLN (oben) und P80-SLN (unten). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) α 1-Antitrypsin, (7) ApoH, **(8) ApoA-IV**, (9) Haptoglobin β Kette, (10) ApoJ, **(11) ApoE**, (12) ApoA-I, (13) ProapoA-I, (14) ApoC-III, (15) ApoC-II, (16) ApoA-II, (17) Transthyretin, (18) IgG γ Kette, (19) Ig leichte Ketten, (20) Haptoglobin α 1 Kette.

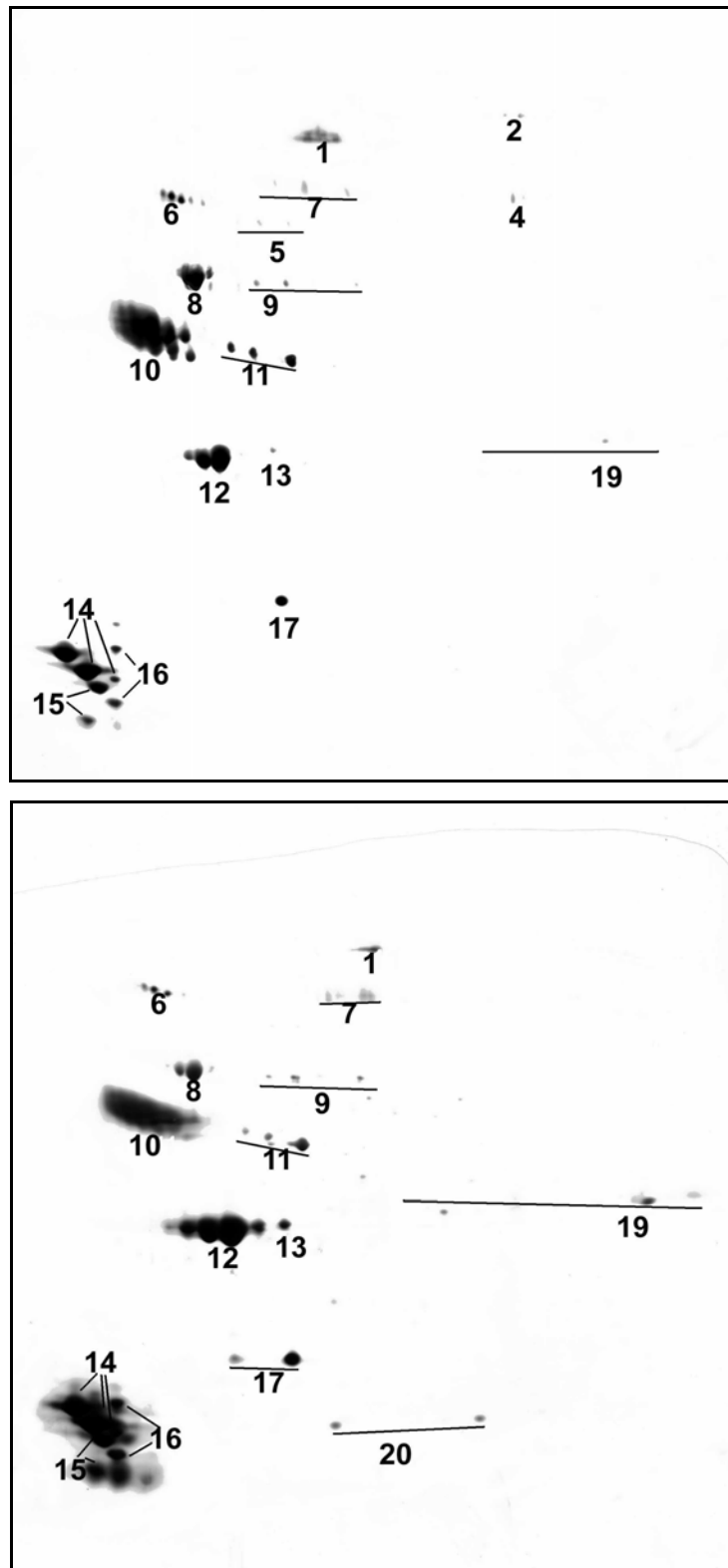


Abb. 5.1-32: 2-D-Pherogramme von PS40-SLN (oben) und P20-SLN (unten). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) α 1-Antitrypsin, (7) ApoH, (8) **ApoA-IV**, (9) Haptoglobin β Kette, (10) ApoJ, (11) **ApoE**, (12) ApoA-I, (13) ProapoA-I, (14) ApoC-III, (15) ApoC-II, (16) ApoA-II, (17) Transthyretin, (19) Ig leichte Ketten, (20) Haptoglobin α 1 Kette.

Tab. 5.1-11: Adsorbierte Hauptproteine auf den mit Polysorbat stabilisierten SLN. Die Proteinmengen sind in ihren prozentualen Anteilen am insgesamt detektierten Proteinmuster (Vol%) angegeben, n = 2 (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	PS60-SLN (HLB = 14,9)	PS80-SLN (HLB = 15,0)	PS40-SLN (HLB = 15,6)	PS20-SLN (HLB = 16,7)
Albumin	2,0 \pm 0,1	4,0 \pm 0,3	2,4 \pm 0,6	1,2 \pm 0,3
ApoE	5,4 \pm 0,9	5,4 \pm 0,3	4,4 \pm 0,7	2,3 \pm 0,2
ApoC-II	6,7 \pm 0,8	4,3 \pm 0,1	4,9 \pm 0,3	7,7 \pm 0,8
ApoA-I	14,0 \pm 0,9	14,1 \pm 0,2	15,9 \pm 2,5	22,8 \pm 4,1
ApoA-IV	14,1 \pm 0,3	10,9 \pm 0,6	9,8 \pm 2,3	8,3 \pm 4,9
ApoC-III	10,3 \pm 2,2	14,4 \pm 1,9	14,5 \pm 2,1	15,2 \pm 1,5
ApoJ	27,5 \pm 1,5	32,2 \pm 4,2	35,4 \pm 3,7	27,6 \pm 2,5
IgG γ Kette	0,3 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
IgM μ Kette	1,5 \pm 0,8	2,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2
Ig leichte Ketten	0,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2	0,9 \pm 0,5
Fibrinogen	3,8 \pm 0,9	2,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,7

Wie bei den entsprechenden PBCA-Partikeln konnte auch hier eine Anreicherung von ApoE auf der Oberfläche beobachtet werden. Auch wenn der relative Anteil von ApoE am Gesamtmuster nur 2,3-5,4% betrug, ist dennoch von einer Anreicherung zu sprechen, denn man muss berücksichtigen, dass ApoE aufgrund seiner sehr niedrigen Plasmakonzentration (ca. 0,005% (m/V) (Scanu, 1987)) auf einem 2-DE-Gel von Humanplasma so gut wie nicht detektierbar ist (vgl. Abb. 4.2-2).

Interessanterweise schien es einen Zusammenhang zwischen dem HLB-Wert des verwendeten Polysorbats und der adsorbierten Menge ApoE zu geben (Abb. 5.1-33). HLB bedeutet Hydrophilic Lipophilic Balance (hydrophiles lipophiles Gleichgewicht) (Bauer et al., 2002), d. h. die HLB-Werte sollen in etwa das Verhältnis von hydrophilen und lipophilen Gruppen in einem Tensidmolekül wiedergeben. Die HLB-Skala nach Griffin für nichtionische Tenside reicht von 0-20, da willkürlich festgelegt wurde, dass sie ein Fünftel des prozentualen Molekülanteils der polaren Molekülteile darstellen sollen (Bauer et al., 2002). Man kann also sagen, dass die verwendeten Polysorbate (HLB zwischen 14,9 und 16,7 entsprechend 74,5-83,5% Anteil polarer Molekülteile) alle relativ hydrophil sind. Sie unterscheiden sich nur durch die Kettenlänge des Fettsäurerestes im Molekül (vgl. Kapitel 3.2.1.2). Das in der Reihe

„lipophilste“ Polysorbat 60 (POE-20-Sorbitanmonostearat, HLB = 14,9) führte zur größten absoluten Menge an adsorbiertem ApoE, das in der Reihe hydrophilste Polysorbat 20 (POE-20-Sorbitanmonolaurat, HLB = 16,7) zur geringsten Menge ApoE (Abb. 5.1-33). Die relative bzw. absolute Menge an adsorbiertem ApoE verringerte sich mit steigender Hydrophilie der Polysorbate (Abb. 5.1-33).

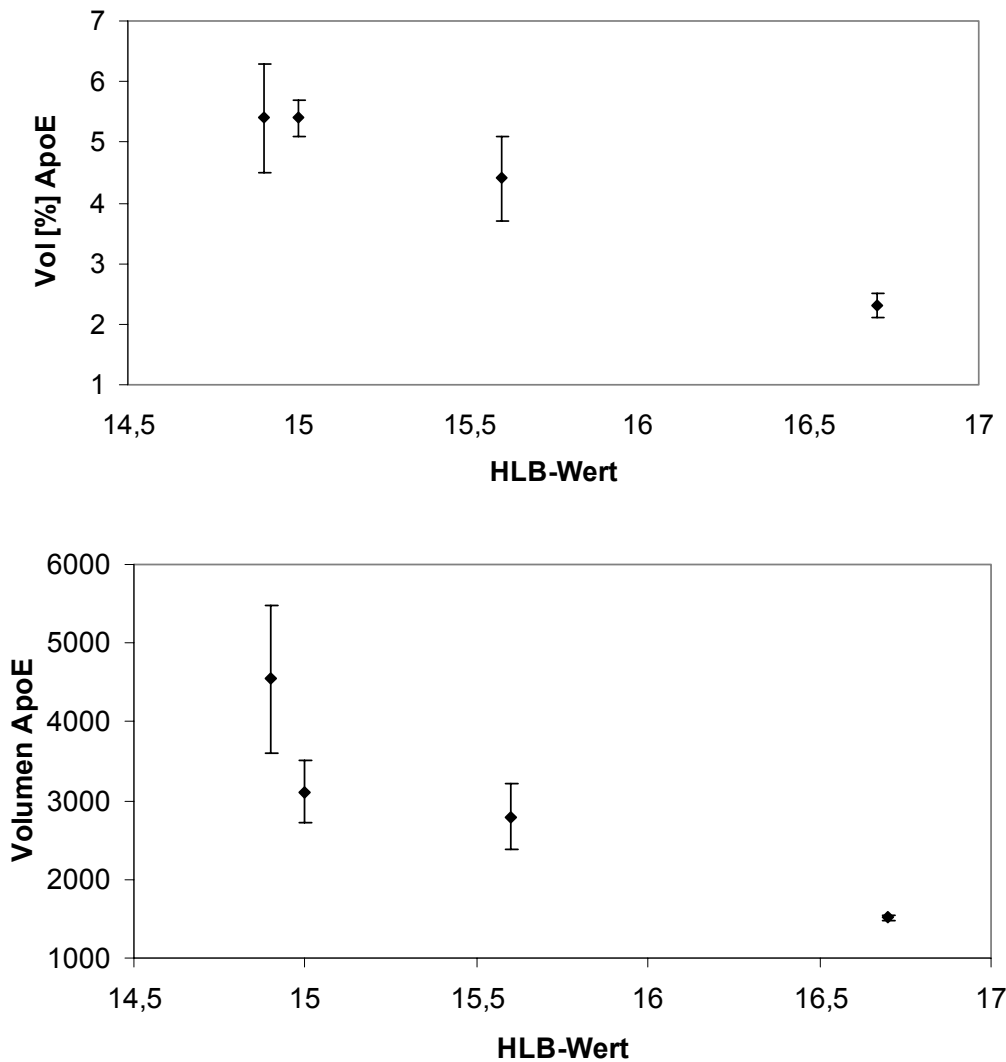


Abb. 5.1-33: Relative (oben) und absolute (unten) Mengen an adsorbiertem ApoE auf Cetylpalmitat-SLN in Abhängigkeit vom HLB-Wert der verwendeten Polysorbate (PS60: HLB = 14,9; PS80: HLB = 15,0; PS40: HLB = 15,6; PS20: HLB = 16,7), $n = 2$.

Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Korrelation ist wiederum die Affinität von Apolipoproteinen zu lipophilen Oberflächen (vgl. Kapitel 2.4 und 5.1.1.3). Aufgrund dieser Präferenz kann man davon ausgehen, dass wenn neben der Adsorption auf der Lipidoberfläche auch eine Affinität von ApoE zum Polysorbat bestehen sollte, es sich bevorzugt an den lipophilen Teil des Tensids, d. h. an die Fettsäurekette,

anlagern müsste. Dieser lipophile Teil ist umso kleiner ausgeprägt (die Fettsäurekette ist umso kürzer), je größer der HLB-Wert ist.

Die besondere Konformation der amphipathischen Helices erlaubt den Apolipoproteinen bei der Adsorption auf den Lipoprotein-Partikeln die hydrophobe Interaktion mit den Acyl-Ketten der Phospholipide und den hydrophoben Lipiden im Kern (Rosseneu, 1992). Die Aminosäure-Seitenketten sind dabei senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet und können in die Lipidphase eintauchen. Man spricht vom sogenannten „Schnorchel-Modell“ (Segrest et al., 1994) (Abb. 5.1-34). Analog dazu, könnten Apolipoproteine, die auf Polysorbat-modifizierten SLN adsorbieren, mit den Acyl-Ketten der Polysorbate interagieren. Da davon auszugehen ist, dass die sterische Hinderung zur Lipidoberfläche bei allen in etwa gleich war (bei allen Polymerisationsgrad von ca. 20; vgl. Kapitel 3.2.1.2), könnte diese (wenn auch geringe) Abstufung der Hydrophobie der Grund für die Abnahme der ApoE-Adsorption sein.

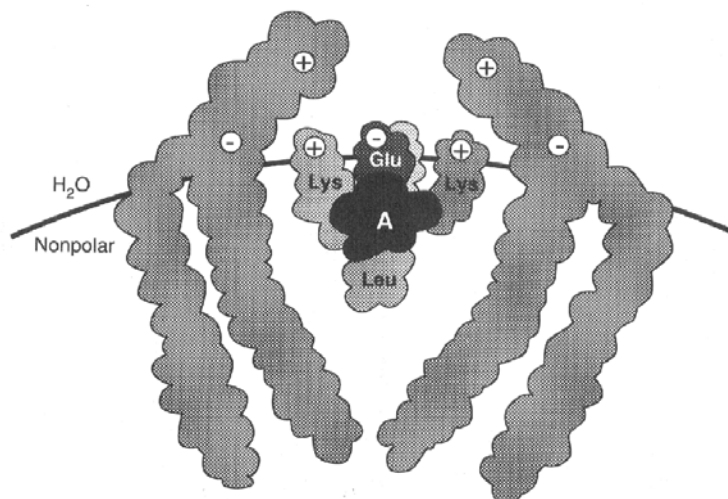


Abb. 5.1-34: „Schnorchel-Modell“ einer amphipathischen α -Helix eines Apolipoproteins (Segrest et al., 1994).

Wie in der vorherigen Studie mit Block-Copolymeren modifizierten SLN blieb allerdings unklar, warum dieser Zusammenhang nicht bei allen Apolipoproteinen zu beobachten war.

Es war jedoch auffällig, dass (ebenfalls wie zuvor bei der Block-Copolymer-Reihe) ApoA-IV das gleiche Adsorptionsverhalten wie ApoE zeigte. Der höchste Wert wurde für PS60-SLN ermittelt (14,1%), der niedrigste für PS20-SLN (8,3%) (vgl. Tab. 5.1-11). Wiederum waren die Werte, entsprechend der höheren Konzentration im

Plasma (vgl. Tab. 5.1-8), zwei- bis viermal höher als die ApoE-Werte. Diese Beobachtung stützt die beschriebene These, dass ApoE und ApoA-IV auf der Oberfläche von SLN ein ähnliches Adsorptionsverhalten haben. Da die beiden Proteine bei der Überwindung der BHS wohl synergistisch wirken, wäre dieser Zusammenhang bei der Entwicklung von gehirngängigen SLN von großem Wert.

Die Korrelation der HLB-Werte mit der ApoE-Adsorption wurde zuvor mit den beschriebenen PBCA-Partikeln nicht festgestellt (Abb. 5.1-35) (Lück, 1997), was man sich mit dem unterschiedlichen Partikelcharakter im Vergleich zu SLN erklären könnte. Überraschend war allerdings auf den ersten Blick, dass das in der *In-vivo*-Studie effektivste Polysorbat 80 (Maximal möglicher Effekt (%MPE) im Tail-Flick-Test nach 10 min = 100) nur zur drittgrößten Menge an adsorbiertem ApoE führte. Polysorbat 20 und 40, mit höheren Werten für ApoE, führten zwar auch zu einem zentralen analgetischen Effekt von Dalargin, jedoch war dieser schwächer ausgeprägt (%MPE 79,7 bzw. 87,5) (Kreuter et al., 1997).

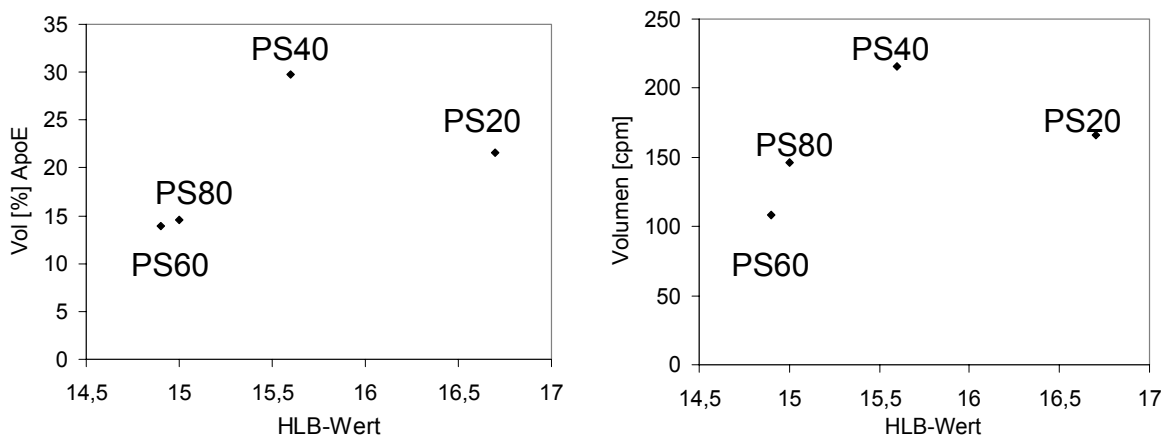


Abb. 5.1-35: Relative (links) und absolute (rechts) Mengen an adsorbiertem ApoE auf PBCA-Nanopartikeln in Abhängigkeit vom HLB-Wert der verwendeten Polysorbate, n = 1 (Lück, 1997) (bestimmt mit MELANIE II)*.

Dabei muss allerdings wieder das Konzept der „Differenzierenden Adsorption“ berücksichtigt werden, denn wie bereits mehrfach betont, wird die Organverteilung nicht allein von einem Protein bestimmt (auch nicht von dem Schlüsselprotein ApoE, wie dieses Beispiel schön zeigt), sondern vielmehr von der ganzen

* Beim Vergleich absoluter Proteinwerte aus früheren Studien (mit MELANIE II bestimmt), mit den in dieser Arbeit bestimmten Werten, ist zu beachten, dass die alte Software die absoluten Werte in einer anderen Größenordnung und in der Einheit [cpm] angab (vgl. Kapitel 4.2.1.5.2).

Zusammensetzung des Proteinadsorptionsmusters. Deswegen müssen auch Oponine wie IgG und Dysopsonine wie Albumin in der Auswertung immer berücksichtigt werden (Abb. 5.1-36). Dabei ergab sich ein Bild, das die beschriebene höchste Effektivität von PBCA-PS80 beim Arzneistofftransport ins Gehirn erklären könnte, denn diese Partikel adsorbierten die in der Reihe mit Abstand größte Menge an Albumin. Bei den Werten für IgG ergaben sich keine hervorzuhebenden Unterschiede. Dies könnte dazu geführt haben, dass PBCA-PS80, im Vergleich zu den anderen Partikeln, weniger von den Zellen des MPS phagozytiert wurden und so mehr Partikel für den Transport über die BHS zur Verfügung standen.

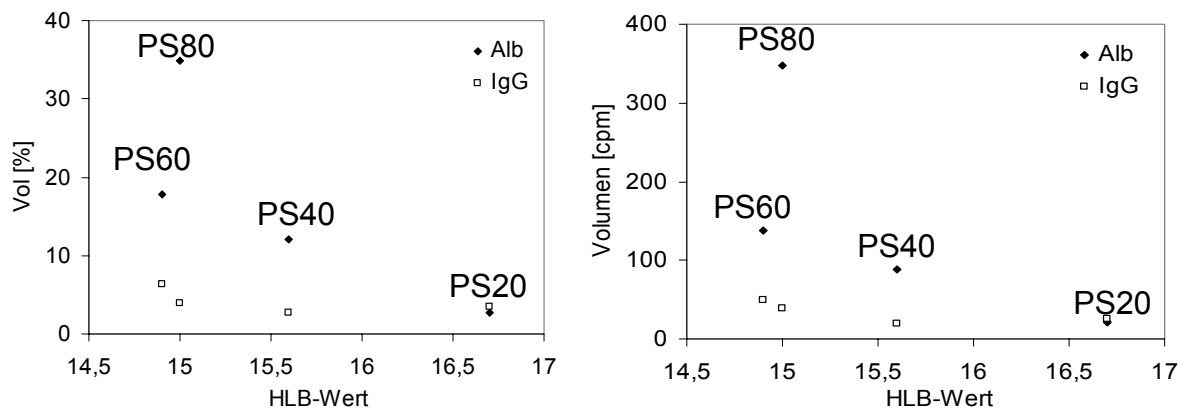


Abb. 5.1-36: Relative (links) und absolute (rechts) Mengen an adsorbiertem Albumin bzw. IgG auf PBCA-Nanopartikeln in Abhängigkeit von den HLB-Werten der verwendeten Polysorbate, $n = 1$ (Lück, 1997) (bestimmt mit MELANIE II).

Ein ähnliches Bild ergab sich bei den entsprechenden SLN (Abb. 5.1-37). Wiederum adsorbierten die mit Polysorbat 80-modifizierten Partikel die größte Menge an Albumin, während sich die IgG-Mengen nur unwesentlich unterschieden. Es ist zwar anzumerken, dass hier die relativen Mengen an adsorbiertem Albumin bei allen SLN um den Faktor 10 geringer waren als bei den entsprechenden PBCA-Partikeln, da jedoch auch gleichzeitig die Mengen an Oponinen (bzw. IgG) um diesen Faktor geringer waren, könnte dies ähnliche Konsequenzen für die Vermeidung der Aufnahme durch MPS-Zellen haben. Deshalb könnten PS80-SLN, trotz geringerer Menge ApoE (5,4% vs. 15% auf PBCA-PS80), ein ähnlich großes Potential für einen Arzneistofftransport über die BHS haben wie PBCA-PS80 (Göppert und Müller, 2005a), bei erheblich besserer Verträglichkeit *in vivo*.

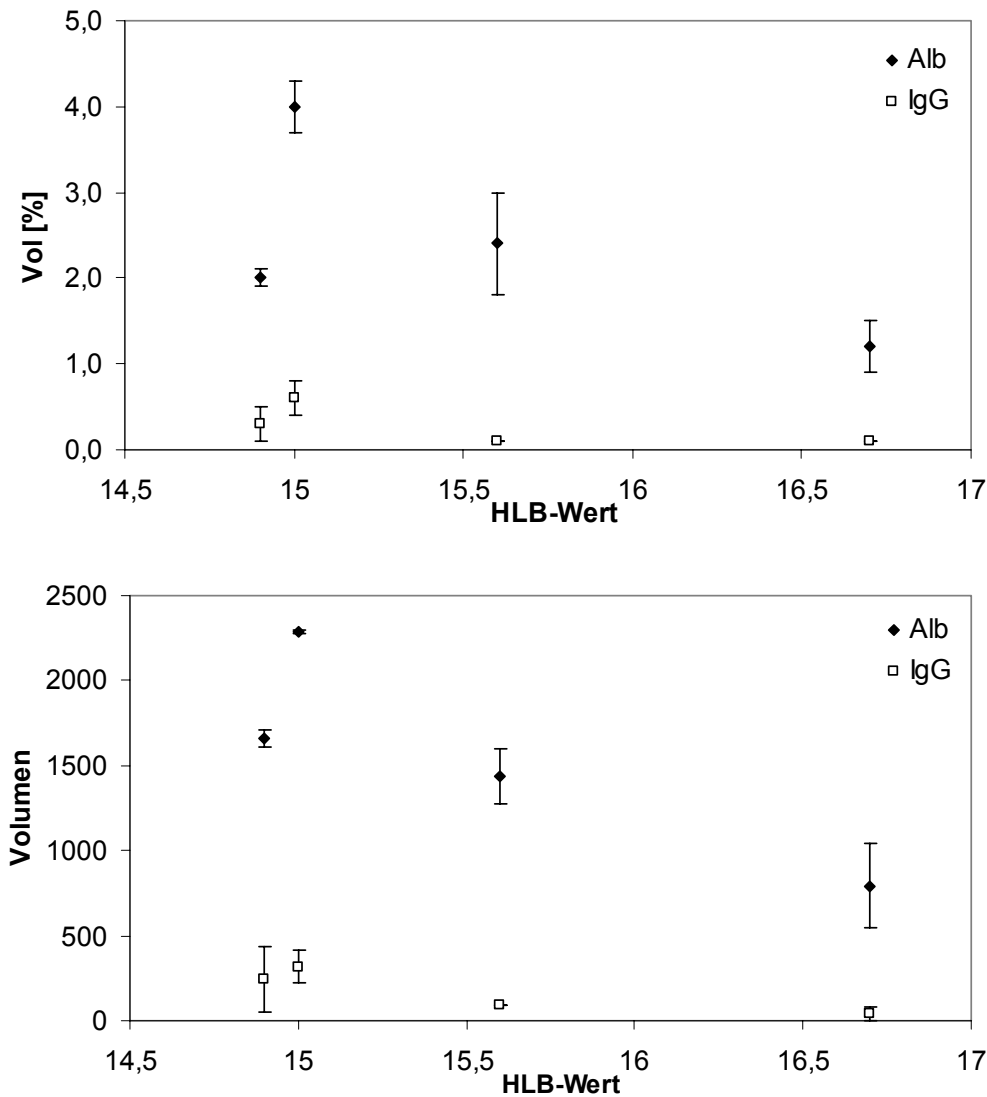


Abb. 5.1-37: Relative (oben) und absolute (unten) Mengen an adsorbiertem Albumin bzw. IgG auf Cetylpalmitat-SLN in Abhängigkeit vom HLB-Wert der verwendeten Polysorbate (PS60: HLB = 14,9; PS80: HLB = 15,0; PS40: HLB = 15,6; PS20: HLB = 16,7), $n = 2$.

Um das Potential der unterschiedlichen SLN noch genauer beurteilen zu können, wurden die Mengen an adsorbiertem ApoC-II bzw. die Quotienten aus ApoE/ApoC-II verglichen (Abb. 5.1-38). Die geringste Menge ApoC-II bzw. den größten Quotienten ApoE/ApoC-II hatten PS80-SLN, sodass auch dieser Aspekt für eine Verwendung von Polysorbat 80 für die Oberflächenmodifikation der SLN sprach. Das gleiche galt beim Vergleich der absoluten Proteinmengen, denn obwohl diese (wie bereits betont) keinen entscheidenden Einfluss auf das *In-vivo*-Schicksal der Partikel haben, ist es doch erwähnenswert, dass PS80-SLN die geringste Proteingesamtmenge auf der Oberfläche aufwies (Abb. 5.1-39).

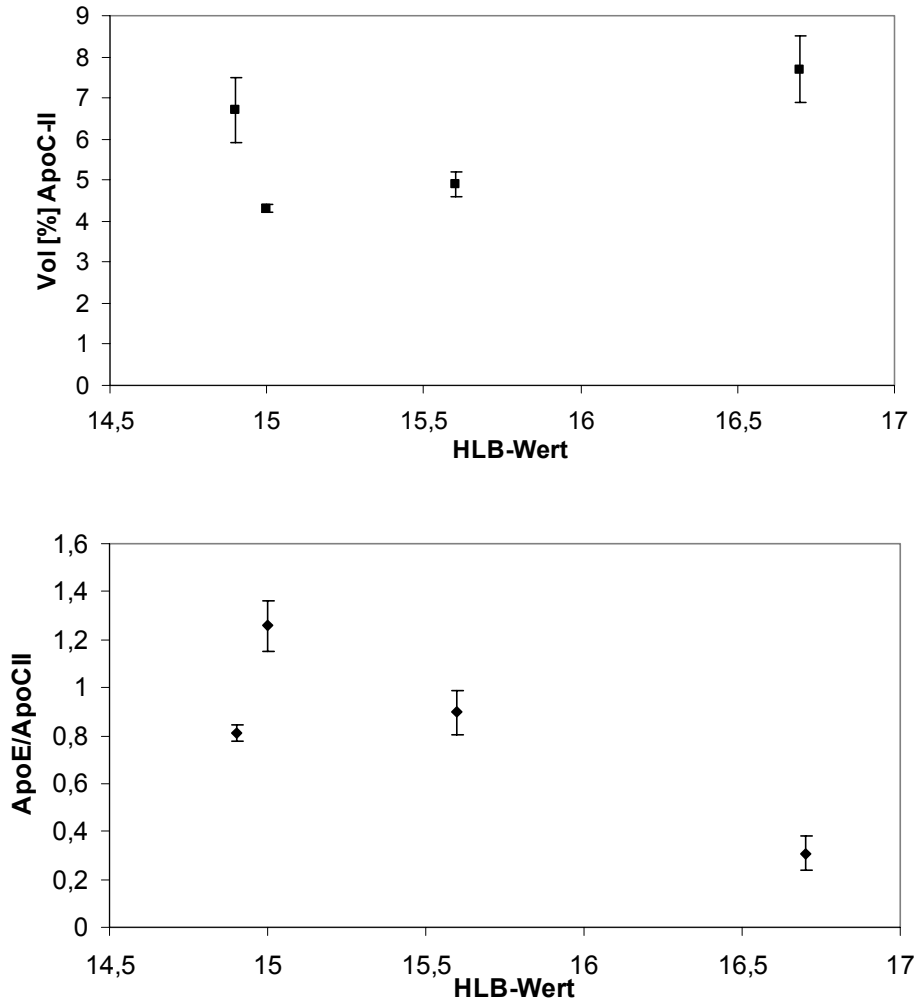


Abb. 5.1-38: Relative Mengen an adsorbiertem ApoC-II auf Cetylpalmitat-SLN (oben) bzw. Mengenverhältnis von ApoE zu ApoC-II (unten) in Abhängigkeit vom HLB-Wert der verwendeten Polysorbate (PS60: HLB = 14,9; PS80: HLB = 15,0; PS40: HLB = 15,6; PS20: HLB = 16,7), n = 2.

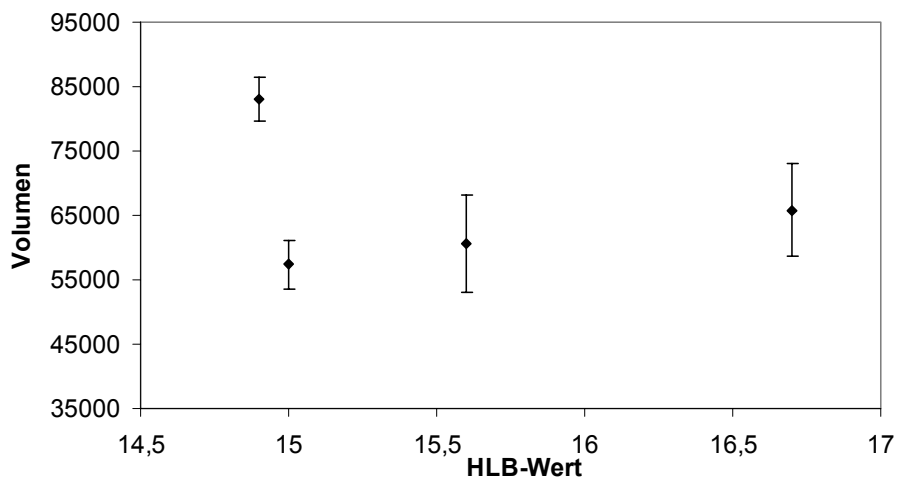


Abb. 5.1-39: Absolute Mengen adsorbierter Proteine auf Cetylpalmitat-SLN in Abhängigkeit vom HLB-Wert der verwendeten Polysorbate (PS60: HLB = 14,9; PS80: HLB = 15,0; PS40: HLB = 15,6; PS20: HLB = 16,7), n = 2.

Aufgrund dieser Ergebnisse der Plasmaproteinadsorption auf mit Polysorbat-modifizierten Cetylpalmitat-SLN wurde geschlossen, dass Polysorbat 80 sehr geeignet ist, um ein Gehirn-Targeting mit SLN (ähnlich wie bei PBCA-Partikeln) zu erzielen (Göppert und Müller, 2005a).

5.1.2.3 Sonstige Tenside

In der im folgenden beschriebenen Studie sollte der Effekt von weiteren, für die Zielsetzung interessanten Tensiden auf die Adsorptionsmuster von SLN untersucht werden.

Dazu gehörte D- α -Tocopheryl-Polyethylenglykol-1000-succinat (TPGS), das nicht nur als wasserlösliche Vitamin E-Quelle eingesetzt wird, sondern auch um die intestinale Absorption von Arzneistoffen zu verstärken. Sokol et al. (1991) konnten in klinischen Studien zeigen, dass durch zusätzliche Verabreichung von TPGS die orale Bioverfügbarkeit von Cyclosporin erhöht wird, wodurch die Cyclosporin-Dosis um 40-72% innerhalb von 2 Monaten herabgesetzt werden konnte. Später wurde in Zellstudien mit diversen Arzneistoffen (u. a. Doxorubicin und Paclitaxel) gezeigt, dass dies auf eine Hemmung der Effluxpumpe P-gp durch TPGS zurückgeführt werden kann (Dintaman und Silverman, 1999, Bittner et al., 2002, Rege et al., 2002, Bogman et al., 2003, Bogman et al., 2005). Unter diesem Aspekt wäre TPGS, ähnlich wie Poloxamer 235, ein sehr geeignetes Tensid für die Stabilisierung von SLN zur Überwindung der BHS. Es galt zu überprüfen, ob es auch zu dem dafür notwendigen Proteinadsorptionsmuster nach Kontakt mit Humanplasma führt.

In der Literatur sind erste Studien zur Anreicherung im Gehirn von Camptothecin (Yang et al., 1999) und DO-FudR (Wang et al., 2002) mit SLN beschrieben. Beiden Formulierungen gemeinsam war die Verwendung von Sojalecithin als Stabilisator. Aufgrund seiner hervorragenden Verträglichkeit und der daraus resultierenden Verwendung in einer Vielzahl von zugelassenen Parenteralia, war der Einsatz von Lecithin bei SLN, die i. v. appliziert werden sollen, sehr naheliegend.

Cremophor EL wird unter anderem im parenteral angewendeten Fertigarzneimittel Taxol[®] zusammen mit Ethanol in einer 50:50 Mischung zur Lösungsvermittlung des schwer löslichen Paclitaxel eingesetzt. Das Tensid selbst steht aber in Verdacht nephro- bzw. neurotoxisch zu sein (Brat et al., 1992). Des Weiteren ist es für das gehäufte Auftreten allergischer Reaktion in Folge der Applikation von Taxol[®] verantwortlich (Rowinsky et al., 1992, van Zuylen et al., 2001). Zusammen mit Cremophor RH 40 wurde es allerdings in den Studien von Kreuter (1997) und Lück

(1997) untersucht, weshalb ein Vergleich mit den Werten entsprechend modifizierter SLN, zumindest aus akademischer Sicht, sehr interessant war.

Tab. 5.1-12 zeigt die Zusammensetzung und physikochemische Charakterisierung der untersuchten SLN. Die TPGS-SLN waren etwas kleiner (199 nm) als die drei anderen Formulierungen, die alle eine ähnliche Größe hatten (238-248 nm). Die L-SLN hatten, wohl bedingt durch negativ geladene Phospholipide, das höchste ZP in der Reihe (-45,1 mV).

Tab. 5.1-12: Zusammensetzung, Größencharakteristik (LD und PCS) und ZP der untersuchten SLN. C-EL = Cremophor EL, C-RH 40 = Cremophor RH 40

	10% Cetylpalmitat, 1,2% X			
	X = TPGS TPGS-SLN	X = Lecithin L-SLN	X = C-EL CEL-SLN	X = C-RH 40 CRH-SLN
D50% [μm]	0,155	0,250	0,230	0,250
D90% [μm]	0,371	0,412	0,394	0,408
D95% [μm]	0,435	0,451	0,433	0,448
D99% [μm]	0,548	0,531	0,499	0,524
PCS [nm]	199 \pm 6	248 \pm 5	238 \pm 5	247 \pm 4
PI	0,131	0,138	0,075	0,084
ZP [mV]	-34,2	-45,1	-21,7	-20,7

Abb. 5.1-40 zeigt die resultierenden 2-D-Pherogramme der vier Formulierungen. Bei qualitativer Betrachtung fiel auf, dass die Proteinmuster – wie bei allen bisher untersuchten SLN – von den Apolipoproteinen dominiert wurden. Auf den ersten Blick fiel dabei aber auch auf, dass die Muster nicht nur quantitative Unterschiede zeigten (wie bei den bisher untersuchten Tensid-Reihen), sondern auch deutliche qualitative Unterschiede. Dies verdeutlicht auch das Ergebnis der semiquantitativen Analyse, das in Tab. 5.1-13 und Abb. 5.1-41 dargestellt wird.

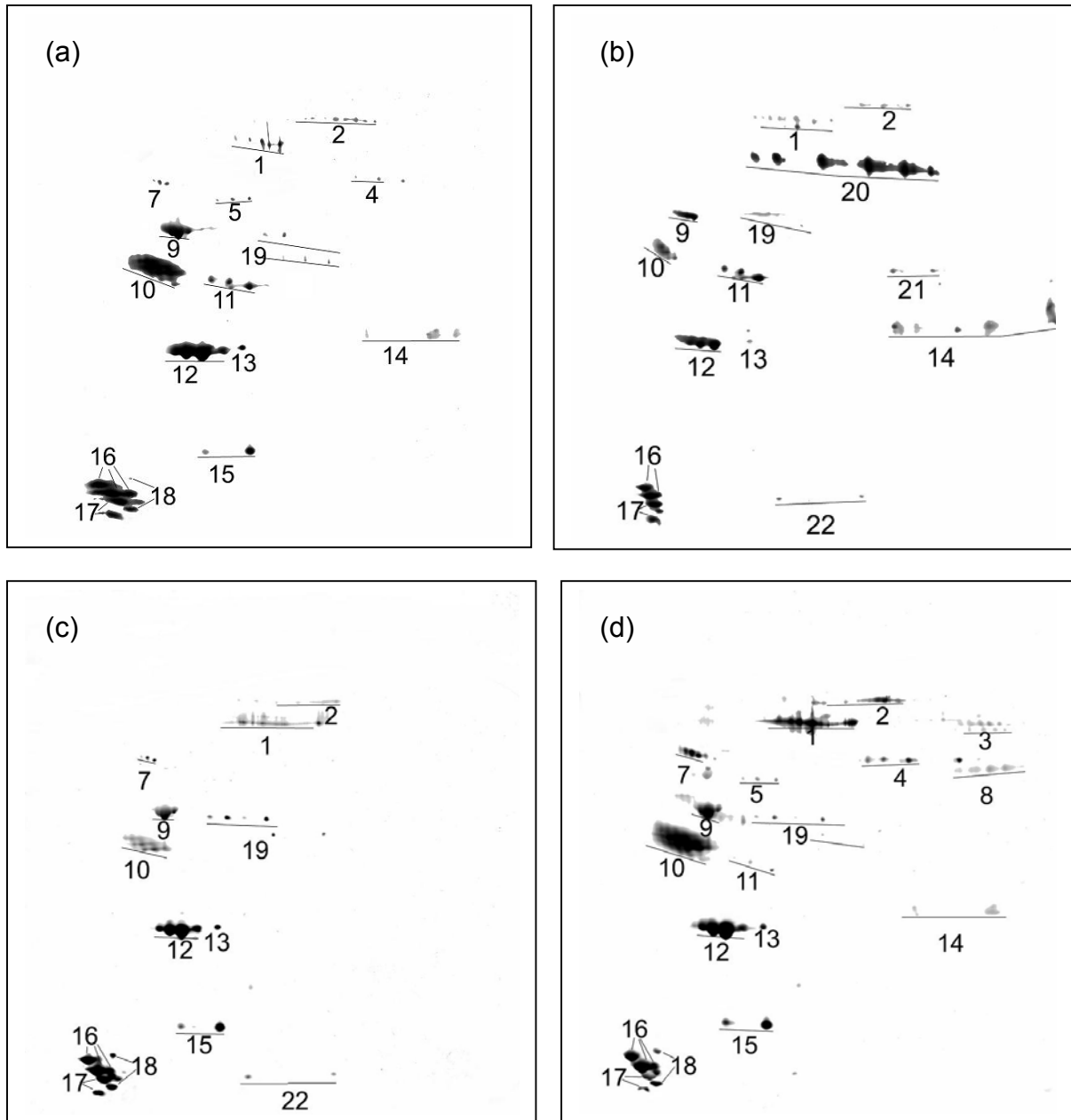


Abb. 5.1-40: 2-D-Pherogramme von Cetylpalmitat-SLN mit unterschiedlichem Stabilisator: (a) TPGS, (b) Lecithin, (c) Cremophor EL, (d) Cremophor RH 40 (die ganzen Gele sind gezeigt). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (7) α 1-Antitrypsin, (8) IgG γ Kette, (9) ApoA-IV, (10) ApoJ, (**11**) **ApoE**, (12) ApoA-I, (13) ProapoA-I, (14) Ig leichte Ketten, (15) Transthyretin, (16) ApoC-III, (17) ApoC-II, (18) ApoA-II, (19) Haptoglobin β Kette, (**20**) **ApoH**, (21) C4 γ , (22) Haptoglobin α 1 Kette.

Tab. 5.1-13: Adsorbierte Hauptproteine auf den untersuchten Cetylpalmitat-SLN (prozentuale Anteile an der Gesamtproteinmenge, n = 2, n. d. = nicht detektiert). Alle Proteine wurden aufgenommen, deren Anteil an der detektierten Gesamtmenge mehr als 2% auf mindestens einem 2-DE-Gel betrug

	TPGS-SLN	L-SLN	CEL-SLN	CRH-SLN
Albumin	4,0 ± 1,3	3,1 ± 0,4	3,0 ± 0,8	9,6 ± 1,4
ApoE	4,2 ± 0,5	7,2 ± 0,1	n. d.	0,6 ± 0,4
ApoC-II	6,8 ± 0,4	6,7 ± 1,0	13,4 ± 1,0	1,9 ± 0,3
ApoA-I	17,9 ± 2,5	15,8 ± 2,5	28,1 ± 2,2	18,3 ± 1,8
ApoA-IV	11,4 ± 1,6	8,7 ± 0,8	4,6 ± 1,4	9,5 ± 2,8
ApoC-III	13,1 ± 0,1	9,4 ± 0,8	23,6 ± 2,3	10,2 ± 1,6
ApoJ	27,6 ± 1,9	5,2 ± 1,3	5,0 ± 0,3	29,1 ± 1,5
ApoA-II	2,5 ± 0,7	n. d.	6,8 ± 1,7	2,1 ± 0,6
ApoH	n. d.	33,5 ± 1,8	n. d.	n. d.
IgM µ Kette	2,4 ± 0,5	1,6 ± 0,7	0,6 ± 0,3	2,6 ± 0,9
Ig leichte Ketten	1,1 ± 0,2	2,9 ± 1,0	0,9 ± 0,8	0,8 ± 0,1
Fibrinogen	2,7 ± 0,5	n. d.	n. d.	5,4 ± 0,7
Transthyretin	2,8 ± 0,2	n. d.	6,7 ± 0,3	3,3 ± 1,1
α1-Antitrypsin	0,9 ± 0,3	n. d.	1,0 ± 0,3	2,6 ± 0,1
Haptoglobin β	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,2	2,6 ± 0,1	1,0 ± 0,3

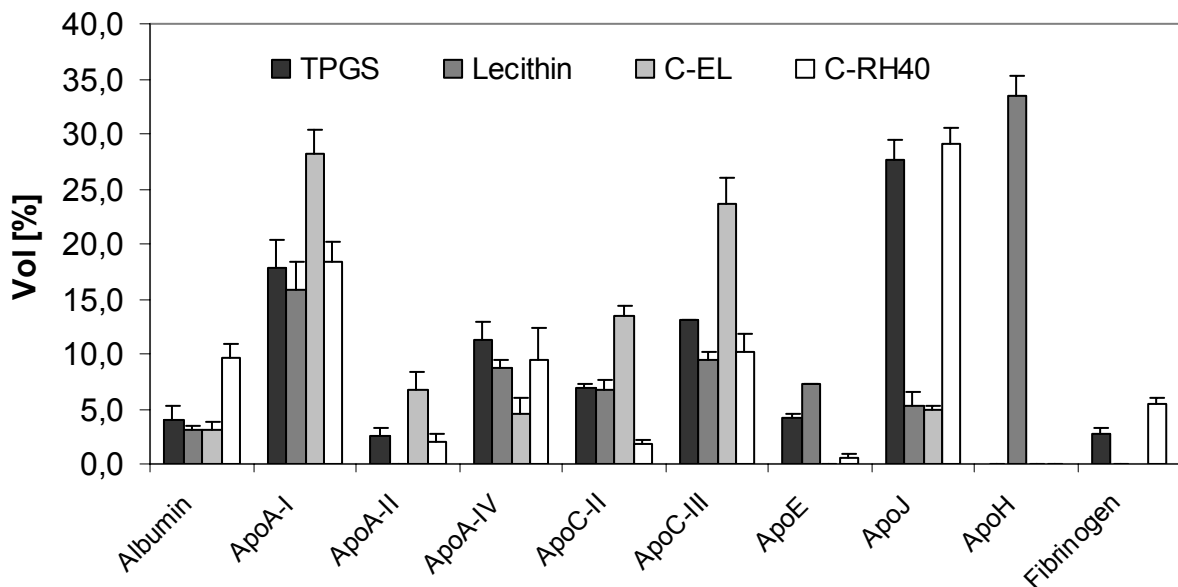


Abb. 5.1-41: Quantitativer Vergleich der Hauptproteine (mind. 5% auf einem Gel) auf den untersuchten Cetylpalmitat-SLN. Die Mengen sind als prozentualer Anteil an der jeweils detektierten Proteing Gesamtmenge dargestellt, n = 2.

Der höchste Wert für ApoE wurde auf L-SLN ermittelt (7,2%), gefolgt von TPGS-SLN (4,2%), während auf den mit Cremophor-modifizierten SLN kein bzw. eine zu vernachlässigende Menge ApoE detektiert wurde. Die höchste Adsorption von ApoE auf der Oberfläche von L-SLN war in Übereinstimmung mit den erwähnten Studien mit Stearinsäure-SLN (Yang et al., 1999) bzw. Dynasan 118-SLN (Wang et al., 2002), die beide (u. a.) mit Lecithin stabilisiert waren und zu einem Arzneistofftransport über die BHS führten. Folglich könnte auch bei diesen SLN eine Anreicherung von ApoE auf der Oberfläche stattgefunden haben, was eine Erklärung für die Überwindung der BHS wäre. Die fehlende Adsorption von ApoE auf CEL-SLN bzw. CRH-SLN war in Übereinstimmung mit den Werten der entsprechend oberflächenmodifizierten PBCA-Partikel, denn auch Lück (1997) konnte kein ApoE auf den dazugehörigen 2-DE-Gelen detektieren und Kreuter et al. (1997) stellten nur einen geringen Effekt beim Tail-Flick-Test fest, der gleichzeitig auch noch hohen Schwankungen unterlag (10,9 %MPE \pm 13,1 für C-EL bzw. 20,2 %MPE \pm 11,4 für C-RH 40).

Besonders auffällig war die sehr hohe Menge an ApoH auf L-SLN (33,5%), die in diesem Ausmaß noch auf keinem anderen SLN-Typ bestimmt werden konnte. ApoH ist ein Glycoprotein (auch unter dem Namen β_2 -Glycoprotein-I bekannt) und bindet bevorzugt an negativ geladene Oberflächen wie Heparin, Phospholipide und Dextransulfat (SWISSPROT Access. No. P02749 unter <http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot>). Wurm (1984) konnte zeigen, dass ApoH eine große Affinität zu den negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol hat, während es auf den „neutralen“ Phospholipiden, wie Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin, kaum bzw. gar nicht adsorbierte. Eine starke Adsorption von ApoH zeigte sich auch auf Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung (5-10%) (Hedemann et al., 1996, Harnisch, 1998) und auf Polystyrol-Partikeln, die aufgrund von Sulfonatgruppen eine hohe Ladungsdichte hatten (ca. 20%) (Gessner et al., 2002). Insofern war die Adsorption von ApoH auf den mit L-SLN nicht überraschend und in Übereinstimmung mit der Literatur. Als biologische Funktion von ApoH wird ein regulierender Einfluss auf das Komplementsystem und, wie bei den anderen Apolipoproteinen, eine Beteiligung am Lipidstoffwechsel diskutiert (Hunt et al., 1993, Kamboh und Mehdi, 1998). Außerdem soll ApoH die Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade hemmen, was möglicherweise durch Bindung an Phospholipide erfolgt, die sich auf der Oberfläche geschädigter Zellen befinden. Da die genaue

Funktion jedoch noch nicht vollständig geklärt ist, sind die Konsequenzen einer derartig hohen Proteinmenge auf die Organverteilung der Partikel an dieser Stelle schwer abzuschätzen. Da man jedoch annehmen kann, dass die in der Literatur beschriebenen SLN, die zu einem Arzneistofftransport über die BHS führten - aufgrund des verwendeten Lecithins - ebenfalls ApoH auf der Oberfläche anreicherten, kann man zumindest die Vermutung anstellen, dass ApoH keinen negativen Effekt auf einen Arzneistofftransport über die BHS hat.

Auffällig war außerdem, dass das 2-DE-Gel von TPGS-SLN eine große Ähnlichkeit zu dem Proteinadsorptionsmuster von PS-SLN zu haben schien. Um diesen Eindruck zu überprüfen, wurden die quantitativen Zusammensetzungen der Proteinmuster auf TPGS-SLN und PS80-SLN in Abb. 5.1-42 gegenüber gestellt.

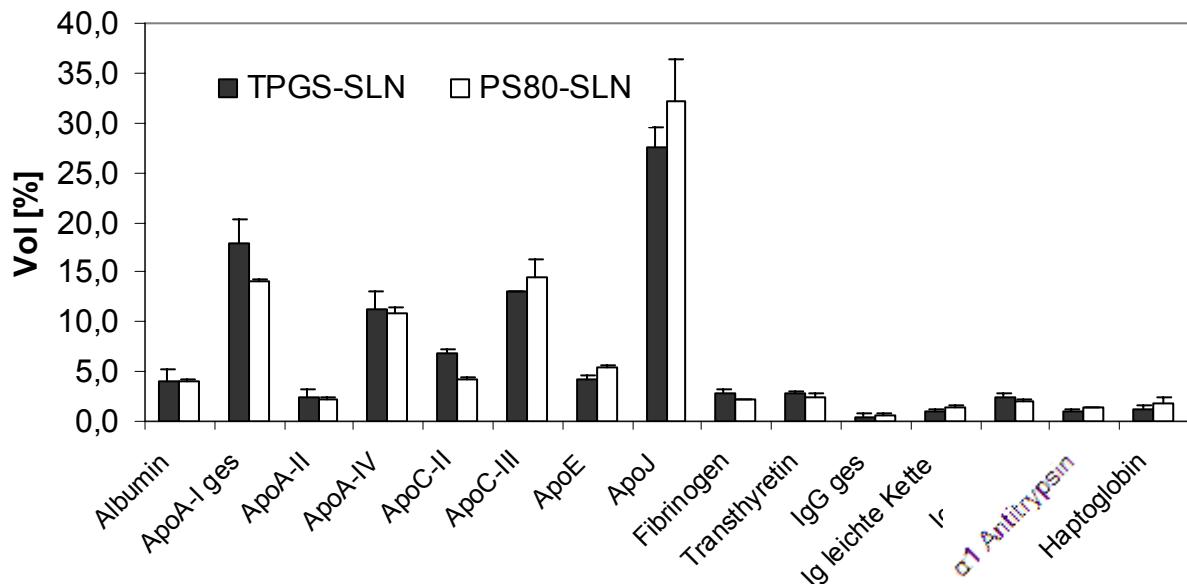


Abb. 5.1-42: Quantitativer Vergleich der Adsorptionsmuster auf TPGS-SLN bzw. T80-SLN. Die Mengen sind als prozentualer Anteil an der jeweils detektierten Proteingesamtmenge dargestellt, n = 2.

Es zeigte sich, dass die beiden Proteinmuster qualitativ und, unter Berücksichtigung der typischen Standardabweichungen, auch quantitativ fast identisch waren. Wie in Kapitel 5.1.2.2 beschrieben, kann den PS80-SLN aufgrund der Proteine, die präferentiell auf der Oberfläche adsorbieren (ApoE, ApoJ, ApoA-I, ApoA-IV, Albumin) bzw. nicht oder nur in geringer Menge adsorbieren (Opsonine wie z. B. IgG), ein großes Potential zur Überwindung der BHS zugeordnet werden. Da TPGS-SLN eine sehr ähnliche Zusammensetzung der Plasmaproteine auf ihrer Oberfläche zeigte und

TPGS zugleich noch den Efflux vieler bedeutender Arzneistoffe durch P-gp hemmen kann, könnte dieses Tensid zu einer wertvollen Alternative zu Polysorbat 80 werden. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die P-gp-Hemmwirkung von TPGS die Hemmwirkung anderer Tenside wie Polysorbat 80 oder auch Cremophor EL weit übertrifft (Bogman et al., 2003, Cornaire et al., 2004).

5.1.2.4 Mischungen von unterschiedlichen Tensiden

Da sich die Menge an adsorbiertem ApoE bzw. ApoA-IV auf SLN mit zunehmender Hydrophilie der Polysorbate kontinuierlich verringerten, wurde in dieser Studie der Anteil von Polysorbat 80 schrittweise verringert und durch den W/O-Emulgator Span 85 ersetzt. Im Gegensatz zu Polysorbat 80 (POE-20-Sorbitanmonooleat) ist Span 85 (Sorbitantrioleat) ein POE-freier Emulgator, der entsprechend lipophiler ist (HLB-Wert 1,8 vs. 15,0). Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss dieser Austausch auf das Proteinadsorptionsmuster hat.

Tab. 5.1-14 zeigt die Zusammensetzung und physikochemische Charakterisierung der vier untersuchten Formulierungen. Die Tensidkonzentration wurde konstant bei 1,2% gelassen und der Anteil an Polysorbat 80 schrittweise verringert. Die SLN waren bezüglich ihres mittleren Teilchendurchmesser, der Größenverteilung und der Oberflächenladung sehr ähnlich.

Tab. 5.1-14: Zusammensetzung, Größencharakteristik (LD und PCS) und ZP der untersuchten SLN

	10% Cetylpalmitat, X% Polysorbat 80, Y% Span 85			
	X = 1,2% Y = 0% PS80-SLN	X = 0,8% Y = 0,4% PS80sp-SLN	X = 0,4% Y = 0,8% ps80SP-SLN	X = 0,2% Y = 1,0% SP-SLN
D50% [μm]	0,254	0,247	0,239	0,243
D90% [μm]	0,441	0,421	0,437	0,411
D95% [μm]	0,502	0,462	0,490	0,451
D99% [μm]	0,610	0,534	0,592	0,526
PCS [nm]	230 \pm 5	257 \pm 6	236 \pm 3	261 \pm 5
PI	0,130	0,107	0,094	0,083
ZP [mV]	-36,4	-37,1	-38,2	-38,5

Da die resultierenden 2-D-Pherogramme hinsichtlich der Adsorption von Opsoninen bzw. Dysopsoninen sehr ähnlich waren, zeigt Abb. 5.1-43 jeweils die Apolipoproteine in einer Vergrößerung des betreffenden Gelausschnitts, da sich in diesem Bereich sehr interessante Veränderungen zeigten. In Abb. 5.1-44 sind ihre prozentualen Anteile graphisch dargestellt.

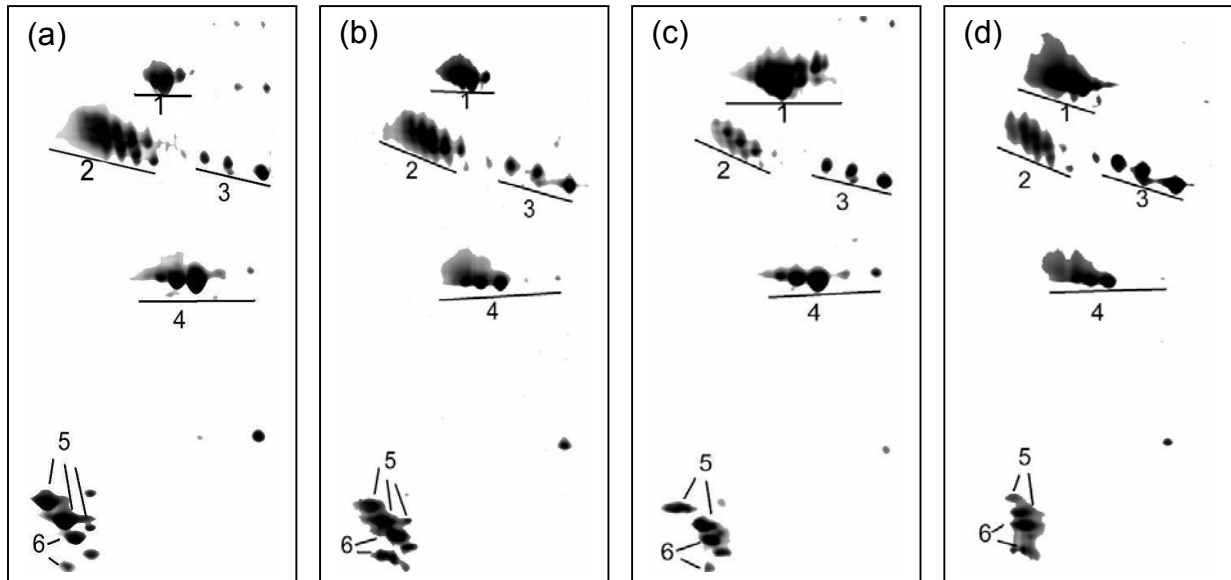


Abb. 5.1-43: Ausschnitte der 2-D-Pherogramme von SLN, modifiziert mit (a) 1,2% Polysorbat 80, (b) 0,8% Polysorbat 80 + 0,4% Span 85, (c) 0,4% Polysorbat 80 + 0,8% Span 85 bzw. (d) 0,2% Polysorbat 80 + 1,0% Span 85. Abszisse der Gele: pI 4,4-6,1 (von links nach rechts, nicht linear), Ordinate: MW 6 kDa-50 kDa (von unten nach oben, nicht linear). Markierte Proteinspots: (1) ApoA-IV, (2) ApoJ, (3) ApoE, (4) ApoA-I, (5) ApoC-III, (6) ApoC-II.

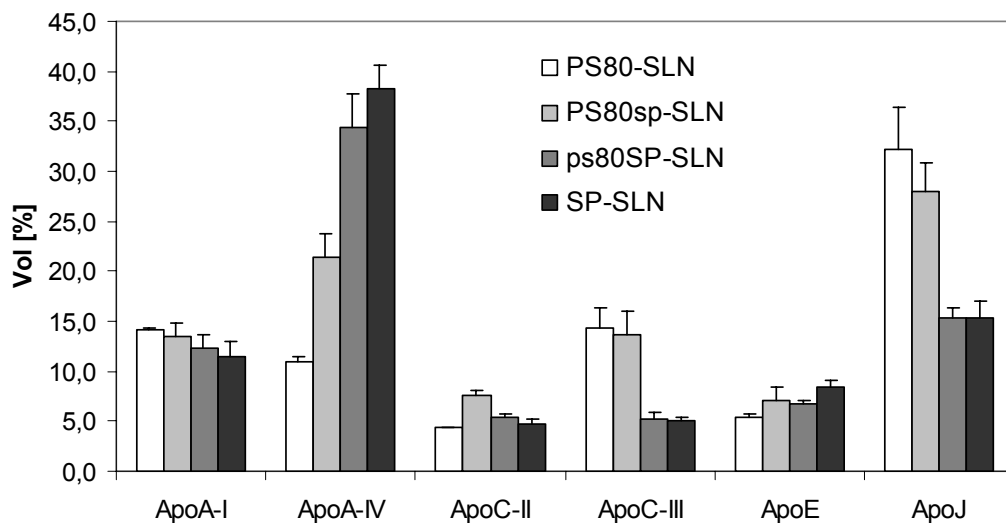


Abb. 5.1-44: Veränderungen der Anteile adsorbierter Apolipoproteine an der jeweiligen Gesamtproteinmenge nach Modifikation der SLN-Oberfläche mit Polysorbat 80 bzw. Polysorbat 80/Span85-Mischungen, n = 2.

Der steigende Anteil von Span 85 (bzw. der geringer werdende Anteil von Polysorbat 80) in der Formulierung, wirkte sich wie erwartet auf die adsorbierte Menge von ApoE und vor allem auf die adsorbierte Menge von ApoA-IV aus. Während sich der relative Anteil an ApoE schrittweise fast verdoppelte (von 5,4% auf 8,4%), wurde der relative Anteil an ApoA-IV sogar (ebenfalls schrittweise) annähernd vervierfacht (von 10,9% auf 38,3%). Interessanterweise konnte dieses Verhalten wieder nur exklusiv für diese beiden Apolipoproteine beobachtet werden, denn die anderen Apolipoproteine verhielten sich sogar teilweise konträr. So wurde für ApoA-I zwar nur ein geringer Rückgang der relativen Menge beobachtet (von 14,1% schrittweise auf 11,5%), jedoch bei ApoJ und ApoC-III ein besonders großer (von 32,2% auf 15,4% bzw. von 14,4% auf 5,1%). Besonders interessant war dabei der Vergleich mit einer Adsorptionskinetik-Studie, die von Blunk et al. (1996) mit Polystyrol-Partikeln durchgeführt wurde. In Übereinstimmung mit den hier bestimmten Werten wurden in der zitierten Studie mit Erhöhung der Inkubationszeit die stärksten Veränderungen bei den Apolipoproteinen beobachtet (vgl. Kapitel 5.1.4). Die Anteile von ApoA-IV und ApoE stiegen an, während die Anteile der Apolipoproteine A-II, C-II, C-III und J jeweils kontinuierlich zurückgingen. Diese Verdrängung (in Abhängigkeit von der Inkubationszeit) von ApoJ etc. durch ApoA-IV und ApoE wurde insbesondere durch die unterschiedliche Affinität der Proteine und mögliche Konformationsveränderungen während des Adsorptionsprozess erklärt (Blunk et al., 1996). Bei dem hier beschriebenen Experiment kommt es zwar zu keiner zeitlichen Verdrängung, jedoch decken sich die Verhalten trotzdem, da in beiden Studien die vergleichsweise höhere Affinität von ApoA-IV und ApoE zu hydrophoben Oberflächen gezeigt wird.

Die relative Menge von ApoC-II stieg durch Zumischen von Span 85 zuerst an (von 4,3% auf 7,6%), fiel dann aber wieder bei weiterem Ersatz von Polysorbat 80 fast auf den Ursprungswert zurück (auf 4,8%). Abb. 5.1-45 zeigt den dabei resultierenden Quotienten von ApoE/ApoC-II, der bei Verringerung des Anteils von Polysorbat 80 zuerst kleiner wurde, dann aber auf einen höheren Wert anstieg als der Ausgangswert von PS80-SLN.

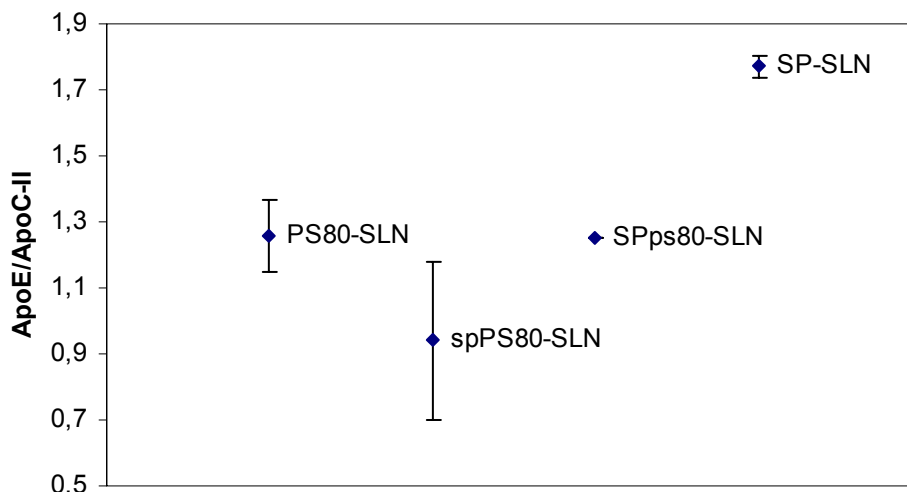


Abb. 5.1-45: Berechneter Quotient aus der relativen Menge von adsorbiertem ApoE und ApoC-II bei den vier verschiedenen Formulierungen, n = 2.

Allerdings kann an dieser Stelle – trotz des starken Anstiegs der relativen Menge von ApoA-IV – aufgrund des Rückgangs von ApoA-I, ApoJ und ApoC-III schwer prognostiziert werden, ob die Mischungen von Polysorbat 80 und Span 85 wirklich die Transporteffizienz über die BHS erhöhen würden.

5.1.2.5 Zusammenfassung und Fazit

Die Modifikation der Oberfläche von Cetylpalmitat-SLN mit unterschiedlichen Tensiden führte zu Plasmaproteinadsorptionsmustern, die zwar alle von Apolipoproteinen dominiert waren, jedoch waren deutliche Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung innerhalb dieser Proteingruppe zu verzeichnen. Abb. 5.1-46 fasst die wichtigsten Ergebnisse der durchgeführten Adsorptionsstudien mit unterschiedlichen Tensiden zusammen. Dabei sind zum einen die bestimmten Werte des Schlüsselproteins ApoE und der vielleicht entscheidende Quotient von ApoE/ApoC-II für die jeweiligen Tenside aufgetragen. Zudem wurde die Summe aus ApoA-I und ApoA-IV berücksichtigt, da diese ebenfalls einen entscheidenden Beitrag für einen Transport über die BHS mit kolloidalen Arzneistoffcarriern beitragen kann. Jedoch wurde hier jeweils nur ein Zehntel des Summenwertes aufgetragen, um die ApoE-Werte besser hervorzuheben und damit der höheren Bedeutung von ApoE gerecht zu werden.

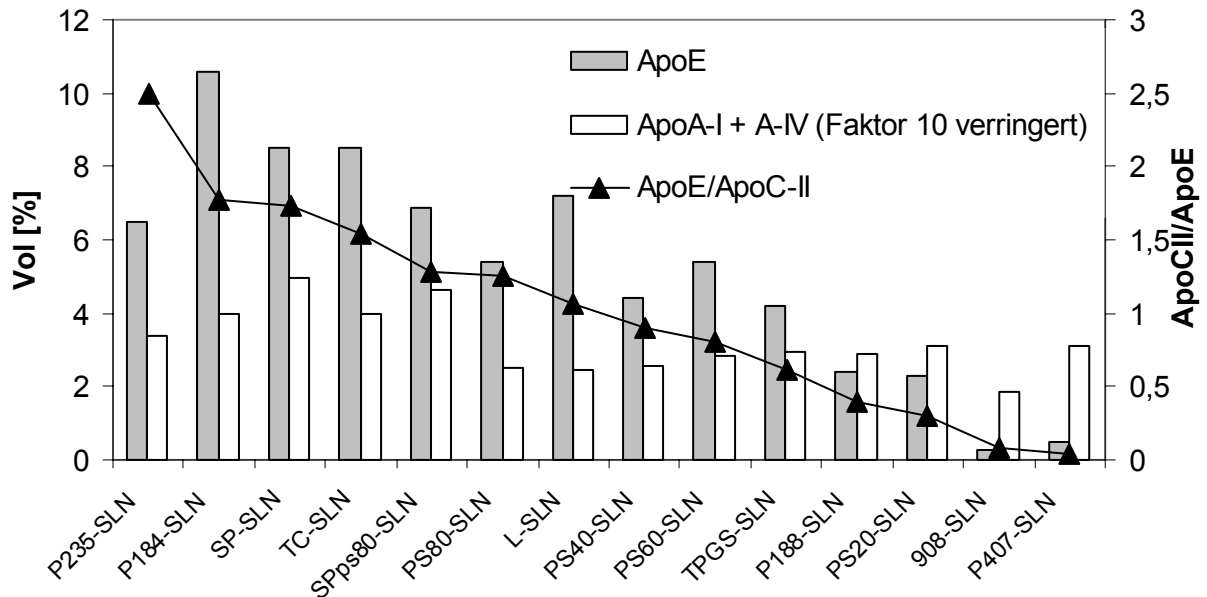


Abb. 5.1-46: Zusammenfassung der wichtigsten Werte von Kapitel 5.1.2.

Obwohl bei P235-SLN eine geringere relative Menge an ApoE auf der Oberfläche bestimmt wurde als z. B. bei P184-SLN, SP-SLN oder auch L-SLN, ergab sich bei dieser Formulierung der mit Abstand höchste Quotient an ApoE/ApoC-II (2,5). Zusammen mit der relativ hohen Adsorption an ApoA-I und ApoA-IV (insgesamt 34%) und der Eigenschaft als P-gp-Hemmer wurde dieser Formulierung ein großes Potential für einen Arzneistofftransport über die BHS zugeordnet (Göppert und Müller, 2005c). Ähnliches galt für SLN die mit Poloxamer 184, Polysorbat 80 (alleine bzw. in Verbindung mit Span 85), Tego Care 450, Lecithin oder TPGS oberflächenmodifiziert wurden. Allgemein wurde ein ähnliches Adsorptionsverhalten von ApoE und ApoA-IV festgestellt, dass sich als ausgeprägte Affinität zu hydrophoben Oberflächen darstellte.

5.1.3 Einfluss der Lipidmatrix auf die Adsorptionsmuster

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse des Adsorptionsverhaltens von Plasmaproteinen und insbesondere von Apolipoproteinen auf oberflächenmodifizierten SLN war zu erwarten, dass die Wahl der Lipidmatrix einen großen Einfluss auf das Proteinmuster hat, da die Apolipoproteine wohl fast ausschließlich auf dem Lipidkern der SLN adsorbieren. Dies wäre in Übereinstimmung mit der Literatur, denn eine Verschiebung der Zusammensetzung der Hauptbestandteile der Matrix von Lipoproteinen (Triglyceride und Cholesterylester) zugunsten des Cholesterols führte bei entsprechenden Emulsionen zu einer ausgesprochenen

Verringerung der Bindungskapazität von ApoE und zu einer entsprechenden Veränderung der Plasmaclearance (Saito et al., 2001). Zudem wurde gezeigt, dass die Konformation und damit die Rezeptoraffinität der Apolipoproteine von der Lipidzusammensetzung der Lipoproteine moduliert wird (Weisgraber, 1994). Aus diesem Grund wurden an dieser Stelle die Adsorptionsmuster von SLN mit anderen Matrixlipiden bestimmt und mit denen der entsprechend oberflächenmodifizierten Cetylpalmitat-SLN verglichen.

5.1.3.1 Compritol

Aufgrund vieler Vorteile ist Compritol ein häufig eingesetztes Matrixlipid für SLN (Müller et al., 1996b, Freitas und Müller, 1999, Müller und Olbrich, 1999, Schöler et al., 2000, Jennings und Gohla, 2001, Patravale und Ambarkhane, 2003). Auf Compritol-Basis konnten z. B. bei geeigneter Tensidwahl langzeitstabile SLN-Formulierungen erhalten werden (zur Mühlen, 1996). Durch den Anteil an Partialglyceriden besitzt es leicht amphiphile Eigenschaften (HLB = 2), was die gute Emulgierfähigkeit für einzuarbeitende Wirkstoffe erklärt. Außerdem wird Compritol im Blut langsamer durch Lipasen abgebaut als z. B. Cetylpalmitat, welches im Blut sehr schnell über unspezifische Enzyme abgebaut wird, wenn die Partikel nicht durch die Anlagerung ethoxylierter Tenside (z. B. Poloxamere) sterisch abgeschirmt sind. Deshalb führt Compritol eher zu einer prolongierten Freisetzung des Wirkstoffes aus SLN (Mehnert et al., 1997).

Tab. 5.1-15 zeigt die Zusammensetzung und die mittels LD, PCS und Zetasizer ermittelten physikochemischen Daten der untersuchten Formulierungen.

Tab. 5.1-15: Zusammensetzung, Größencharakteristik (LD und PCS) und ZP der untersuchten SLN

	1,2% Poloxamer 188, 10% Lipid, Lipid =	
	Cetylpalmitat (CP-SLN)	Compritol (CO-SLN)
D50% [μm]	0,335	0,290
D90% [μm]	0,530	0,468
D95% [μm]	0,590	0,518
D99% [μm]	0,704	0,624
PCS [nm]	275 \pm 3	239 \pm 4
PI	0,086	0,185
ZP [mV]	-25,8	-26,2

Beide Formulierungen enthielten 10% Lipid und wurden mit 1,2% Poloxamer 188 stabilisiert. Dies führte zu einer ähnlichen Größe bzw. Größenverteilung bei fast identischem ZP.

Abb. 5.1-47 zeigt die Proteinadsorptionsmuster von CP-SLN bzw. CO-SLN nach Inkubation in Humanplasma und anschließender Abtrennung mittels Gelfiltration (vgl. Kapitel 4.2.1.1.2 und Kapitel 5.1.1.1.1). Bei qualitativer Betrachtung wurde (überraschenderweise) eine große Ähnlichkeit der zwei Gele festgestellt.

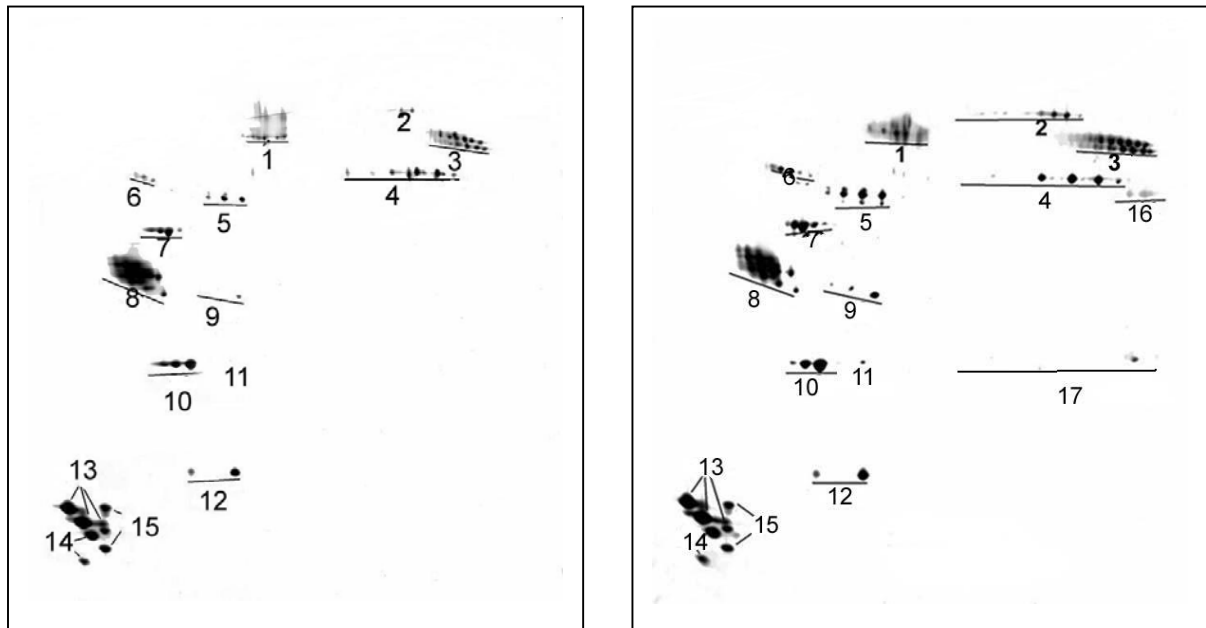


Abb. 5.1-47: 2-DE-Pherogramme von CP-SLN (links) bzw. CO-SLN (rechts). (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) α 1-Antitrypsin, (7) ApoA-IV, (8) ApoJ, (9) ApoE, (10) ApoA-I, (11) ProapoA-I, (12) Transthyretin, (13) ApoC-III, (14) ApoC-II, (15) ApoA-II, (16) IgG γ Kette, (17) Ig leichte Kette.

Um eine genauere Bewertung vornehmen zu können, wurde eine semiquantitative Analyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in einem Balkendiagramm in Abb. 5.1-48 dargestellt. Der optische Eindruck der Gele wurde bestätigt. Die Zusammensetzung der adsorbierten Proteine auf der Oberfläche der CO-SLN entsprach qualitativ und, unter Berücksichtigung der für die 2-DE typischen Standardabweichungen, auch quantitativ der CP-SLN.

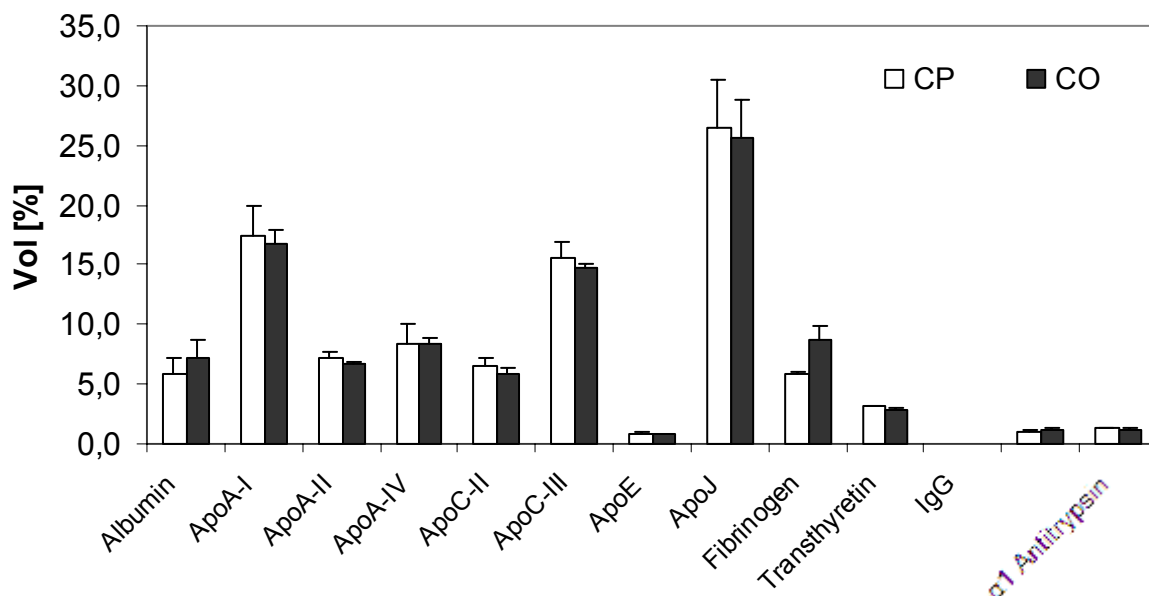


Abb. 5.1-48: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine auf CP-SLN bzw. CO-SLN. Die Mengen sind als prozentualer Anteil an der jeweils detektierten Proteing Gesamtmenge dargestellt, n = 2.

5.1.3.2 Andere Lipide

Um zu überprüfen, ob derartige Korrelationen der Ergebnisse auch bei Verwendung anderer Matrixlipide zu beobachten sind, wurden weitere SLN mit 1,2% Poloxamer 188 und 10% Lipid hergestellt (Tab. 5.1-16), die alle im Größenbereich von 300 nm lagen.

Tab. 5.1-16: Zusammensetzung, Größencharakteristik (LD und PCS) und ZP der untersuchten SLN

	1,2% Poloxamer 188, 10% Lipid		
	Witepsol E85 WI-SLN	Dynasan118 DY-SLN	Stearinsäure ST-SLN
D50% [μ m]	0,314	0,357	0,264
D90% [μ m]	0,523	0,540	0,449
D95% [μ m]	0,588	0,618	0,500
D99% [μ m]	0,724	0,789	0,595
PCS [nm]	310 \pm 6	306 \pm 4	296 \pm 4
PI	0,078	0,130	0,125
ZP [mV]	-27,7	-26,2	-30,6

Wohl bedingt durch den Säurecharakter des Matrixlipids, hatten ST-SLN das höchste ZP (-30,6 mV), jedoch lagen die anderen Formulierungen nicht weit davon entfernt (ca. -27 mV).

Die resultierenden Plasmaproteinadsorptionsmuster der drei Formulierungen nach Inkubation in Plasma und anschließender Abtrennung mittels Gelfiltration sind in Abb. 5.1-49 dem 2-D-Pherogramm von CP-SLN gegenüber gestellt.

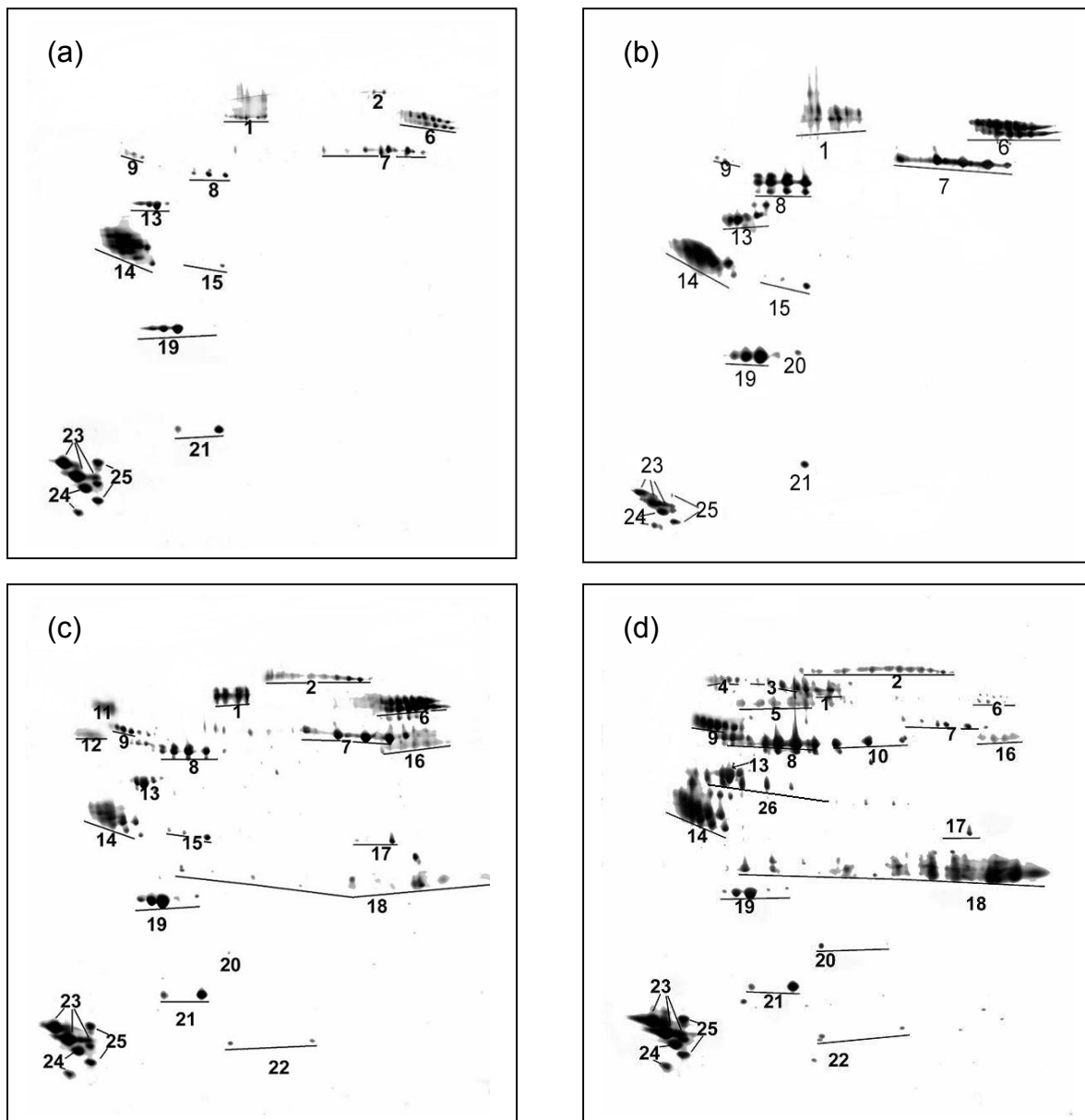


Abb. 5.1-49: 2-DE-Pherogramme von (a) CP-SLN, (b) WI-SLN, (c) DY-SLN bzw. (d) ST-SLN. (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) IgD δ Kette, (4) α 1-B-Glycoprotein, (5) IgA Kette, (6) Fibrinogen α Kette, (7) Fibrinogen β Kette, (8) Fibrinogen γ Kette, (9) α 1-Antitrypsin, (10) IgM μ s intermediär Kette, (11) α 1-Antichymotrypsin, (12) α 2-HS-Glycoprotein, (13) ApoA-IV, (14) ApoJ, (15) ApoE, (16) IgG γ Kette, (17) C4 γ , (18) Ig leichte Ketten, (19) ApoA-I, (20) Haptoglobin α 2 Kette, (21) Transthyretin, (22) Haptoglobin α 1 Kette, (23) ApoC-III, (24) ApoC-II, (25) ApoA-II, (26) Haptoglobin β Kette.

Während man beim Vergleich von Witepsol E85 (das ähnlich wie Compritol aus Partialglyceriden besteht) mit Cetylpalmitat noch am ehesten von einer Ähnlichkeit der Gele sprechen konnte, führten Dynasan und vor allem Stearinsäure nicht nur zu großen quantitativen, sondern auch zu qualitativen Unterschieden in den Proteinmustern (Göppert und Müller, 2004b). Dies wird in Abb. 5.1-50 verdeutlicht.

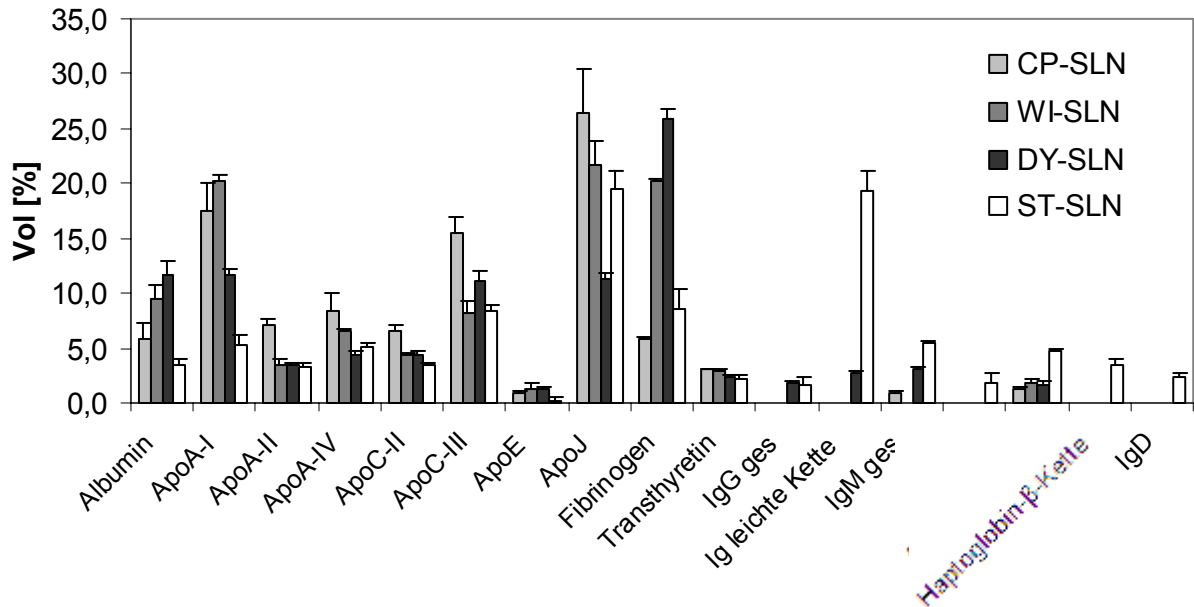


Abb. 5.1-50: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine auf CP-SLN, WI-SLN, DY-SLN bzw. ST-SLN. Die Mengen sind als prozentualer Anteil an der jeweils detektierten Proteingesamtmenge dargestellt, n = 2.

Auf allen drei Formulierungen war im Vergleich zu den CP-SLN bzw. zu den CO-SLN der Fibrinogen-Anteil erhöht. Dies war vor allem bei den DY-SLN der Fall (25,9%). Dagegen war bei ST-SLN der Anteil der Immunglobuline relativ hoch, die Immunglobuline A und D wurden sogar nur auf diesem Gel detektiert. Bedingt durch die Anwesenheit von IgG, IgM, IgA und IgD war hier folgerichtig auch der Anteil der Ig leichten Ketten relativ hoch (19,3%). Die Zunahme der Anteile anderer Proteine, wie Fibrinogen oder Immunglobulin, ging insgesamt auf Kosten des Anteils der Apolipoproteine, was in Abb. 5.1-51 verdeutlicht wird.

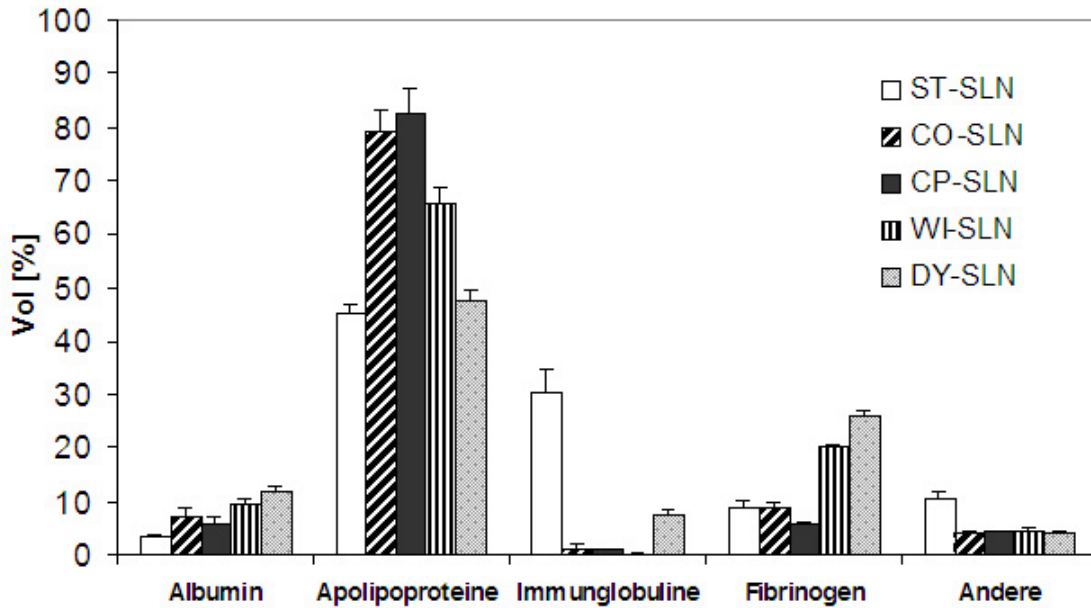


Abb. 5.1-51: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Hauptproteine (zusammengefasst in Gruppen) auf ST-SLN, CO-SLN, CP-SLN, WI-SLN bzw. DY-SLN (in der Reihe zunehmender Hydrophobie der Bulkware). Die Mengen sind als prozentualer Anteil an der jeweils detektierten Proteingesamtmenge dargestellt, n = 2.

Da der Oberflächenhydrophobie eine große Bedeutung bei der Proteinadsorption zukommt, wurden die Kontaktwinkel (KW) der einzelnen Lipide bestimmt (Tab. 5.1-17). Erwartungsgemäß war die Stearinsäure mit der polaren funktionellen Gruppe das in der Reihe hydrophilste (KW ca. 78°) und Dynasan als Triglycerid das in der Reihe lipophilste Lipid (KW ca. 100°). Dazwischen lagen, mit einem KW von ca. 90°, die Partialglyceride Compritol und Witepsol und das Wachs Cetylpalmitat.

Tab. 5.1-17: KW von Wasser auf den entsprechenden Lipiden. Mittelwert aus 10 Einzelmessungen (± Standardabweichung)

	Stearinsäure	Compritol	Cetylpalmitat	Witepsol	Dynasan
KW	77,8° ± 1,8°	86,5° ± 2,3°	87,8° ± 2,5°	91,2° ± 2,1°	100,4° ± 1,9°

Interessanterweise hatten CP-SLN und CO-SLN nicht nur ähnliche Proteinmuster, sondern die entsprechenden Lipide auch eine ähnliche Oberflächenhydrophobie.

Der Anteil der adsorbierten Apolipoproteine ließ sich jedoch nicht mit der Oberflächenhydrophobie der Lipide korrelieren (vgl. Abb. 5.1-51). Man hätte erwarten können, dass DY-SLN den höchsten Anteil an Apolipoproteinen adsorbiert und ST-SLN den geringsten. Stattdessen führten die beiden, in Ihrer Hydrophobie sehr

unterschiedlichen Lipide zu einem ähnlich geringen Anteil an Apolipoproteinen (47,6% vs. 45,1%). Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese beiden SLN-Typen, trotz dieser Übereinstimmung, sehr unterschiedliche Proteinmuster aufwiesen. So war bei DY-SLN der geringe Apolipoprotein-Anteil durch Fibrinogen bedingt, während bei ST-SLN der hohe Immunglobulin-Anteil die Ursache war.

Dagegen schien es bei Albumin und vor allem bei Fibrinogen einen Zusammenhang mit der Oberflächenhydrophobie zu geben, deren Anteile mit zunehmender Hydrophobie anstiegen (Abb. 5.1-51).

5.1.3.3 Zusammenfassung und Fazit

Bei chemisch sehr unterschiedlichen Lipiden wurde ein starker Einfluss der Lipidmatrix auf das resultierende Proteinadsorptionsmuster festgestellt (Göppert und Müller, 2004b). So war vor allem der hohe Anteil an Immunglobulinen auf ST-SLN sehr auffällig. Auch wurde festgestellt, dass im Hinblick auf eine hohe Adsorption von Apolipoproteinen (v. a. an ApoE) nicht das allgemeine Leitmotiv einer möglichst hohen Oberflächenhydrophobie ausgegeben werden kann. Eine Erhöhung der Hydrophobie führte zwar im Vergleich von ST-SLN mit CO-SLN bzw. CP-SLN tatsächlich zu einer Erhöhung des Anteils an Apolipoproteinen (bzw. speziell von ApoE und ApoA-IV), jedoch wurde deren Anteil bei noch höherer Hydrophobie des Matrixlipids (v. a. zugunsten des Fibrinogen-Anteils) wieder verringert (z. B. bei WI-SLN und DY-SLN).

Es wurden jedoch auch eindeutige Übereinstimmungen in den Mustern von CP-SLN mit CO-SLN und teilweise auch mit WI-SLN festgestellt. Deshalb kann festgehalten werden, dass die mit CP-SLN bestimmten Ergebnisse wohl auch auf andere SLN-Typen übertragbar sind, sofern dessen Matrixlipid ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen kann.

5.1.4 Adsorptionskinetik auf SLN

Für routinemäßige Studien wurde eine Inkubationszeit von 5 min gewählt, weil im Allgemeinen die ersten 5 min nach i. v. Injektion für die Organverteilung der Partikel *in vivo* entscheidend sind (O'Mullane et al., 1987). Es existieren jedoch einige Studien, die die Zeitabhängigkeit der Proteinadsorption auf Oberflächen beschreiben. So stellten die Arbeitsgruppen um Vroman (Vroman et al., 1980, Vroman und Adams, 1986) bzw. Brash (Brash, 1987, Wojciechowski und Brash, 1991, Brash und Ten Hove, 1993, Brash, 2000) fest, dass es auf vielen Oberflächen wie Glas oder Metall

eine Abfolge von Adsorption und Desorption verschiedener Proteine gibt, wobei die im Plasma höher konzentrierten Proteine mit der Zeit von solchen verdrängt werden, die zwar im Plasma geringer konzentriert sind, jedoch eine höhere Affinität zur jeweiligen Oberfläche aufweisen. Dieses Phänomen ist besonders stark im Subsekundenbereich ausgeprägt und wird (v. a. im Zusammenhang mit der Adsorption von Fibrinogen) „Vroman-Effekt“ genannt. Blunk et al. (1996) konnten mit Poloxamer 407- bzw. Poloxamine 908-oberflächenmodifizierten Polystyrol-Partikeln (PS 1000-407 bzw. PS 100-908) einen solchen „Vroman-Effekt“ in Form von kurzfristiger Albumin- bzw. Fibrinogenadsorption nachweisen. Albumin (Protein mit der höchsten Konzentration im Plasma, 3500-5000 mg/100ml) wurde von Fibrinogen (200-450 mg/100ml) verdrängt, welches wiederum von Apolipoproteinen, insbesondere von ApoC-III (12-14 mg/100 ml) und ApoJ (3,5-10,5 mg/100ml) verdrängt wurde. Für die gleichen Nanopartikel wurde auch eine starke Veränderung der Adsorptionsmuster im Minuten- und Stundenbereich gezeigt, was für das *In-vivo*-Verhalten von noch größerer Bedeutung sein dürfte (Blunk et al., 1996). Dagegen konnte von Harnisch und Müller (2000) für O/W-Emulsionen keine Verdrängung einer adsorbierten Proteinspezies von der Oberfläche durch eine andere gezeigt werden. Offenbar waren hier die Adsorptionsmuster zeitlich wesentlich stabiler, sodass auf den Emulsionströpfchen kein „Vroman-Effekt“ festgestellt werden konnte.

Da SLN wie Polymerpartikel eine feste Matrix besitzen, die chemische Natur der Lipidpartikel aber eher den Öltröpfchen gleicht, waren beide beschriebenen Adsorptionskinetiken auf der Oberfläche von SLN denkbar. Deshalb war es, im Hinblick auf eine Realisierung des Drug Targeting über ein bestimmtes Proteinmuster auf SLN nach Blutkontakt, unabdingbar, die Verweilzeit der Proteine auf den Partikeln zu bestimmen.

Zuerst sollte die Adsorptionskinetik auf SLN im Subsekundenbereich bestimmt werden, d. h. es sollte die Frage geklärt werden, ob bei SLN ebenfalls ein „Vroman-Effekt“ zu beobachten ist. Noch wichtiger erschien die Bestimmung der Adsorptionsmuster auf oberflächenmodifizierten SLN im Minuten- bzw. Stundenbereich, da z. B. für P407-SLN bzw. P908-SLN eine verlängerte Verweilzeit im Blut gezeigt werden konnte (Müller et al., 1996a) und es sehr wahrscheinlich erschien, dass es während dieser verlängerten Kontaktzeit zu Veränderungen im Proteinmuster kommt.

5.1.4.1 „Vroman-Effekt“ auf SLN

Die Bestimmung der von Vroman beschriebenen Veränderungen der Plasmaproteinadsorptionsmuster im Subsekundenbereich sind mit üblichen Analysemethoden kaum zu detektieren, da die Abtrennung der SLN mittels Gelfiltration und vor allem mittels Zentrifugation mit einer längeren Kontaktzeit der Partikel mit dem Plasma verbunden ist. Es wurde jedoch festgestellt, dass Fibrinogen detektierbar wird, wenn mit (stark) verdünntem Plasma gearbeitet wird (Brash und Ten Hove, 1984, Blunk et al., 1996, Cornelius und Brash, 1999, Price et al., 2001). Dies erklärt sich daraus, dass durch die Verdünnung die Konzentrationen der verdrängenden Komponenten mit hoher Affinität zur Oberfläche so stark verringert werden, dass die Verweilzeit von Fibrinogen, das nur aufgrund seiner höheren Konzentration adsorbiert, verlängert wird und eine Detektion möglich wird.

Deshalb wurden für die Simulation von frühen Momenten der Proteinadsorption verschiedene Plasmaverdünnungen als Inkubationsmedium verwendet. Da eine Abhängigkeit der Proteinadsorption von der herrschenden Partikelkonzentration und somit von der Größe der eingesetzten Partikeloberfläche beschrieben wurde (Pan und Liss, 1998a und b), war es wichtig, das gleiche Verhältnis von Partikeloberfläche pro ml Plasma zu untersuchen, wie in der Studie mit Polystyrol-Partikeln, um die Vergleichbarkeit der Kinetiken zu gewährleisten. Blunk et al. (1996) untersuchten die Polystyrol-Partikel in Verdünnungen von 0,08%, 0,8% und 80% Plasma. Aufgrund der etwa 15 mal höheren Oberfläche der zu untersuchenden TC-SLN im Vergleich zu den Polystyrol-Partikeln (1,1 m²/ml Inkubationsmedium vs. 0,075 m²/ml Inkubationsmedium) ergaben sich für die SLN entsprechend Verdünnungen von 1,2%, 12% und, aus Gründen der Probenaufbereitung, 75% Plasma. In Anlehnung an die Studie mit O/W-Emulsionen (Harnisch und Müller, 2000) wurden zusätzlich Plasmaverdünnungen von 33% bzw. 55% als Inkubationsmedien verwendet.

Die in Abb. 5.1-52 gezeigten Adsorptionsmuster resultierten aus einer fünfminütigen Inkubation in diesen Plasmaverdünnungen und anschließender Abtrennung der Partikel vom überschüssigen Plasma mittels Zentrifugation.

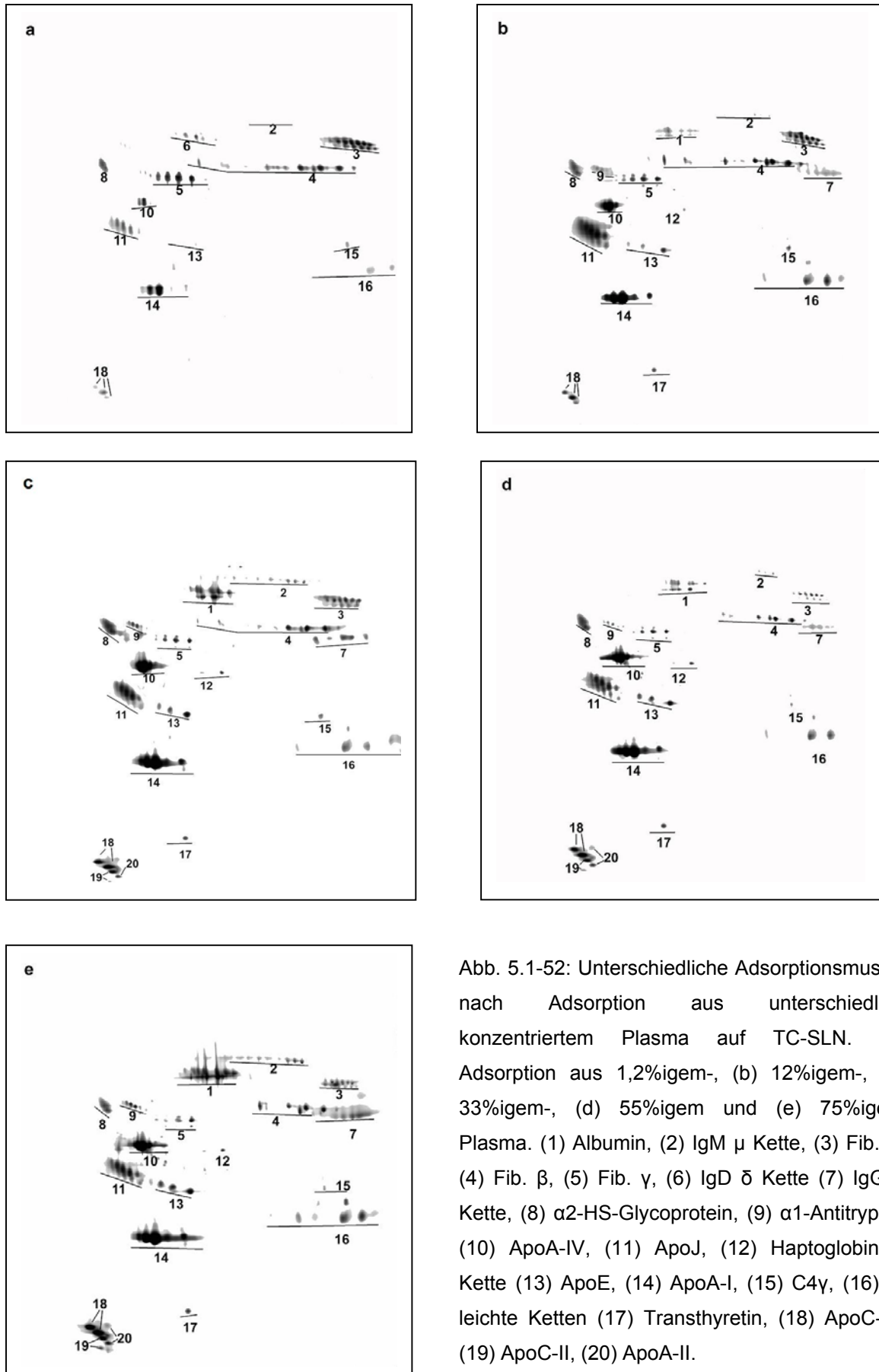


Abb. 5.1-52: Unterschiedliche Adsorptionsmuster nach Adsorption aus unterschiedlich konzentriertem Plasma auf TC-SLN. (a) Adsorption aus 1,2%igem-, (b) 12%igem-, (c) 33%igem-, (d) 55%igem und (e) 75%igem Plasma. (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) Fib. α , (4) Fib. β , (5) Fib. γ , (6) IgD δ Kette (7) IgG γ Kette, (8) α 2-HS-Glycoprotein, (9) α 1-Antitrypsin (10) ApoA-IV, (11) ApoJ, (12) Haptoglobin β Kette (13) ApoE, (14) ApoA-I, (15) C4 γ , (16) Ig leichte Ketten (17) Transthyretin, (18) ApoC-III, (19) ApoC-II, (20) ApoA-II.

Abb. 5.1-53 zeigt den quantitativen Vergleich der adsorbierten Hauptproteine auf den TC-SLN. Fibrinogen war nach Inkubation in 1,2%igem Plasma das Hauptprotein des Adsorptionsmusters mit einem relativen Anteil an der insgesamt detektierten Proteinmenge von 60%. Dieser Anteil wurde mit zunehmender Plasmakonzentration stetig verringert, sodass er bei der üblicherweise eingesetzten Plasmakonzentration (75%iges Plasma) nur noch 6,8% betrug (Abb. 5.1-53 unten). Umgekehrt stieg der Anteil der Apolipoproteine mit zunehmender Plasmakonzentration stetig an (von 25% nach Inkubation in 1,2%igem Plasma auf 68% nach Inkubation in 75%igem Plasma).

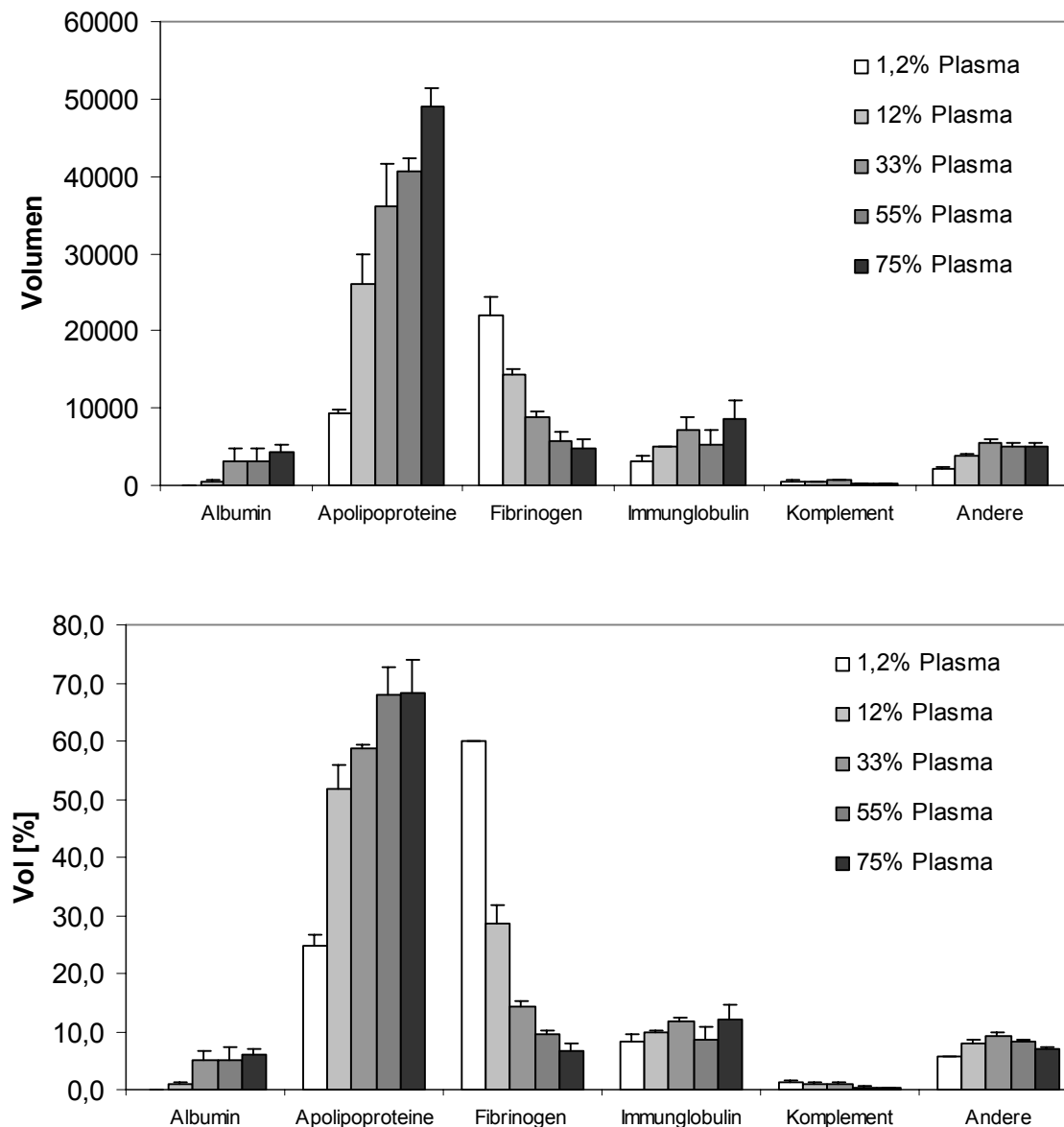


Abb. 5.1-53: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Hauptproteine auf TC-SLN nach Adsorption aus unterschiedlich konzentriertem Plasma. Dargestellt sind die absoluten Mengen in Volumen (oben) bzw. die relativen Mengen an der adsorbierten Proteingesamtmenge (unten), n = 2.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Vroman et al. (1980) und Blunk et al. (1996) findet demnach auch auf SLN eine vorübergehende Adsorption von Fibrinogen statt, welches dann wohl innerhalb von Sekunden oder sogar innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde von Apolipoproteinen (teilweise) verdrängt wird. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die hohe Affinität von Apolipoproteinen zu (hydrophoben) Oberflächen sein, die bereits in Kapitel 2.4 beschrieben wurde und die im Falle des „harten Proteins“ Fibrinogen nicht so stark ausgeprägt ist (Arai und Norde, 1990).

Überraschend war dagegen das festgestellte Adsorptionsverhalten von Albumin auf der Oberfläche von SLN. Im Gegensatz zu den Polystyrol-Partikeln adsorbierte es nicht als „erstes“ Protein bzw. in der größte Menge aus stark verdünntem Plasma, was aufgrund der höchsten Plasmakonzentration dieses Proteins zu erwarten gewesen wäre. Stattdessen stimmte das Adsorptionsverhalten von Albumin eher mit dem der Apolipoproteine überein, d. h. es kam zu einer Zunahme der absoluten und relativen Albuminmenge mit steigender Plasmakonzentration. Trotzdem kann man davon sprechen, dass auf SLN ein „Vroman-Effekt“ existiert, da dieser im engeren Sinne auch nur für Fibrinogen und nicht für Albumin beschrieben wurde (Vroman et al., 1980, Vroman und Adams, 1986).

Mit O/W-Emulsionen konnte hingegen durch Inkubation in verdünntem Plasma kein „Vroman-Effekt“ nachgewiesen werden (Harnisch und Müller, 2000). Mit Zunahme der Plasmakonzentration nahmen die absoluten Mengen der adsorbierten Proteine zu (v. a. Apolipoproteine, aber auch Immunglobuline und Albumin), während die relativen Anteile an der Gesamtmenge ungefähr gleich blieben. Fibrinogen wurde dabei nicht detektiert, auch nicht bei der niedrigsten Plasmakonzentration.

5.1.4.2 Adsorptionskinetik auf oberflächenmodifizierten SLN

Auch wenn die Erforschung der innerhalb der ersten Millisekunden stattfindenden Proteinadsorption aus akademischer Sicht sehr interessant ist, so ist doch die Bestimmung der Adsorptionskinetik nach mehreren Minuten bzw. Stunden, im Hinblick auf eine verlängerte Zirkulationszeit der Arzneistoffträger bzw. ein angestrebtes Drug Targeting, von weitaus größerer Bedeutung.

Deshalb wurden die Plasmaproteinadsorptionsmuster von Px407-SLN bzw. Px908-SLN (Zusammensetzung siehe Tab. 5.1-18) nach 30 sec, 5 min, 30 min bzw. 2 h Inkubation in Vollplasma und anschließender Abtrennung mittels Gelfiltration bestimmt. Abb. 5.1-54 zeigt die entsprechenden 2-DE-Gele für Px407-SLN.

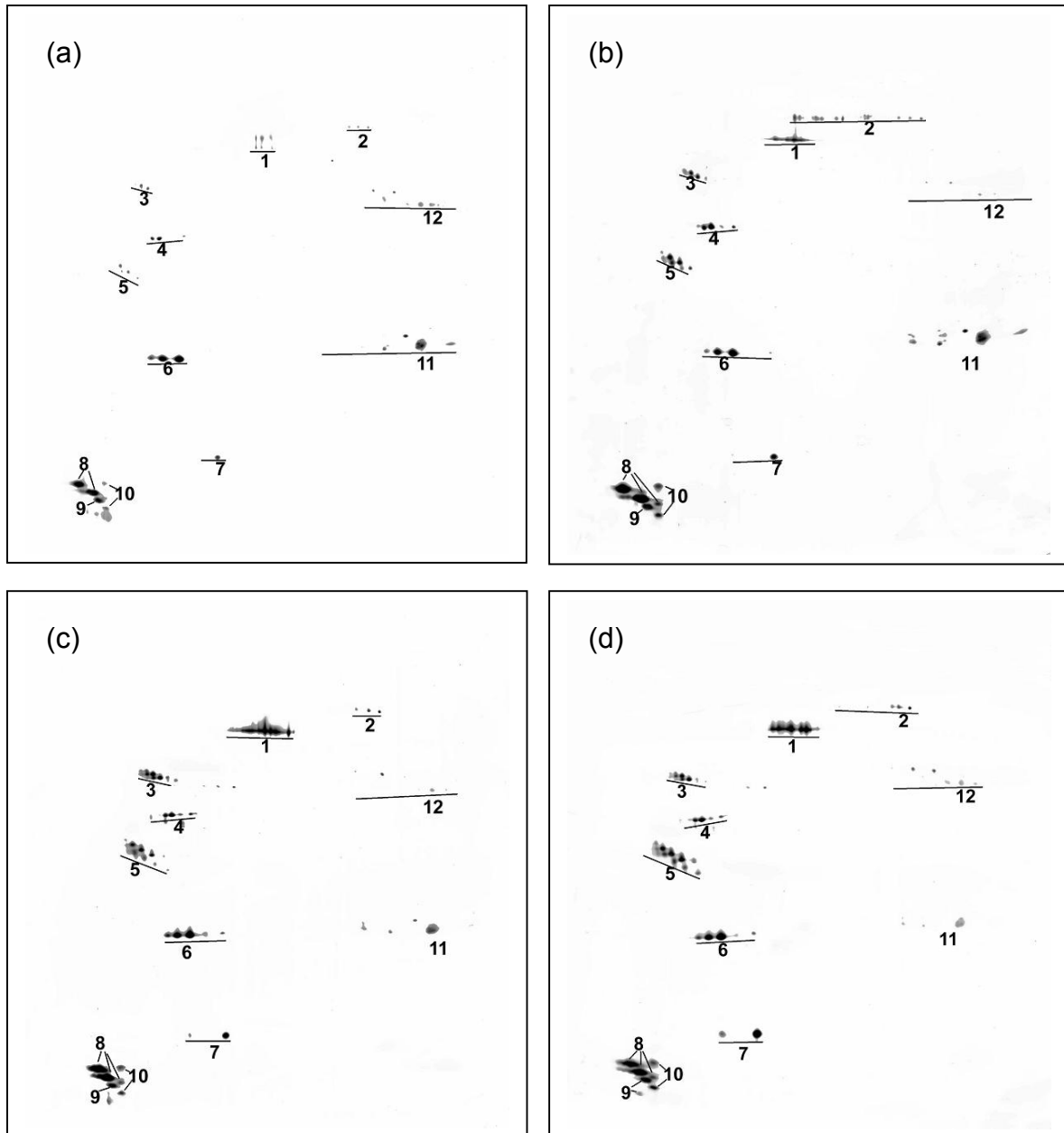


Abb. 5.1-54: Plasmaproteinadsorptionsmuster nach verschiedenen Inkubationszeiten auf Px407-SLN. Inkubationszeit: (a) 0,5 min, (b) 5 min, (c) 30 min, (d) 240 min. (1) Albumin, (2) IgM μ Kette, (3) α 1-Antitrypsin, (4) ApoA-IV, (5) ApoJ, (6) ApoA-I, (7) Transthyretin, (8) ApoC-III, (9) ApoC-II, (10) ApoA-II, (11) Ig leichte Ketten, (12) Ig γ Kette.

In Tab. 5.1-18 sind die absoluten und relativen Werte der adsorbierten Hauptproteine, sowie die Gesamtmengen der adsorbierten Proteine auf Px407-SLN bzw. Px908-SLN aufgelistet.

Tab. 5.1-18: Plasmaproteinadsorption auf Px407-SLN bzw. Px908-SLN nach unterschiedlicher Inkubationszeit. Die adsorbierten Mengen sind in absoluten Werten (Volumen) sowie als prozentualer Anteil an der jeweils detektierten Gesamtmenge angegeben (Vol [%]), n = 2

	System	5% Cetylpalmitat 2,5% Poloxamer 407 = Px407-SLN				5% Cetylpalmitat 2,5% Poloxamine 908 = Px908-SLN			
		Zeit	0,5 min	5 min	30 min	240 min	0,5 min	5 min	30 min
Albumin	Volumen	337 ± 61	806 ± 138	1713 ± 159	1889 ± 182	835 ± 33	1261 ± 85	1894 ± 178	3829 ± 310
	Vol [%]	2,9 ± 0,4	3,8 ± 0,7	7,6 ± 1,0	7,6 ± 1,1	6,0 ± 0,1	7,7 ± 0,7	9,6 ± 1,6	14,7 ± 0,6
ApoA-I	Volumen	2529 ± 83	2183 ± 382	3024 ± 380	2812 ± 169	3749 ± 293	3854 ± 248	5714 ± 384	5945 ± 161
	Vol [%]	21,3±1,0	10,4±1,8	13,2±1,4	11,3±1,3	26,8±0,6	23,5±1,0	28,6±0,4	22,9 ± 0,4
ApoA-II	Volumen	423 ± 2	888 ± 215	1213 ± 187	1437 ± 457	523 ± 82	577 ± 64	410 ± 237	587 ± 76
	Vol [%]	3,5 ± 0,1	4,2 ± 1,0	5,3 ± 0,7	5,7 ± 1,5	3,7 ± 0,4	3,5 ± 0,3	2,0 ± 1,0	2,2 ± 0,4
ApoA-IV	Volumen	676 ± 43	971 ± 5,9	1221 ± 174	1278 ± 133	1036 ± 54	1954 ± 71	1862 ± 141	3112 ± 361
	Vol [%]	5,7 ± 0,4	5,9 ± 0,1	5,3 ± 0,6	5,1 ± 0,3	7,5 ± 0,1	11,9 ± ,7	9,4 ± 1,5	11,9 ± 0,9
ApoC-II	Volumen	738 ± 29	1421 ± 107	1452 ± 46	1757 ± 480	916 ± 308	1204 ± 167	1459 ± 123	1060 ± 139
	Vol [%]	6,2 ± 0,2	6,7 ± 0,5	6,4 ± 0,1	7,0 ± 1,6	6,5 ± 1,8	7,4 ± 0,8	7,3 ± 0,0	4,1 ± 0,4
ApoC-III	Volumen	2746 ± 322	5962 ± 464	6529 ± 636	6278 ± 21	3003 ± 22	3312 ± 132	3302 ± 374	4275 ± 137
	Vol [%]	23,1± ,3	28,3±2,1	28,6±2,2	25,2±1,4	21,6±1,1	20,2±0,3	16,5± ,5	16,5 ± 0,3
ApoJ	Volumen	664 ± 43	1861 ± 193	2449 ± 341	3595 ± 736	2427 ± 226	2754 ± 73	3563 ± 442	5223 ± 174
	Vol [%]	5,6 ± 0,4	8,8 ± 1,0	10,7±1,3	14,4±2,2	17,5±2,6	16,8±0,0	17,8±0,8	20,1 ± 0,3
Trans- thyretin	Volumen	450 ± 112	634 ± 80	893 ± 50	2123 ± 254	1265 ± 107	1008 ± 16	1079 ± 268	1126 ± 121
	Vol [%]	3,8 ± 1,0	3,0 ± 0,4	3,9 ± 0,3	8,5 ± 0,6	9,1 ± 0,2	6,2 ± 0,1	5,4 ± 0,9	4,3 ± 0,7
IgG γ Kette	Volumen	453 ± 75	444 ± 86	192 ± 238	320 ± 124	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	Vol [%]	3,8 ± 0,6	2,1 ± 0,4	0,8 ± 1,1	1,3 ± 0,5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Ig leichte Ketten	Volumen	1289 ± 127	2472 ± 72	1254 ± 199	808 ± 29	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	Vol [%]	10,8±0,9	11,7±0,4	5,5 ± 1,0	3,2 ± 0,1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
IgM μ Kette	Volumen	860 ± 66	1861 ± 163	606 ± 135	696 ± 69	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	Vol [%]	7,2 ± 0,7	8,8 ± 0,8	2,7 ± 0,6	2,8 ± 0,4	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
α1- Antitrypsin	Volumen	397 ± 54	833 ± 279	1380 ± 49	1043 ± 48	200 ± 112	429 ± 146	705 ± 121	845 ± 90
	Vol [%]	3,3 ± 0,5	4,0 ± 1,3	6,0 ± 0,3	4,2 ± 0,4	1,4 ± 0,7	2,7 ± 1,0	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,2
Hapto- globin β	Volumen	n. d.	n. d.	480 ± 89	224 ± 135	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	Vol [%]	n. d.	n. d.	2,1 ± 0,4	0,9 ± 0,6	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gesamt	Volumen	11903 ± 195	20809 ± 302	22852 ± 476	24940 ± 1293	13954 ± 784	16353 ± 397	19989 ± 1632	26002 ± 1174

Tab. 5.1-18 und Abb. 5.1-55 zeigt, dass die Gesamtmenge der adsorbierten Proteine auf beiden Partikel-Sorten mit zunehmender Inkubationszeit stetig zunahm. Es wurde erwartet, dass diese Zunahme durch den Abbau der SLN im Plasma und der damit verbundenen Oberflächenvergrößerung bedingt war. Jedoch wurde durch PCS-Messungen der Partikel nach entsprechender Inkubationszeit gezeigt, dass die Partikelgröße nach 5 min nur gering abnahm und danach relativ konstant blieb (Tab. 5.1-19), sodass die kontinuierliche Zunahme der adsorbierten Proteingesamtmenge

mit zunehmender Inkubationszeit nicht durch eine Vergrößerung der Oberfläche erklärt werden kann. Wahrscheinlicher ist eher, dass zusätzlich Proteine auf der ersten Proteinschicht adsorbierten (Göppert und Müller, 2005b).

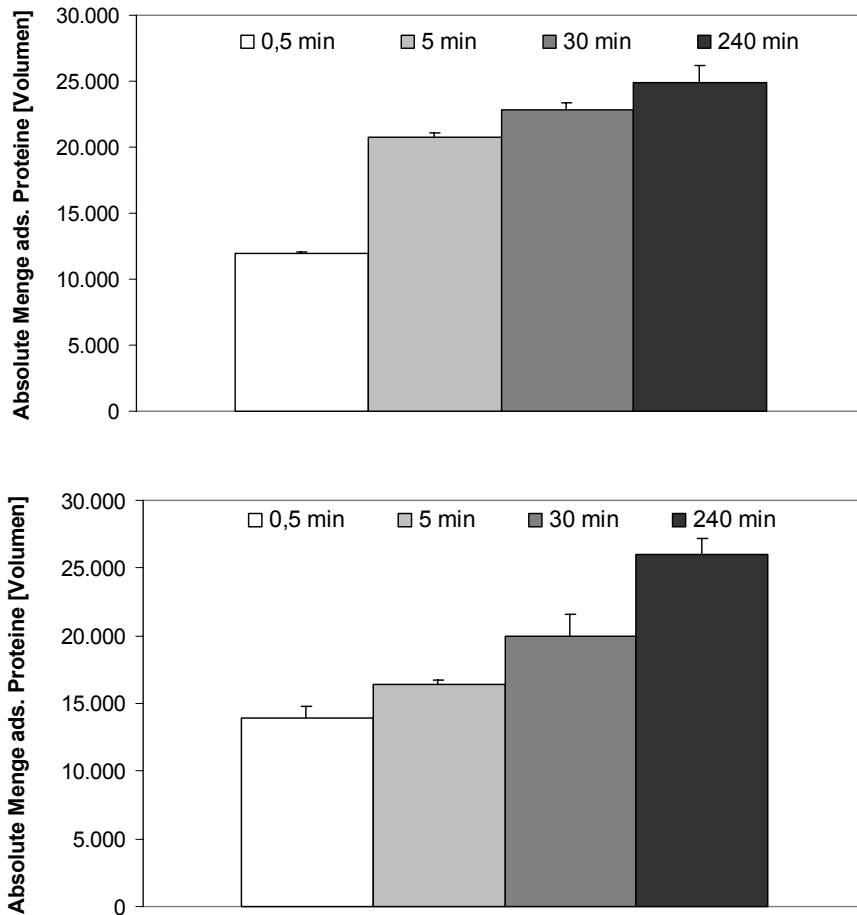


Abb. 5.1-55: Quantitativer Vergleich der absoluten Mengen adsorbierter Proteine auf Px407-SLN (oben) bzw. auf Px908-SLN (unten) nach verschiedenen Inkubationszeiten, n = 2.

Tab. 5.1-19: Mittlere Partikeldurchmesser (PCS), berechnete Partikeloberflächen und Polydispersitätsindices der untersuchten SLN in Abhängigkeit der Inkubationszeit in Humanplasma. Die Proben (SLN bzw. SLN in Plasma) wurden mit destilliertem Wasser auf ideale Streulichtintensitäten verdünnt

Inkubationszeit		0 min	5 min	30 min	240 min
Px407-SLN	PCS [nm]	263 ± 3	225 ± 4	225 ± 4	223 ± 4
	Oberfläche [m ²]	0,777	0,815	0,815	0,822
	PI	0,094	0,106	0,122	0,115
Px908-SLN	PCS [nm]	212 ± 4	204 ± 5	202 ± 3	205 ± 2
	Oberfläche [m ²]	0,865	0,899	0,908	0,895
	PI	0,120	0,120	0,158	0,139

Eine mögliche Erklärung für die Stabilität der Partikelgröße wäre eine Behinderung der Anlagerung der abbauenden Lipasen an die Oberfläche der SLN. Diese Behinderung käme zum einen durch die sterische Abschirmung der Oberfläche durch die Block-Copolymere und zum anderen durch die Anlagerung der Plasmaproteine, die bereits freie Plätze an der Oberfläche besetzen.

Diese Proteinadsorption verursachte zusätzlich eine Vergrößerung der Partikel. Durch die Überlagerung von Partikelgrößenverkleinerung und -vergrößerung kam es deshalb wohl auch zu der Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung (siehe PI, Tab. 5.1-19).

Neben der Zunahme der Proteingesamtmenge, kam es bei Px407-SLN auch zu einer Zunahme der absoluten Mengen an adsorbiertem ApoA-IV, ApoC-II und ApoC-III (Abb. 5.1-56a und Tab. 5.1-18), während ihre Anteile an der Gesamtmenge (unter Berücksichtigung der typischen Standardabweichungen) relativ konstant blieben (Abb. 5.1-56b und Tab. 5.1-18). ApoC-III war dabei, unabhängig von der Inkubationszeit, das dominierende Protein auf der Oberfläche von Px407-SLN. Des Weiteren kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme der absoluten und relativen Mengen an adsorbiertem Albumin, ApoA-II, ApoJ und Transthyretin (Abb. 5.1-56 und Tab. 5.1-18). Nur die relative Menge an ApoA-I wurde mit zunehmender Inkubationszeit verringert, wobei aber die absolute Menge an adsorbiertem ApoA-I relativ konstant blieb (Abb. 5.1-56 und Tab. 5.1-18).

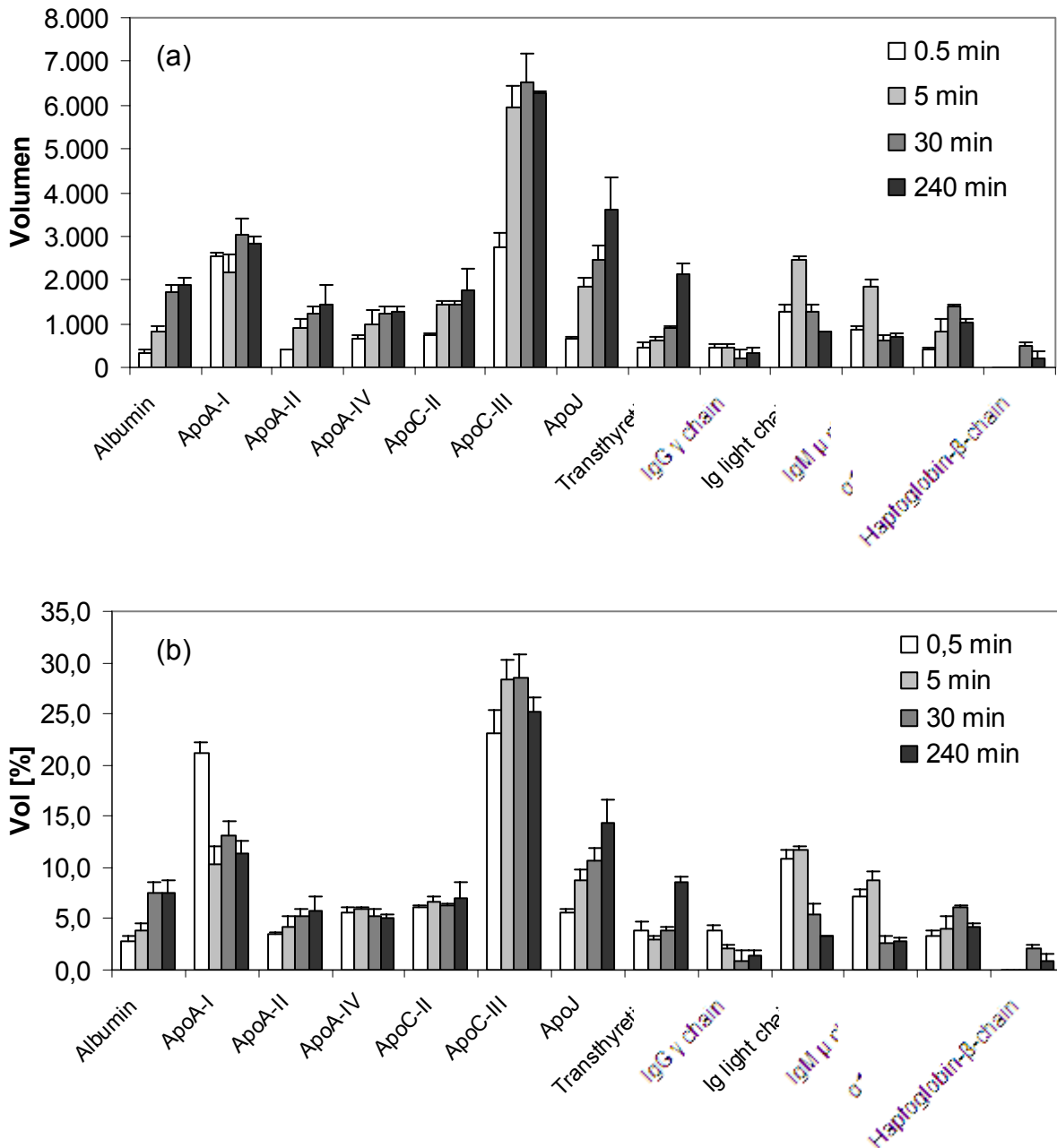


Abb. 5.1-56: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Hauptproteine auf Px407-SLN nach verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind (a) die absoluten Mengen bzw. (b) die relativen Anteile an der adsorbierten Proteingesamtmenge, n = 2.

Eine ähnliche Adsorptionskinetik wurde auf Px908-SLN festgestellt (Tab. 5.1-18 und Abb. 5.1-57). Auch hier nahm die absolute Menge an adsorbiertem ApoA-IV, ApoC-II, ApoC-III und zusätzlich an ApoA-I und ApoJ kontinuierlich zu, während die Anteile an der Gesamtmenge relativ konstant blieben. Übereinstimmend mit Px407-SLN war auch das Adsorptionsverhalten von Albumin und Transthyretin, mit einer Zunahme der absoluten bzw. relativen Menge mit zunehmender Inkubationszeit.

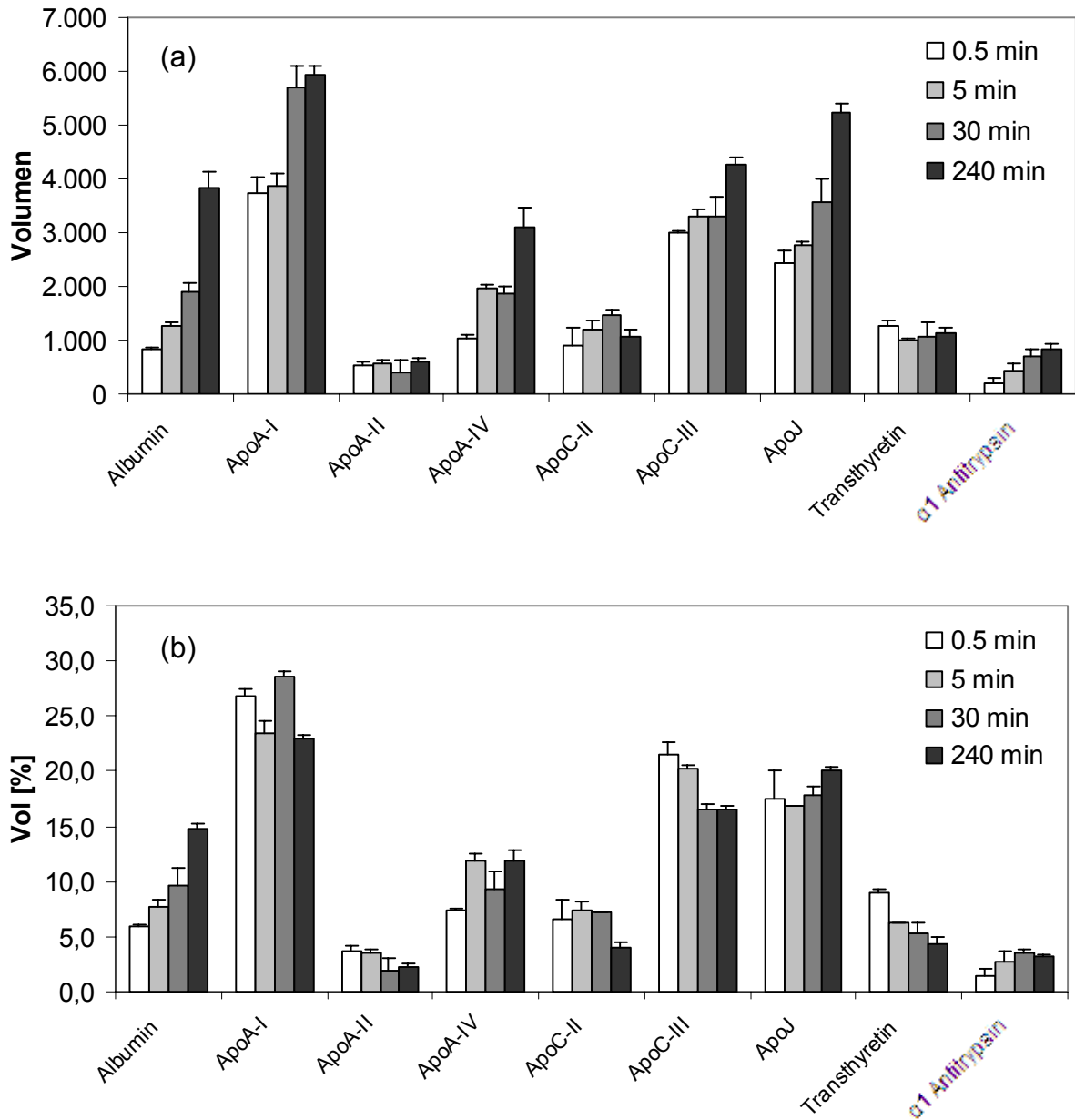


Abb. 5.1-57: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Hauptproteine auf Px908-SLN nach verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind (a) die absoluten Mengen bzw. (b) die relativen Anteile an der adsorbierten Proteingesamtmenge, n = 2.

Auf den oberflächenmodifizierten Polystyrol-Partikeln wurde dagegen nach entsprechenden Inkubationszeiten in Vollplasma eine völlig andere Adsorptionskinetik festgestellt (Blunk et al., 1996). Die Gesamtmenge der adsorbierten Proteine blieb mit zunehmender Inkubationszeit relativ konstant, jedoch veränderten sich in erster Linie die relativen Anteile der jeweiligen Apolipoproteine am Gesamtmuster und dies zum Teil sogar sehr stark. So nahm z. B. ApoC-III auf der Oberfläche von PS 1000-407 von 18% nach 0,5 min auf unter 1% nach 240 min drastisch ab (vgl.

PS 1000-908 von 32,5% auf 2%). Dagegen kam es zu einem verhältnismäßig starken Anstieg der ApoE-Menge von 0,1% nach 0,5 min auf 9% nach 240 min (vgl. PS 1000-908 von 0% auf 4,2%). Entsprechend nahm der Quotient ApoC-III/ApoE auf PS 1000-407 von 181 nach 0,5 min auf 0,09 nach 240 min ab (Faktor > 2000!) (Blunk et al., 1996), was zweifelsfrei eine hohe Bedeutung für das *In-vivo*-Verhalten erlangen kann.

5.1.4.3 Zusammenfassung und Fazit

Blunk et al. (1996) stellten bei Polystyrol-Partikeln sowohl im Subsekundenbereich („Vroman-Effekt“) als auch nach länger fortgeschrittener Kontaktzeit mit Plasma, eine Verdrängung zwischen den einzelnen Proteinen fest. Zuerst verdrängten die Apolipoproteine das Fibrinogen von der Oberfläche um sich dann gegenseitig, entsprechend der höchsten Affinität zur Oberfläche, zu verdrängen. Auch nach längerer Inkubation in Plasma (30 min bzw. 240 min) schien sich kein endgültiges Proteinadsorptionsmuster auszubilden. Dies hat die Konsequenz, dass die Muster auf diesen Partikeln während der Zirkulation im Blutkreislauf nicht stabil sind. Ein mögliches Drug Targeting nach dem Konzept der „Differenzierenden Adsorption“ wäre deshalb mit derartigen Partikeln schwierig zu realisieren. Anders sah es bei Lipidsystemen wie oberflächenmodifizierten O/W-Emulsionen oder SLN aus, deren Muster sich als viel weniger zeitabhängig darstellten. Bei SLN wurde zwar wie bei Polystyrol-Partikeln ein Vroman-Effekt festgestellt, jedoch spielte sich diese Verdrängung von Fibrinogen durch Apolipoproteine wohl auch im Subsekundenbereich ab. Die verlängerte Kontaktzeit mit Plasma wirkte sich bei diesen Systemen nur in einer Erhöhung der adsorbierten Proteingesamtmenge, jedoch nicht auf die Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht aus. Die Verhältnisse der Mengen adsorbierter Apolipoproteine blieben relativ konstant. Ein zielgerichteter Arzneistofftransport mit partikulären Trägern über ein bestimmtes Plasmaproteinadsorptionsmuster kann folglich wohl einfacher und besser mit Lipidsystemen wie SLN oder Fettemulsionen realisiert werden (Göppert und Müller, 2005b).

5.1.5 „Physiologische Stabilität“ von SLN

SLN sind, ähnlich wie Emulsionen, metastabile Systeme, bei denen es altersbedingt zu Größenzunahmen der Partikel kommen kann. Dabei kann es auch zu Veränderungen der Oberflächeneigenschaften und infolge dessen auch zu Veränderungen der Proteinadsorption und entsprechend der Organverteilung

kommen. Für Arzneistoffcarrier, die über ein bestimmtes Proteinmuster zu einem Drug Targeting führen sollen, ist es folglich nicht nur wichtig, dass die physikochemische Stabilität, sondern auch die „physiologische Stabilität“ gewährleistet ist. Deshalb ist es das Ziel, ein System zu entwickeln, das über einen längeren Zeitraum immer zum gleichen Proteinmuster bzw. in der Folge zu der gleichen Organverteilung führt, damit eine Lagerung eines entsprechenden Arzneimittels möglich wird.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Adsorptionsmuster von parenteralen Fettemulsionen mit verschiedener Ölphasenzusammensetzung und Ölkonzentration (Lipofundin N 10%/20% und MCT 10%/20%) über die Lagerzeit von drei Jahren reproduzierbar ausbildeten (Schmidt et al., 2001). Im folgenden sollte überprüft werden, inwieweit dies auch für die Proteinmuster von SLN zutrifft.

5.1.5.1 Vergleich der Adsorptionsmuster auf SLN verschiedenen Alters

In Tab. 5.1-20 sind die Zusammensetzungen und physikochemischen Daten der untersuchten SLN aufgelistet. Sie wurden bei Zimmertemperatur gelagert und die Größe, Größenverteilung bzw. das ZP nach bestimmten Zeitintervallen gemessen. Es zeigte sich, dass alle drei Formulierungen über den untersuchten Zeitraum physikochemisch stabil waren. Eine altersabhängige Zunahme der Größe bzw. eine Veränderung der Oberflächenladung war nicht ersichtlich.

Tab. 5.1-20: Größencharakteristik und Oberflächenladung der untersuchten SLN in Abhängigkeit von der Lagerzeit. MD = Mittlerer Durchmesser, LD-Werte sind in [μm] angegeben, Mo = Monate

	10% Cetylpalmitat, 1,2% X								
	X = Poloxamer 407			X = Poloxamer 188			X = Tego Care 450		
	P407-SLN			P188-SLN			TC-SLN		
	1 Tag	12 Mo	24 Mo	1 Tag	12 Mo	24 Mo	1 Tag	12 Mo	24 Mo
D50%	0,323	0,332	0,321	0,303	0,301	0,313	0,178	0,177	0,177
D90%	0,529	0,534	0,534	0,501	0,500	0,502	0,378	0,373	0,373
D95%	0,590	0,592	0,600	0,564	0,565	0,557	0,424	0,414	0,414
D99%	0,707	0,702	0,726	0,680	0,684	0,658	0,505	0,488	0,488
MD [nm]	256 \pm 4	258 \pm 4	254 \pm 5	244 \pm 4	241 \pm 3	241 \pm 5	223 \pm 5	222 \pm 8	221 \pm 3
PI	0,131	0,148	0,127	0,123	0,116	0,146	0,107	0,147	0,141
ZP [mV]	-19,4	-17,8	-18,9	-26,8	-25,9	-27,2	-42,1	-41,8	-42,0

Die ausgewählten Formulierungen wurden direkt am Tag nach deren Herstellung in Humanplasma inkubiert, um deren Plasmaproteinadsorptionsmuster zu bestimmen. Zusätzlich wurde untersucht, ob bzw. inwieweit sich das Adsorptionsmuster nach 12 bzw. 24 Monaten Lagerung im Vergleich zum „Ursprungsadsorptionsmuster“ veränderte. Abb. 5.1-58 zeigt exemplarisch die entsprechenden drei 2-DE-Gele von P407-SLN. Unter qualitativer Betrachtung wurden keine Unterschiede der adsorbierten Proteinspezies erkannt. Um zu überprüfen, ob sich die Mengenverhältnisse der adsorbierten Proteine altersabhängig verschoben, wurde eine semiquantitative Analyse durchgeführt, deren Ergebnis in Abb. 5.1-59 dargestellt ist.

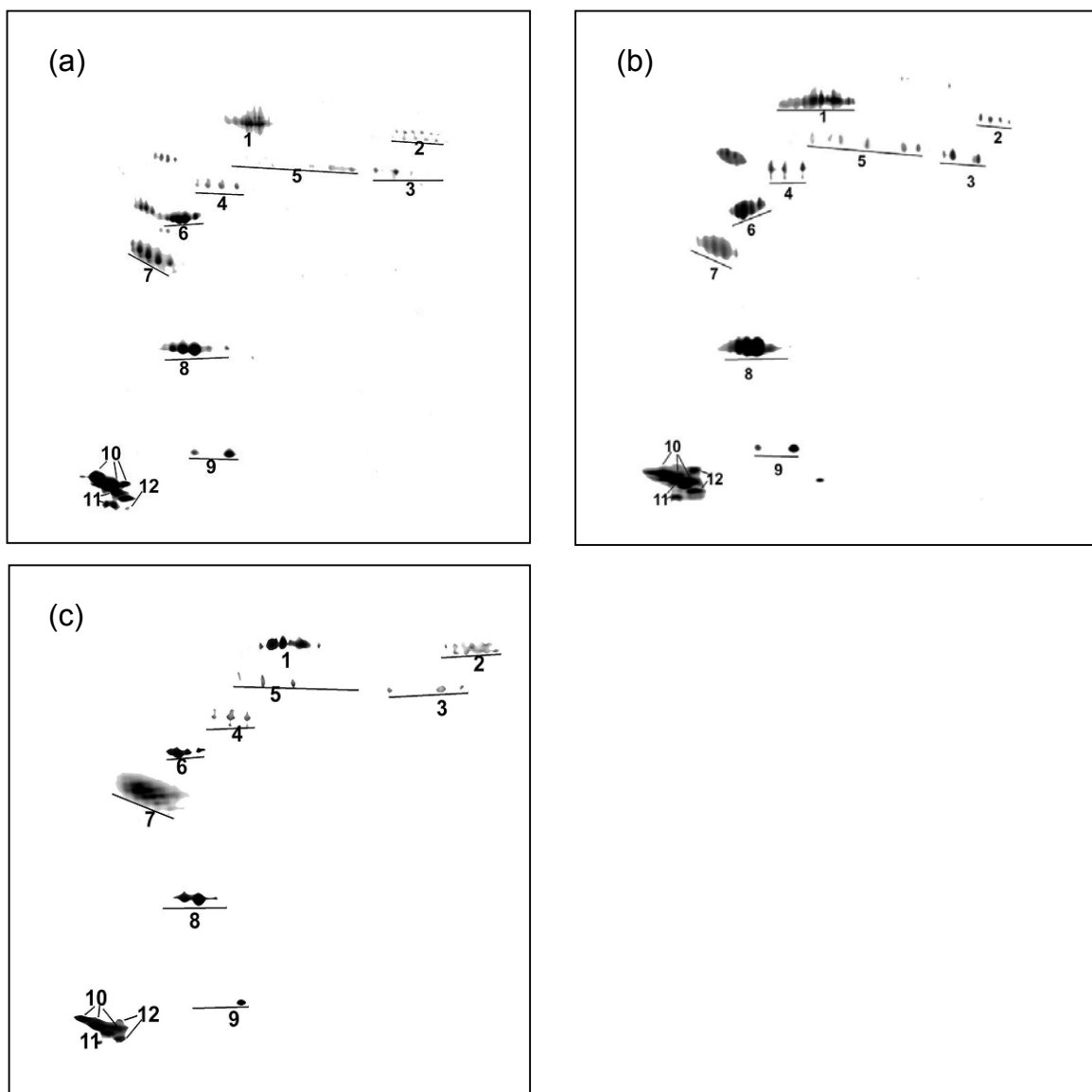


Abb. 5.1-58: 2-D-Pherogramme von P407-SLN. Untersuchung des Einflusses der Lagerzeit: (a) frisch hergestellt, (b) 12 Monate, (c) 24 Monate. (1) Albumin, (2) Fibrinogen α Kette, (3) Fibrinogen β Kette, (4) Fibrinogen γ Kette, (5) ApoH, (6) ApoA-IV, (7) ApoJ, (8) ApoA-I, (9) Transthyretin, (10) ApoC-III, (11) ApoC-II, (12) ApoA-II.

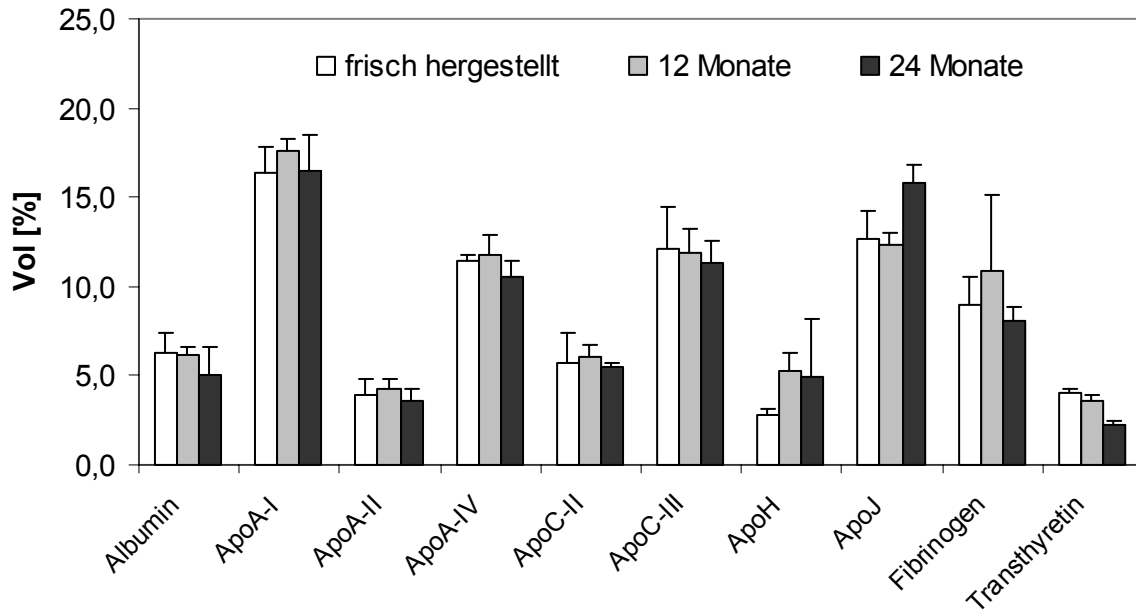


Abb. 5.1-59: Hauptproteine adsorbiert auf P407-SLN nach unterschiedlicher Lagerzeit. Y-Achse: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Adsorptionsmuster, n = 2.

Es konnte festgestellt werden, dass während der ersten zwei Jahre (unter Berücksichtigung der typischen Standardabweichungen) keine altersbedingte Veränderung der Proteinadsorption auf P407-SLN stattfand. Die jeweiligen Werte konnten, mit Ausnahme von ApoJ, wo es zu einem leichten Anstieg nach zwei Jahren kam (von 12,7% auf 15,8%), sehr gut reproduziert werden.

Das gleiche galt für die nach den gleichen Zeitabständen untersuchten P188-SLN (Abb. 5.1-60) bzw. TC-SLN (Abb. 5.1-61).

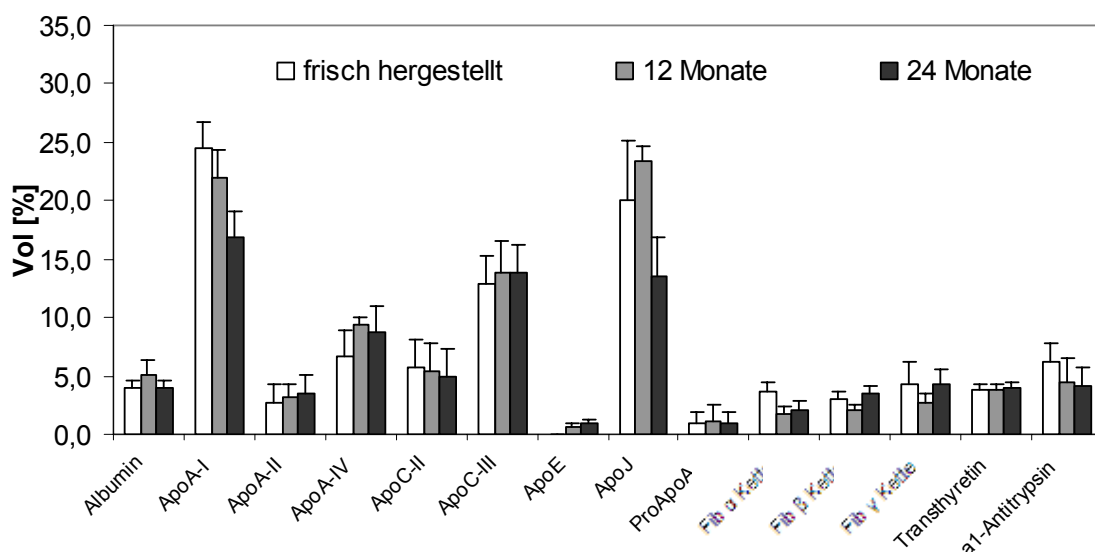


Abb. 5.1-60: Hauptproteine adsorbiert auf P188-SLN nach unterschiedlicher Lagerzeit. Y-Achse: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Adsorptionsmuster, n = 2.

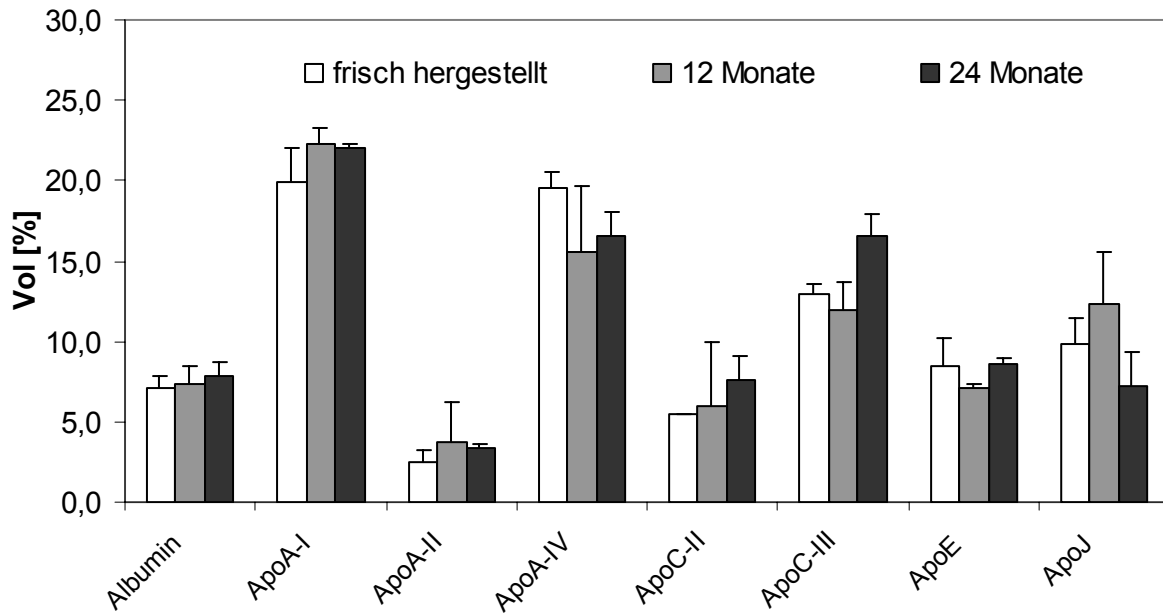


Abb. 5.1-61: Hauptproteine adsorbiert auf TC-SLN nach unterschiedlicher Lagerzeit. Y-Achse: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Adsorptionsmuster, n = 2.

Bei P188-SLN wurden lediglich Unregelmäßigkeiten bei der Adsorption von ApoA-I (kontinuierlicher Rückgang von 24,5% auf 16,9%) und ApoJ (zuerst Anstieg von 20,1% auf 23,4% dann Abfall auf 13,5%) festgestellt. Auch TC-SLN zeigten die größten Schwankungen bei den Werten von ApoJ. Die Ursache hierfür blieb unklar, jedoch lässt sich aufgrund der erzielten Gesamtergebnisse festhalten, dass die Adsorptionsmuster der untersuchten SLN im Großen und Ganzen über zwei Jahre sehr stabil waren (Göppert et al., 2005).

Tab. 5.1-21 und Abb. 5.1-62 zeigen, dass auch die (im Hinblick auf das Gehirn-Targeting) vermeintlich beste Formulierung, P235-SLN, kaum altersbedingte Veränderungen hinsichtlich der physikochemischen Eigenschaften bzw. der Proteinadsorption zeigte.

Tab. 5.1-21: Größencharakteristik und ZP von P235-SLN in Abhängigkeit von der Lagerzeit

	frisch hergestellt	6 Monate	18 Monate
D50% [μm]	0,280	0,288	0,293
D90% [μm]	0,458	0,461	0,459
D95% [μm]	0,512	0,512	0,507
D99% [μm]	0,613	0,604	0,604
Mittlerer Durchmesser [nm]	237 \pm 3	237 \pm 5	241 \pm 5
PI	0,072	0,083	0,134
ZP [mV]	-28,8	-29,1	-29,0

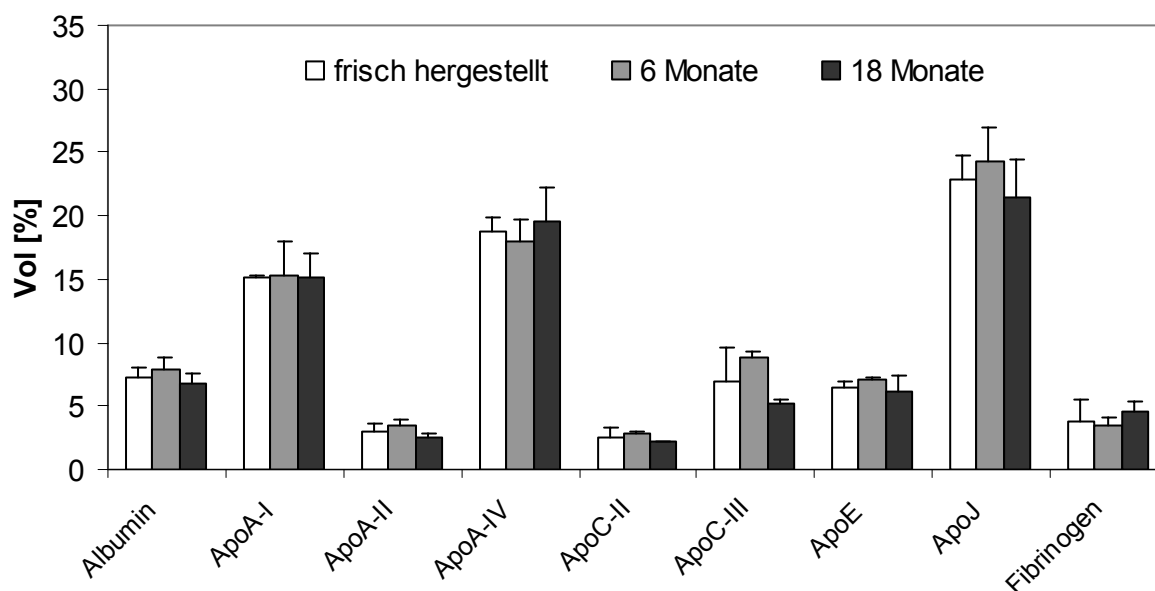


Abb. 5.1-62: Hauptproteine adsorbiert auf P235-SLN nach unterschiedlicher Lagerzeit. Y-Achse: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Adsorptionsmuster, n = 2.

Sowohl der relativ hohe Wert von ApoE als auch der, im Vergleich zu den anderen Formulierungen, sehr niedrige Wert von ApoC-II konnte, während der untersuchten Lagerzeit, nach Inkubation in Plasma und anschließender 2-DE gut reproduziert werden.

5.1.5.2 Zusammenfassung und Fazit

Es ist zwar noch nicht geklärt, inwieweit sich auch kleinste Veränderungen des Adsorptionsmusters auf die Organverteilung auswirken. Die bisher ermittelten Ergebnisse mit SLN deuten jedoch sehr darauf hin, dass im Falle einer physikochemischen Stabilität auch die „physiologische Stabilität“ gewährleistet ist, da

die Proteinadsorptionsmuster unterschiedlicher SLN-Formulierungen über mindestens zwei Jahre stabil waren (Göppert et al., 2005). Diese Feststellung bildet eine wichtige Grundlage für die gezielte Entwicklung von SLN als Arzneistoffcarrier über die BHS.

5.2 Plasmaproteinadsorption auf Fettemulsionen

5.2.1 Xenon als Narkosegas – Vorteile und Problemstellung

Xenon wurde 1898 von den Chemikern Sir William Ramsay und Morris Travers durch Experimente mit flüssiger Luft entdeckt (Reyle-Hahn und Rossaint, 2000). So wie auch Krypton und Neon (die kurz zuvor von den beiden Chemikern entdeckt wurden) gehört Xenon in die Gruppe der Edelgase, ist aber im Vergleich zu diesen in der Atmosphäre in weitaus geringerer Konzentration vorhanden (8×10^{-6} Vol.-% entspricht 8 ml Xenon in 100 m³ Luft, insgesamt ca. 400 Mio. Tonnen) (Gäbler und Schmidt, 1999). Das farb-, geruch- und geschmacklose Gas ist fünfmal schwerer als Luft, flüssig bei -108°C und fest bei -112°C (Messer, 2000). Auf seine analgetische Wirkung wurde man bereits Ende der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts aufmerksam (Behnke und Yarborough, 1938), bevor es gut zehn Jahre später zum ersten Mal am Patienten erprobt wurde (Cullen und Gross, 1951). Seitdem wurde es nur vereinzelt in klinischen Versuchen zu Narkosezwecken eingesetzt (Reyle-Hahn und Rossaint, 2000).

Der Wirkmechanismus von Xenon wird mit einer Hemmung des spannungsabhängigen NMDA-Rezeptors erklärt (Franks et al., 1998, Reyle-Hahn und Rossaint, 2000). Darin liegt seine hohe analgetische Potenz begründet, die z. B. auch der Hauptvorteil des Injektionsnarkotikum Ketamin (Ketanest[®], ebenfalls ein NMDA-Rezeptor-Antagonist) ist. Andere Inhalationsnarkotika wie Halothan (Fluothane[®]) wirken kaum analgetisch und selbst das in der Literatur als stark analgetisch beschriebene Lachgas (Distickstoffoxid) (Mutschler, 2001) hat eine geringere analgetische Potenz als Xenon. So war in einer Studie der Fentanyl-Verbrauch in der Lachgas-Gruppe fünfmal höher als in der Xenongruppe (Lachmann et al., 1990). Da diese Schmerzhemmung, ähnlich wie bei Ketamin, postnarkotisch noch Stunden anhält, kann die Dosis anderer Analgetika bei einer Narkose verringert werden.

Außer der sehr starken Analgesie erfüllt Xenon weitere Kriterien eines idealen Narkosegases:

Es ist sehr sicher im Umgang, denn es ist weder brennbar noch explosiv (im Gegensatz zum (mittlerweile obsoleten) Diethylether). Zusätzlich stellt es keine Umweltbelastung dar, wie z. B. Halothan (Ozonschäden, da halogener Kohlenwasserstoff) oder Lachgas (potentes Treibhausgas) (Gäbler und Schmidt, 1999).

Aufgrund des vergleichsweise sehr kleinen Blut/Gas-Verteilungskoeffizienten (B/G-VK) von 0,14 (den kleinsten B/G-VK der derzeit verwendeten Inhalationsnarkotika hat Desfluran (Suprane[®]) mit 0,4 (Mutschler, 2001)), weist Xenon eine sehr schnelle Einschlaf- und Aufwachcharakteristik mit leichter Steuerbarkeit auf (Rossaint et al., 2003). Eine lange Abklingphase ist für den Patienten sowohl subjektiv unangenehm (Erbrechen, Husten) als auch objektiv ungünstig wegen der erhöhten postoperativen Komplikationsgefahr. Eine Xenonnarkose belastet den Patienten auch deshalb weniger, weil es zu einer verminderten Ausschüttung von Stresshormonen (Adrenalin, Cortisol) kommt (Gäbler und Schmidt, 1999).

Auch die kardialen Nebenwirkungen, die bei anderen Inhalationsnarkotika beobachtet werden, entfallen bei einer Xenonnarkose. Halogenierte Ether (Enfluran, Isofluran) und Halothan besitzen einen negativ inotropen und Catecholamin-sensibilisierenden Effekt am Herzen, mit der Gefahr von Rhythmusstörungen, die bis zum Kammerflimmern gehen können.

Des Weiteren besitzt das Edelgas auch keine organspezifische Toxizität und wird nicht metabolisiert. Bei wiederholter Halothannarkose bzw. bei höheren Konzentrationen kann es dagegen infolge toxischer Reaktionen (Biotransformationsrate bis zu 20%) zur Leberschädigung kommen („Halothanhepatitis“) (Mutschler, 2001).

Angesichts dieser Vielzahl an Vorteilen von Xenon als Narkosegas muss es natürlich auch Nachteile geben, die erklären, warum es (noch) nicht im klinischen Alltag eingesetzt wird. Ein Nachteil ist die bereits erwähnte hohe Dichte des Gases, die zu einer Beeinträchtigung der Lungenmechanik führen kann (Rossaint et al., 2003). Deshalb sollte ein Einsatz bei Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen nicht erfolgen. Außerdem kann es bisher nicht als Monoanästhetikum angewendet werden, da die Elimination über die Lunge bei Beatmung des Patienten eine tiefe Narkose nicht zulässt (Georgieff et al., 1997). Der Hauptgrund für den fehlenden Durchbruch sind aber die enormen Herstellungskosten. Dazu kommt der hohe Verbrauch bei einer Inhalationsnarkose, der nicht nur wegen der hohen Kosten problematisch ist, sondern auch angesichts der erwähnten knappen Ressourcen in der Atmosphäre (Georgieff et al., 1997). Die Gewinnung des Edelgases aus der Luft ist sehr aufwändig (Luftverflüssigung nach dem Linde-Verfahren und anschließende fraktionierte Destillation) und kostet entsprechend ca. 10 \$ pro Liter und ist damit

2000 mal teurer als Lachgas (Gäbler und Schmidt, 1999). Xenon bleibt dennoch nicht nur aus medizinischer Sicht interessant, weil zum einen durch das deutlich schnellere, komplikationslose Erwachen die teure intensiv-medizinische Nachbetreuung entfallen kann und zum anderen, weil durch die analgetische Wirkung von Xenon die postoperative Schmerztherapie reduziert werden kann. Um den Xenon-Verbrauch bei einer Inhalationsnarkose zu reduzieren, wurde ein geschlossenes System und eine Recyclingtechnik entwickelt (Lynch et al., 2000). Für eine zweistündige Narkose werden mit dieser Methode aber immer noch ca. 12 Liter Xenon benötigt (Brunner, 1999). Die Kosten für eine solche Narkose werden auf ca. 400-500 Euro geschätzt (Brunner, 1999), was im Vergleich zu einer Lachgas-Narkose (ca. 30 \$ (Goto et al., 2003)) immer noch zu teuer ist.

Die Lösung dieses Wirtschaftlichkeitsproblems könnte die Kopplung von Xenon an eine Fettemulsion und der Einsatz als Injektionsnarkotikum sein. Die Arbeitsgruppe um Georgieff konnte zeigen, dass Xenon in Abbolipid ebenfalls den NMDA-Rezeptor hemmt (Weigt et al., 2003) und nur noch ca. 150 ml einer solchen Emulsion für eine zweistündige Narkose erforderlich sein können (Georgieff et al., 1997, Brunner, 1999, Georgieff et al., 2003). Xenon könnte so in einer etwa 100fach geringeren Dosis appliziert werden und die Kosten auf ca. 15 Euro pro Narkose gesenkt werden (Brunner, 1999).

Um eine optimale Formulierung für das Edelgas zu finden, wurde von Frau Dr. Ilona Buttle in unserem Arbeitskreis ein Rezepturscreening durchgeführt. Zusätzlich wurden Xenon-beladene Fettemulsionen *in vivo* am Schwein, von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Georgieff an der Universitätsklinik für Anästhesiologie in Ulm, getestet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Plasmaproteinadsorptionsmuster auf diesen Fettemulsionen zu bestimmen. Es sollte untersucht werden, inwieweit eine Modifikation der Oberfläche zu einer bevorzugten Anlagerung von ApoE führen kann, um so einen bevorzugten Transport von Xenon über die BHS zu ermöglichen.

5.2.2 Entwicklung einer Formulierung für das Narkosegas Xenon

Im folgenden sollen nur die wichtigsten Ergebnisse beschrieben werden, die im Zusammenhang mit der durchgeführten 2-DE-Analyse stehen. Für eine ausführliche Darstellung der Methoden und Ergebnisse der Versuchsreihen sei auf die Dissertation von Frau Dr. Buttle (2004) verwiesen.

Für die Entwicklung einer injizierbaren Formulierung war es wichtig, eine fehlende bzw. zumindest langsame Ausgasungskinetik zu erreichen, um die Gefahr einer Gasembolie zu verhindern.

Wie bereits einleitend in Kapitel 2.3 erwähnt, ist es bei parenteralen Arzneiformen zusätzlich immer wichtig, den mikropartikulären Anteil möglichst gering zu halten. Partikel mit einem größeren Durchmesser als Erythrozyten (ca. 7,5 µm) bergen die Gefahr einer Embolie durch Verstopfung der pulmonalen Gefäße. Daher wird von vielen Autoren der Standpunkt vertreten, dass Partikel größer 5-6 µm vermieden werden sollten (Geyer et al., 1951, Müller, 1998, Driscoll et al., 2001, Bauer et al., 2002). Allerdings können sich fettartige Partikel (v. a. Öltröpfchen) der Form der Kapillaren anpassen und diese so passieren (Burnham et al., 1983), so dass einzelne Partikel über 5 µm durchaus tolerierbar sind. Der Anteil an Öltröpfchen > 2 µm ist in den marktüblichen parenteralen Emulsionen wie Abbolipid trotzdem sehr gering, auch weil Emulsionen mit mehreren größeren Fetttröpfchen (0,4% > 5 µm) eher Instabilitäten aufweisen (Driscoll et al., 2001).

Eine weitere Zielvorgabe war eine hohe Beladung mit Xenon, um ein geringes Applikationsvolumen zu erhalten.

Die Auswahl aller Bestandteile beschränkte sich auf solche, die von den Arzneibüchern bzw. Zulassungsbehörden für parenterale Zwecke freigegeben sind. Fettemulsionen an sich bewirken zwar keine Anästhesie, ermöglichen aber, dass Injektionsnarkotika in ihrer Dosierung herabgesetzt werden können (z. B. Propofol) (Dutta und Ebling, 1997) oder in ihrer Toxizität reduziert werden (z. B. Halothan) (Musser et al., 1999). Außerdem wurde für Fettemulsionen (v. a. für Abbolipid (Weigt et al., 2004)) eine Reduktion der provozierten NMDA-Antwort nachgewiesen. Auch deshalb wurde Abbolipid 10% als Basisemulsion für Xenon als Narkosegas ausgewählt (Zusammensetzung siehe Tab. 5.2-1).

Tab. 5.2-1: Zusammensetzung von Abbolipid® 10%. LCT = Langkettige Triglyceride

Produkt	Ölphase	Fettgehalt [%]	Eilecithin [%]	Hersteller
Abbolipid® 10%	LCT/Distelöl (1:1)	10	0,74	Abbott GmbH (Wiesbaden)

Es wurde versucht, durch Zusatz von Tensiden und anschließender Hochdruck-homogenisation der Basisemulsion (BE) die Teilchengröße zu reduzieren. Dieses Ziel wurde erreicht, jedoch wurde die Vermutung einer erhöhten Xenon-Löslichkeit

mit einer Vergrößerung der Oberfläche nicht bestätigt (Tab. 5.2-2). Trotz einer Vergrößerung der Oberfläche stieg die Löslichkeit nicht oder nur unwesentlich an.

Tab. 5.2-2: Zusammensetzung und Produktdaten der untersuchten Rezepturen: Mittlere Tröpfchengröße und entsprechende Löslichkeiten von Xenon in der Emulsion unter 1 bar Druck. UH = unhomogenisiert, H = homogenisiert: 15 Zyklen bei 1500 bar, 45°C (Buttle, 2004)

Rezeptur- name	Zusammensetzung: Abbolipid 10% +		Herstellung	PCS [nm]	1 bar Xe [µl/ml]
	Eilecithin [%]	Polysorbat 80 [%]			
BE	-	-	UH	264	320
BE(H)	-	-	H	174	320
2Ei	2	-	H	124	360
2PS80	-	2	H	139	340

Eine Möglichkeit, die Löslichkeit von Xenon zu erhöhen, bestand darin, den Fettgehalt der Emulsionen zu erhöhen. So bewirkte die Verdopplung des Fettgehalts (Abbolipid 20%) fast eine Verdopplung der Löslichkeit von Xenon, was als Indiz dafür gewertet wurde, dass Xenon primär in den Fettkern aufgenommen wird (Buttle, 2004). Trotz der erhöhten Beladungskapazität führten Formulierungen mit erhöhtem Fettgehalt aber zu keiner Verbesserung der klinischen Wirkung. Probleme wie unvollständige Abgabe von Xenon an das ZNS und Komplikationen beim Versuchstier (pulmonaler Hochdruck) verschlechterten sogar die klinische Wirkung (Buttle, 2004).

Eilecithin wurde nicht nur wegen der guten Verträglichkeit als Emulgator ausgewählt, sondern auch weil ihm eine antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor zugeschrieben wird (Weigt et al., 2004). Somit könnte Eilecithin die pharmakologische Wirkung von Xenon verstärken. Außerdem erfolgte die Einarbeitung von Lecithin, wie auch die von Polysorbat 80, vor dem Hintergrund einer möglichen bevorzugten Anlagerung von ApoE auf der Oberfläche der Emulsionströpfchen (vgl. Kapitel 5.1.2.2 und Kapitel 5.1.2.3), die zu einer Anreicherung an der BHS und einer verbesserten Abgabe von Xenon an das ZNS führen könnte. Um dies zu überprüfen, wurden in der folgenden Studie die entsprechenden Plasmaproteinadsorptionsmuster bestimmt.

5.2.3 Vergleich der Proteinmuster ausgewählter Fettemulsionen

Tab. 5.2-3 zeigt die Größencharakteristik der mittels 2-DE untersuchten Emulsionen. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Formulierungen (vgl. Tab. 5.2-2) wurden noch die Proteinmuster zweier weiterer Formulierungen (4Ei bzw. 4PS80) bestimmt. Diese wurden hergestellt durch Zugabe von 4% Eilecithin bzw. 4% Polysorbat 80 zur BE (Abbolipid 10%) und anschließender Hochdruckhomogenisation unter gleichen Bedingungen wie oben (15 Zyklen bei 1500 bar, 45°C).

Tab. 5.2-3: Größencharakteristik der untersuchten Formulierungen. Die im Tierversuch getesteten Fettemulsionen sind grau unterlegt (Buttle, 2004)

	BE	BE(H)	2Ei	4Ei	2PS80	4PS80
D50%	0,280 µm	0,106 µm	0,088 µm	0,083 µm	0,088 µm	0,079 µm
D95%	0,413 µm	0,218 µm	0,166 µm	0,133 µm	0,162 µm	0,121 µm
D99%	0,469 µm	0,270 µm	0,244 µm	0,155 µm	0,236 µm	0,141 µm
PCS [nm]	264	174	124	103	139	88
PI	0,097	0,139	0,154	0,186	0,178	0,165

Albumin war auf allen untersuchten Formulierungen das Hauptprotein mit verhältnismäßig hohen Anteilen (vgl. Tab. 5.2-4). Es lag zwischen 33% (BE) und 43% (2Ei). Aus der Reihe fiel hier lediglich die Formulierung 4Ei, deren Albumin-Anteil mit 19% deutlich geringer war. Auffällig war hier aber auch die relativ hohe Standardabweichung. Die größten Veränderungen zeigten sich in der Gruppe der Apolipoproteine, weshalb dieser Bereich der einzelnen Gele in Abb. 5.2-1 vergrößert dargestellt ist.

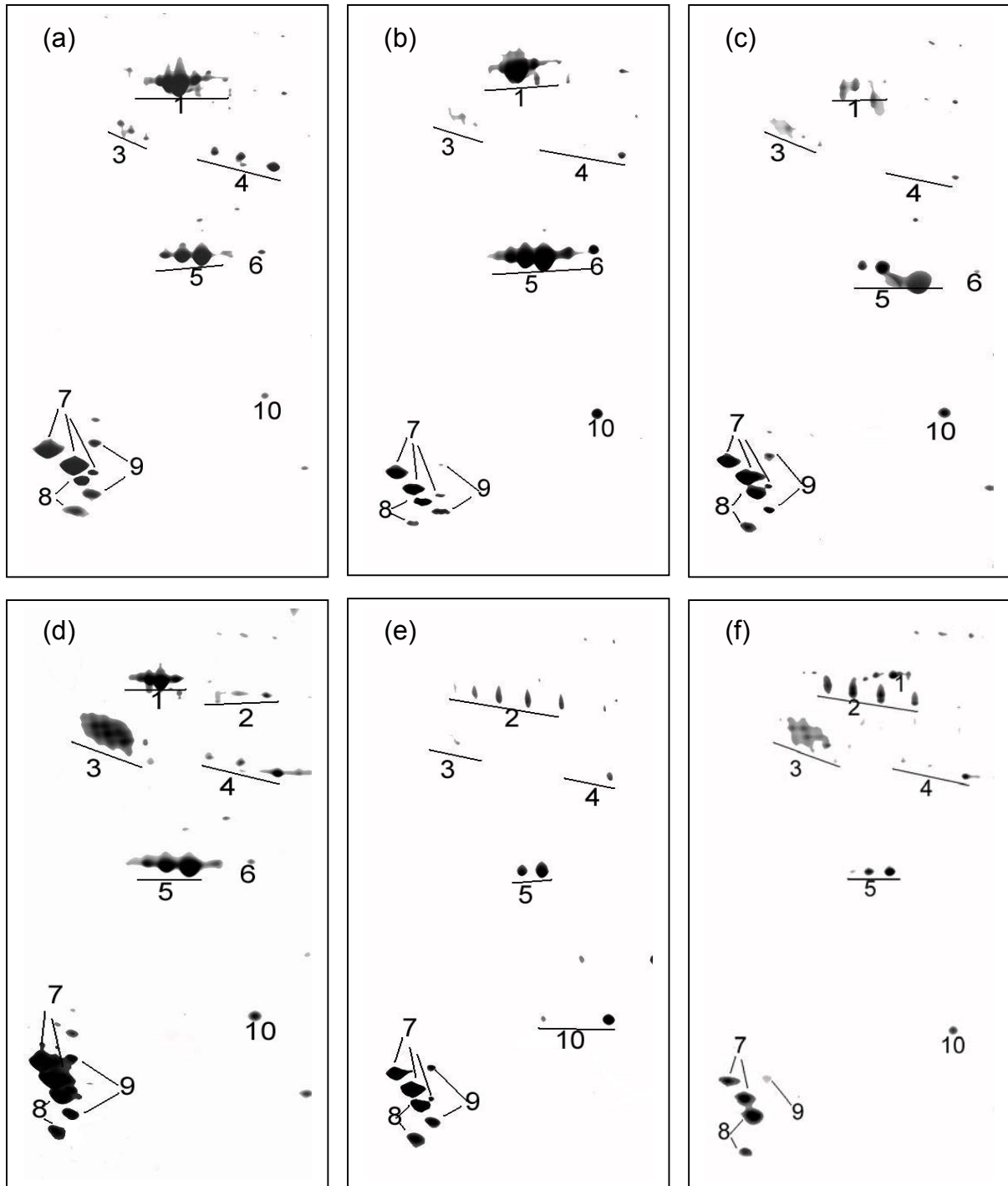


Abb. 5.2-1: Ausschnitte der 2-DE-Gele. Abszisse: pI 4,4-6,1 (von links nach rechts, nicht linear), Ordinate: MW 6 kDa-50 kDa (von unten nach oben, nicht linear). (a) BE, (b) BE(H), (c) 2Ei, (d) 4Ei, (e) 2PS80, (f) 4PS80. Markierte Proteinspots: (1) ApoA-IV, (2) Haptoglobin β , (3) ApoJ, (4) ApoE, (5) ApoA-I, (6) Pro-ApoA-I, (7) ApoC-III, (8) ApoC-II, (9) ApoA-II, (10) Transthyretin.

Bereits vor der semiquantitativen Auswertung waren deutliche quantitative Unterschiede zu erkennen. Besonders auffällig war die Tatsache, dass die Verkleinerung der Tröpfchengröße der BE bei allen Formulierungen (mit oder ohne Zusatz von Tensid) zu einer Reduktion der adsorbierten Menge ApoE führte. Allein die Formulierung 4Ei zeigte eine ähnliche Adsorption von ApoE wie die BE (Abb.

5.2-1 (d)). Abb. 5.2-2 zeigt die genauen quantitativen Zusammensetzungen, wobei die Albuminmengen nicht dargestellt sind (vgl. Tab. 5.2-4), um die jeweiligen Unterschiede in der Adsorption der Apolipoproteine hervorzuheben.

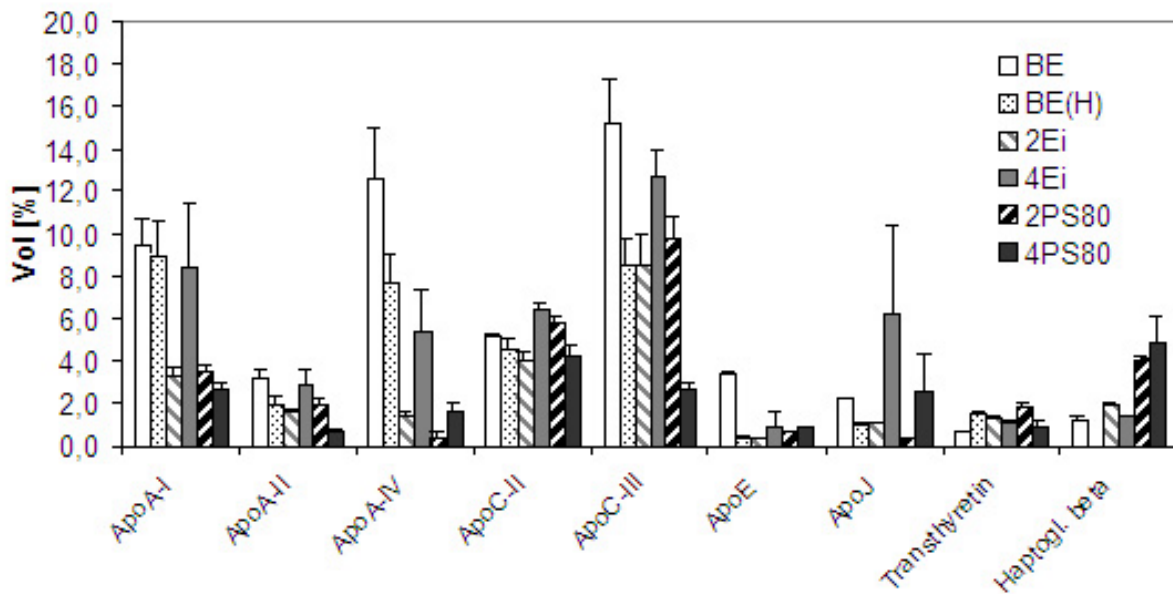


Abb. 5.2-2: Adsorbierte Hauptproteine auf den verschiedenen Fettemulsionen als Anteil an der gesamt detektierten Proteinmenge, n = 2.

Im Vergleich zur BE wurde bei BE(H), deren einziger Unterschied in der kleineren Tröpfchengröße bestand (174 nm vs. 264 nm), bei allen Apolipoproteinen eine Reduktion des relativen Anteils festgestellt. Das gleiche galt auch, mit einzelnen Ausnahmen, für die anderen vier homogenisierten und zusätzlich modifizierten Formulierungen. Diese Feststellung bekräftigte noch einmal, dass der Krümmungsradius der Partikel bzw. Öltröpfchen einen großen Einfluss auf das Adsorptionsmuster hat. Interessant war allerdings auch die Feststellung, dass der Zusatz von Eilecithin bzw. Polysorbat 80 (v. a. in der höheren Konzentration von 4%) durchaus in der Lage war, das Proteinmuster (positiv) zu beeinflussen. Die Verdopplung des Anteils von Eilecithin in der Rezeptur von 2% auf 4% führte zu einer Zunahme der adsorbierten Menge bei allen Apolipoproteinen. Die Verwendung von 4% statt 2% Polysorbat 80 erhöhte den relativen Anteil von ApoA-IV, ApoE und ApoJ (vgl. Kapitel 5.1.2.2, entsprechendes Verhalten von ApoA-IV und ApoE auch bei SLN). Gleichzeitig wurde der relative Anteil der anderen Apolipoproteine, so auch der von ApoC-II, durch Verdopplung des Polysorbat-Gehalts verringert. Die Rezeptur 4PS80 führte also (im Vergleich zu 2PS80) zu einer Erhöhung des Anteils von ApoE bei gleichzeitiger Reduktion des Anteils von ApoC-II. Diese Rezeptur wurde, ebenso wie die Formulierung 2Ei und BE, *in vivo* am Schwein getestet.

Wenn man hier nur die Plasmaproteinadsorptionsmuster als verantwortlich für die Stärke der klinischen Wirkung annehmen würde, müsste die BE in dieser Reihe den größten Effekt haben, denn sie weist den mit Abstand größten ApoE/ApoC-II-Quotienten auf (Tab. 5.2-4). Die adsorbierte Menge an Albumin als Dysopsonin ist bei dieser Formulierung zwar nicht am höchsten, jedoch dürfte die Phagozytose von BE trotzdem am geringsten sein, da hier auch der geringste Wert an IgG ermittelt wurde (Tab. 5.2-4). Dieser Sachverhalt stellte sich jedoch als sehr viel komplexer dar, denn die klinische Wirkung einer Xenon-gesättigten Fettemulsion wurde von weitaus mehr Faktoren als dem Proteinadsorptionsmuster beeinflusst. Dies soll im nächsten Abschnitt mit den Ergebnissen der Tierstudie beschrieben werden.

Tab. 5.2-4: Adsorbierte Mengen an Albumin bzw. IgG als Anteile an der Proteingesamtmenge und Quotienten aus ApoE/ApoC-II der einzelnen Formulierungen (n = 2). Die im Tierversuch getesteten Fettemulsionen sind grau unterlegt

	BE	BE(H)	2Ei	4Ei	2PS80	4PS80
ApoE/ApoC-II	0,65	0,09	0,08	0,15	0,12	0,21
Albumin [%]	32,9 ± 2,8	39,0 ± 1,6	42,8 ± 3,9	19,1 ± 4,9	30,5 ± 3,2	35,7 ± 2,9
IgG [%]	1,1 ± 0,3	4,1 ± 0,8	6,2 ± 0,4	4,5 ± 0,4	9,7 ± 1,2	8,9 ± 1,1

5.2.4 Ergebnisse der *In-vivo*-Studie mit Xenon-gesättigten Fettemulsionen

Die Daten dieser Studie wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Georgieff an der Universitätsklinik für Anästhesiologie in Ulm erhoben. Für eine Kurzbeschreibung der Methode siehe Kapitel 4.3.

Im folgenden seien nur die Ergebnisse der Formulierungen dargestellt, deren Proteinmuster auch mittels 2-DE bestimmt wurden. Für eine detaillierte Diskussion dieser und weiterer Ergebnisse sei auf die Dissertation von Frau Dr. Buttle (2004) verwiesen.

Die Korrelation der Proteinadsorptionsmuster mit den *In-vivo*-Ergebnissen stellte sich schon im Vorfeld aus vielerlei Hinsicht als schwierig dar. Xenon ist in der Lage auch ohne Transportvektor die BHS durch Permeation zu passieren (vgl. Kapitel 2.1.2.1), ist also kein klassisches Beispiel eines Pharmakons mit fehlender Gehirngängigkeit. Außerdem könnte die pharmakologische Eigenwirkung von Eilecithin seinen (im

Vergleich zur BE negativen) Effekt auf das Adsorptionsmuster überdecken. Die klinische Wirkung wird darüber hinaus auch durch andere Faktoren wie der Freigabekinetik *in vivo* beeinflusst. Xenon erfordert eine stärkere Kopplung an den Lipidträger, damit der Verlust bei der Lungenpassage durch Abgabe an die Atemluft nicht zu groß wird.

Andererseits soll aber auch eine maximale Freisetzung ans Gehirn gewährleistet sein. Hier könnte die Adsorption von ApoE zu einer Verstärkung der Wirkung führen, indem die mit Xenon beladenen Öltröpfchen an den LDL-Rezeptor der Endothelzellen der BHS binden.

Der Verlauf der Wirkspiegel von injizierter, beladener BE ist in Abb. 5.2-3 dargestellt. Es war auffällig, dass die erreichten Höchstkonzentrationen der Blutspiegel deutlich unter denen einer Inhalationsnarkose mit Xenon lagen. Im ZNS (Sinus sagittalis) wurde nach 2 min eine Konzentration von $1,9 \pm 0,4 \mu\text{l/ml}$ Blut bestimmt (vgl. Xenon inhalativ: Plateau nach 7 min von $65 \pm 2 \mu\text{l/ml}$ Blut).

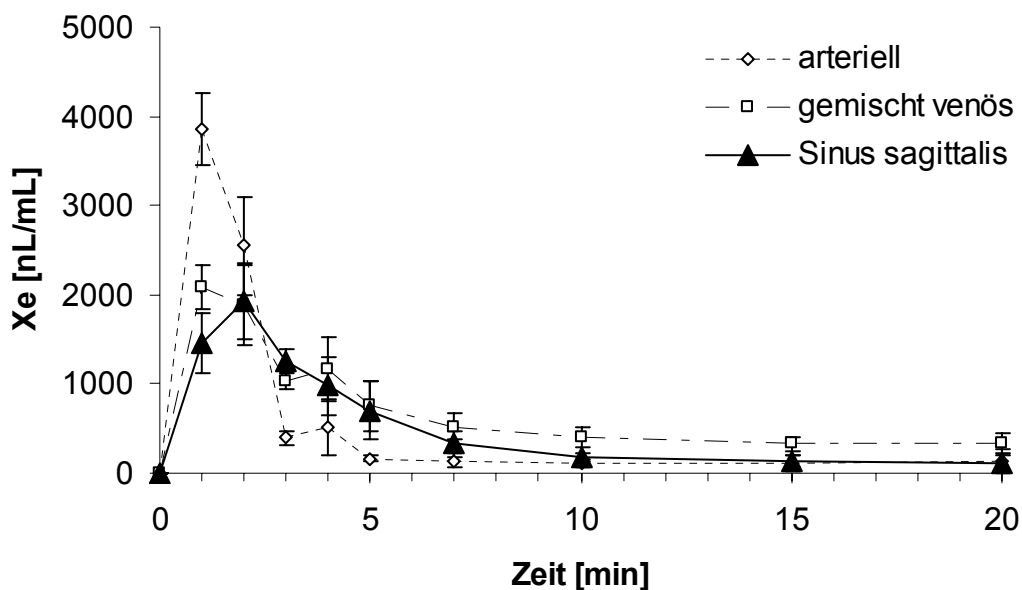


Abb. 5.2-3: Xenon-Blutspiegel während der i. v. Applikation von Abbolipid 10% (Beladung bei 2 bar, n = 6) (Buttle, 2004).

Die Senkung der Sevofluran-Konzentration, als Maß für die klinische Wirkung von Xenon, war allerdings in beiden Fällen (inhalativ bzw. BE injiziert) gleich. Es wurde eine Reduktion um 1,0 Vol% erreicht. Da dies bei der Injektionsnarkose von Xenon mit der BE mit einem viel geringeren Blutspiegel im ZNS erreicht wurde, kann

festgehalten werden, dass durch intravenöses Xenon in einer Fettemulsion eine enorme Wirkverstärkung erzielt werden kann.

Der Verlauf des Xenon-Wirkspiegels der Formulierung 2Ei ist in Abb. 5.2-4 dargestellt. Die Spitzenkonzentration im ZNS wurde wiederum nach 2 min erreicht. Jedoch lag sie hier mit 3,2 $\mu\text{l/ml}$ Blut fast doppelt so hoch wie bei der BE. Auch die klinische Wirkung der BE wurde übertroffen. So konnte Sevofluran von 2,9 Vol% auf 0,7 Vol% gesenkt werden und damit um 0,2 Prozentpunkte mehr als bei der BE bzw. bei Xenon inhalativ. Wie bereits angedeutet kann diese Verbesserung weniger auf die entsprechenden Plasmaproteinadsorptionsmuster zurückgeführt werden, als vielmehr auf die Eigenwirkung von Eilecithin auf den NMDA-Rezeptor. Zusätzlich spielt wohl die Verkleinerung der Tröpfchengröße von 264 nm (BE) auf 124 nm (2Ei) eine wesentliche Rolle. Die nicht homogenisierte BE setzte zu langsam Xenon frei, so dass der Verlust über die Lunge zu groß war (Buttle, 2004). Durch Verkleinerung der Teilchengröße auf 120-140 nm konnte die Freisetzung beschleunigt und die Wirkung verstärkt werden (Buttle, 2004).

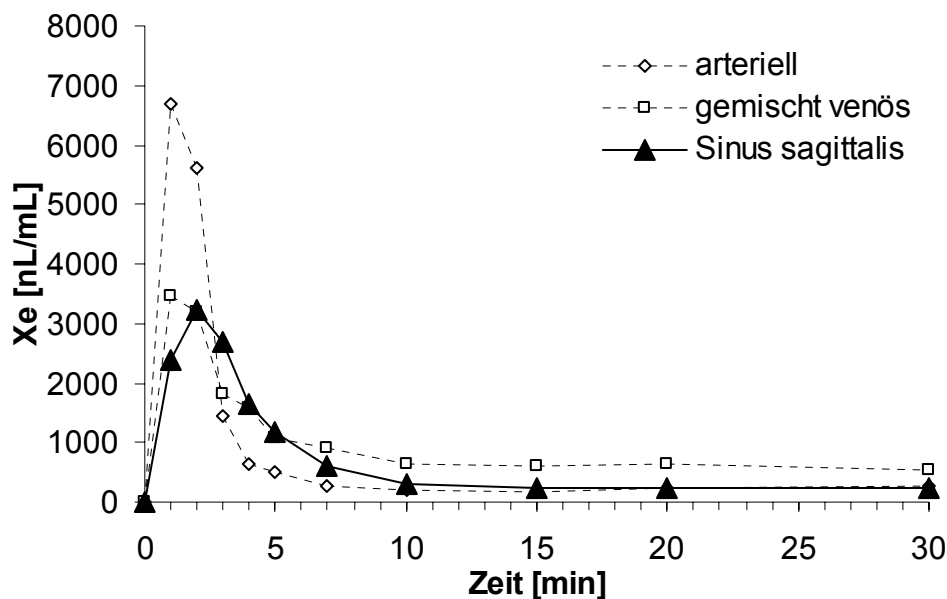


Abb. 5.2-4: Xenon-Blutspiegel während der i. v. Applikation der Formulierung 2Ei (Beladung bei 2 bar: 750 $\mu\text{l/ml}$) (Buttle, 2004).

Die Formulierung 4PS80 fiel nach Beladung mit 2 bar Xenon durch ein vergleichsweise starkes Ausgasen auf. Dies wurde auf die starke Verkleinerung der Partikel zurückgeführt (88 nm), da durch die größere Oberfläche ein zu schneller Austausch des Xenons mit der Umgebung erfolgen kann (Buttle, 2004). Abb. 5.2-5

zeigt den Blutspiegel von Xenon nach Verabreichung der Formulierung 4PS80. Der Maximalwert im ZNS nach 2 min betrug 2,3 $\mu\text{l/ml}$, war also geringer als bei 2Ei aber immer noch höher als bei der BE. Trotz des geringeren Blutspiegels im Gehirn und dem stärkeren Ausgasen wurde eine bemerkenswerte klinische Wirkung dieser Formulierung festgestellt. Sevofluran konnte um 2,7 Prozentpunkte gesenkt werden, d. h. die Wirkung war fast dreimal stärker als bei der BE bzw. Xenon inhalativ verabreicht. Eine genaue Begründung für diese Wirkverstärkung konnte nicht nachgewiesen werden (Buttle, 2004). Möglicherweise vermag Polysorbat 80 aber doch das Gehirn-Targeting zu verstärken, auch wenn die Blutspiegel bzw. die Adsorption von ApoE auf 4PS80 (0,9%, vgl. Kapitel 5.2.3) dies nicht belegen konnten. Möglich wäre auch, dass die Wirkverstärkung ihre Ursache in der Partikelgrößenreduktion hat.

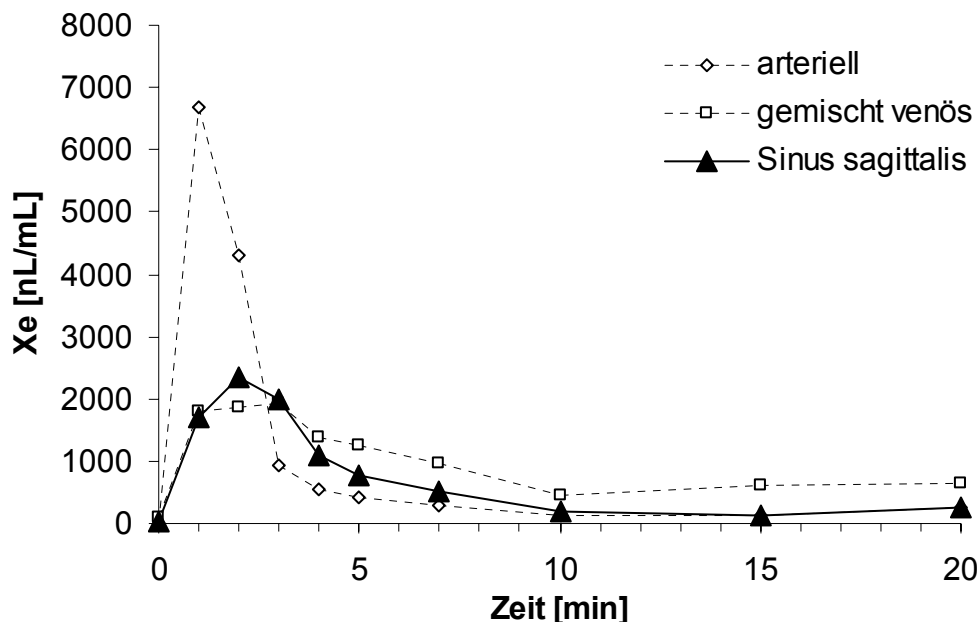


Abb. 5.2-5: Xenon-Blutspiegel während der i. v. Applikation der Formulierung 4PS80 (Beladung bei 2 bar: 750 $\mu\text{l/ml}$) (Buttle, 2004).

5.2.5 Zusammenfassung und Fazit

Tab. 5.2-5 fasst die wichtigsten Ergebnisse dieses Kapitels zusammen. Es konnte gezeigt werden, dass i. v. verabreichtes Xenon, gekoppelt an eine Fettemulsion, eine vergleichbare klinische Wirkung in Bezug auf Analgesie und Anästhesie erreichen kann wie inhalativ verabreichtes Xenon. Durch Rezepturoptimierung (Verkleinerung der Tröpfchengröße, Zusatz von Tensiden) konnte sogar eine Wirkverstärkung erreicht werden.

Tab. 5.2-5: Zusammensetzung, mittlere PCS-Partikelgröße, Quotient ApoE/ApoC-II, adsorbierte Menge Albumin bzw. IgG als relativer Anteil der gesamten Proteinadsorption, Blutkonzentration im Gehirn (Sin. Sag.) und Reduktion der Sevofluran-Zufuhr (Δ Vol%) (als Maß für die klinische Wirkung) der untersuchten Fettemulsionen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Daten einer Inhalationsnarkose mit Xenon dargestellt

Narkose mit		PCS [nm]	ApoE ApoC-II	Albumin [%]	IgG [%]	Sin. sag. [μ l/ml]	Δ Vol%
Xenon inhalativ		-	-	-	-	65	1,0
Xenon i. v. in	Rezeptur						
BE	10% Abbolipid	265	0,65	32,9	1,1	1,9	1,0
2Ei	10% Abbolipid + 2% Eilecithin	126	0,08	42,8	6,2	3,2	1,2
4PS80	10% Abbolipid + 4% PS 80	88	0,21	35,7	8,9	2,3	2,7

Obwohl die Formulierung 4PS80 nicht die erwartete hohe Menge ApoE adsorbierte und auch nicht die höchsten Blutspiegel an Xenon im ZNS aufwies, konnte mit dieser Fettemulsion die beste klinische Wirkung erzielt werden. Dadurch wurde deutlich, dass der klinische Effekt, im Falle einer mit Xenon-beladenen Fettemulsion, nicht zwangsläufig mit der adsorbierten Menge ApoE bzw. dem Plasmaproteinadsorptionsmuster der Emulsionen korreliert. Angesichts der Tatsache, dass Xenon auch ohne Transportvektor die BHS passieren kann, war dies auch nicht unbedingt zu erwarten. Deshalb muss hier bei der Auswahl der Hilfsstoffe für eine optimale Formulierung nicht primär das Plasmaproteinadsorptionsmuster im Vordergrund stehen, sondern vielmehr die Problematik des hohen Verlustes von Xenon über die Lunge.

Da aber gleichzeitig auch eine begrenzte Abgabe von Xenon aus der Fettemulsion an das Gehirn als Problem auftrat, kann eine Modifizierung der Emulsion in Richtung höherer Adsorption von ApoE die klinische Wirkung aber durchaus noch verstärken. Die bisherigen Ergebnisse eines mit Fettemulsionen stark reduzierten Xenon-Verbrauchs (1/100-1/300), bei gleichbleibender oder sogar verstärkter Wirkung, sind jedenfalls sehr vielversprechend und ermutigen zu einem weiteren Vorgehen in diesem Bereich.

5.3 Plasmaproteinadsorption auf Nanopartikeln aus Gelatine

5.3.1 Nanopartikel aus Gelatine als alternatives Carriersystem

Gelatine verfügt über sehr gute Voraussetzungen, um als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Nanopartikeln verwendet zu werden. Ähnlich wie die zur Herstellung von SLN verwendeten Lipide, ist es biologisch abbaubar und gut verträglich (Coester et al., 2000b) und weist auch nur eine geringe Immunogenität auf (Schwick und Heide, 1969). Durch kovalente Kopplung des quartären Amins Cholanin können positiv geladene Gelatine-NP hergestellt werden (Coester, 2003a) (vgl. Kapitel 4.1.2.2), die ähnlich wie positiv geladene SLN (Olbrich et al., 2001, Tabatt et al., 2004) oder positiv geladene Liposomen (Chesnoy und Huang, 2000) Verwendung als nichtvirale Gentransfervehikel finden könnten.

Obwohl für Gelatine-NP ähnliche Eigenschaften *in vitro* erwartet wurden, wie für Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA), konnten anhand von murinen dendritischen Zellen gezeigt werden, dass ihre Zellaufnahme sich zum Teil deutlich unterscheidet (Coester, 2003b). Gelatine-NP wurden in diese Zellen aufgenommen und befanden sich teilweise auch relativ nahe an den Zellkernen, während HSA-Nanopartikel nur zu einem geringen Teil in die Zellen aufgenommen wurden und eher außen an die Membran der Zellen adsorbierten. Aus dieser Sicht scheinen Gelatine-NP sehr gut geeignet zu sein, um als Carriersystem für Arzneistoffe zu fungieren, die eine hohe intrazelluläre Aufnahme benötigen, wie z. B. Oligonukleotide im Rahmen einer Gentherapie. Da eine derartige Therapie mit Gelatine-NP über eine i. v. Injektion erfolgen würde, stellten sich an dieser Stelle ebenfalls die Fragen nach den Plasmaproteinadsorptionsmustern im Hinblick auf das Schicksal der Partikel im Organismus. Deshalb wurden die entsprechenden Muster von derartigen Gelatine-NP in der im folgenden beschriebenen Studie bestimmt und ausgewertet.

5.3.2 Vergleich der Plasmaproteinadsorptionsmuster auf Gelatine-Nanopartikeln

Die Gelatine-NP wurden von Herrn Jan C. Zillies (Ludwigs-Maximilians-Universität München) mittels Zwei-Stufen-Desolvatationstechnik hergestellt. Für eine Kurzbeschreibung der Methode siehe Kapitel 4.1.2.1. Eine detaillierte Ausführung der Partikelherstellung und –charakterisierung findet sich in Coester et al. (2000b) und in der Dissertation von Herrn Zillies (2006).

Tab. 5.3-1 zeigt die Größencharakteristik und das ZP der untersuchten unmodifizierten (G-NP) bzw. positiv geladenen Gelatine-NP (G-NPpos).

Tab. 5.3-1: PCS- und ZP-Messungen der mittels 2-DE untersuchten Gelatine-NP. Das ZP wurde in 10 mM NaCl bei pH 7 gemessen (Zillies, 2006).

	Gelatine-NP (G-NP)	Positiv geladene Gelatine-NP (G-NPpos)	Positiv geladene und DNA-beladene Gelatine-NP (G-NPpos+O)
PCS [nm]	139	164	166
PI	0,073	0,043	0,054
ZP [mV]	-2,5	+14,6	+3,6

Die Partikel hatten einen ähnlichen mittleren Partikeldurchmesser (ca. 140-160 nm) und eine sehr enge Partikelgrößenverteilung. Anhand des ZP von G-NPpos (+14,6 mV) konnte man erkennen, dass die Kopplungsreaktion von G-NP mit dem quartären Amin Cholemin erfolgreich verlief.

Anschließend erfolgte die Beladung von G-NPpos mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid (21mer) zu G-NPpos+O wie in Kapitel 4.1.2.2 beschrieben. Mittels UV-Messung wurde festgestellt, dass es bei Zugabe von 5% (m/m) Oligonukleotid zu einer fast vollständigen Bindung des 21mer an G-NPpos kam. Die Bestimmung des ZP von G-NPpos+O (Tab. 5.3-1) zeigte, dass die positive Ladung von G-NPpos durch die Beladung stark abgeschwächt wurde, was als Indiz für eine weitgehende Besetzung der Oberfläche mit dem 21mer gewertet wurde.

Abb. 5.3-1 zeigt die resultierenden 2-DE-Gele von G-NP, G-NPpos bzw. G-NPpos+O nach Inkubation in Humanplasma. Im Vergleich zu den bisher in dieser Arbeit mit Lipidsystemen bestimmten Proteinadsorptionsmustern, war auf den ersten Blick zu erkennen, dass die Muster von Gelatine-NP nicht von Apolipoproteinen dominiert wurden. Dies war insofern nicht überraschend, da bereits mehrfach die Affinität von Apolipoproteinen zu hydrophoben Oberflächen betont wurde, die im Falle der untersuchten Gelatine-NP nicht gegeben waren. Um den doch recht drastischen Unterschied der Plasmaproteinadsorption auf diesen beiden unterschiedlichen Carriersystemen zu verdeutlichen, sind in Abb. 5.3-2 die relativen Anteile der

Hauptgruppen adsorbierter Proteine am insgesamt detektierten Muster in einem Balkendiagramm gegenüber gestellt.

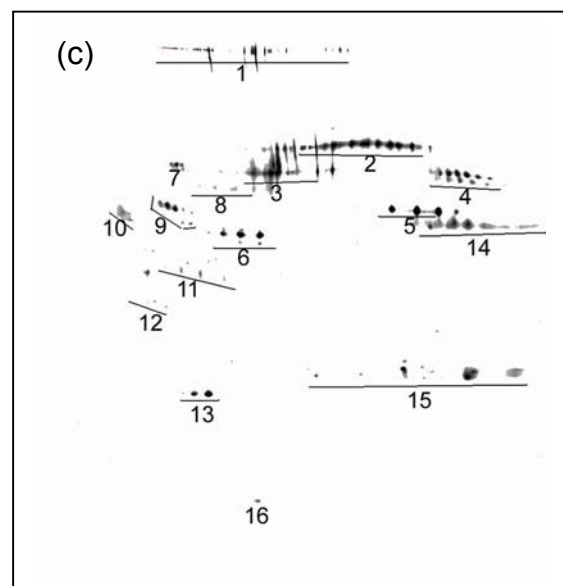
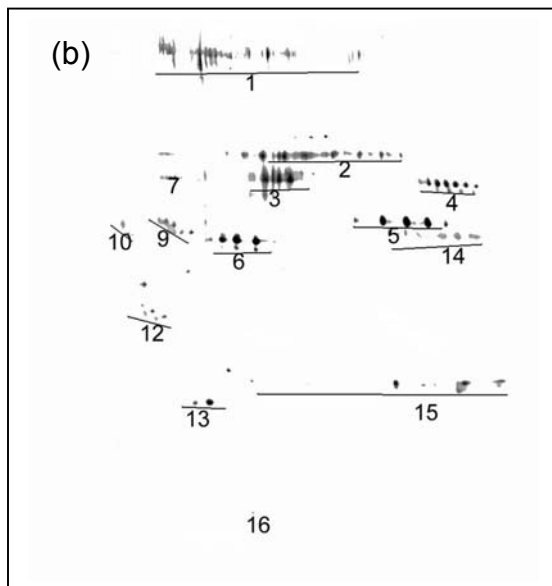
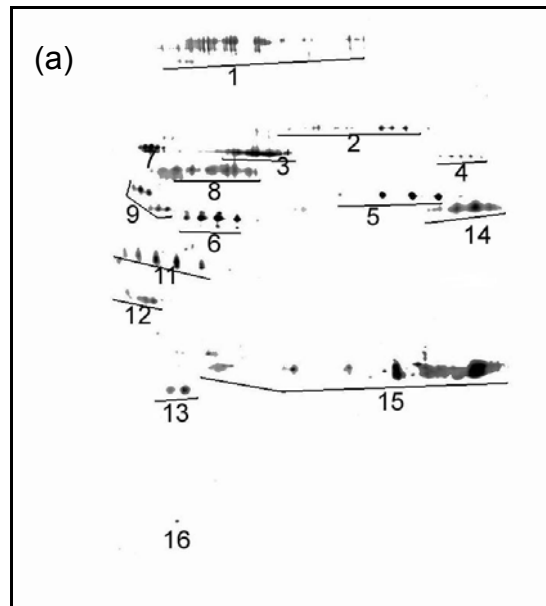


Abb. 5.3-1: Proteinadsorptionsmuster auf Gelatine-NP nach Inkubation in Humanplasma. (a) G-NP, (b) G-NPpos, (c) G-NPpos beladen mit Oligonukleotid (G-NPpos+O). Die ganzen Gele sind gezeigt (Abszisse: pH 4-9 (von links nach rechts), Ordinate: MW 250 kDa-6 kDa (von oben nach unten)). Markierte Proteinspots: (1) α 2-Macroglobulin, (2) IgM μ Kette, (3) Albumin, (4) Fibrinogen α Kette, (5) Fibrinogen β Kette, (6) Fibrinogen γ Kette, (7) α 1-B-Glycoprotein, (8) IgA, (9) α 1-Antitrypsin, (10) α 2-HS-Glycoprotein, (11) Haptoglobin β Kette, (12) ApoJ, (13) ApoA-I, (14) IgG γ Kette, (15) Ig leichte Ketten, (16) Transthyretin.

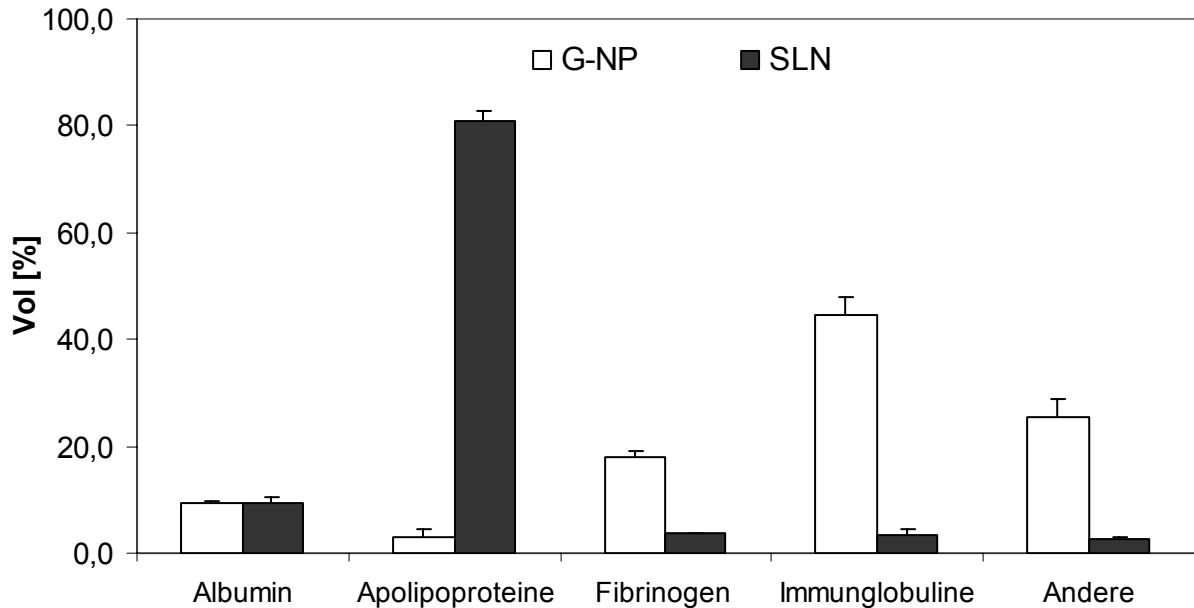


Abb. 5.3-2: Plasmaproteinadsorptionsmuster auf G-NP verglichen mit dem auf SLN, n = 2.

Während auf unmodifizierten SLN ca. 80% der adsorbierten Proteinschicht aus Apolipoproteinen bestand, konnten auf G-NP nur ca. 3% Apolipoproteine detektiert werden. Dagegen wurde das Adsorptionsmuster hier von Immunglobulinen und Fibrinogen bestimmt. Nur der Anteil von Albumin an der insgesamt detektierten Proteinmenge war auf beiden Partikeltypen ungefähr gleich.

Aus diesen Daten ließ sich ableiten, dass solche Gelatine-NP (im Vergleich zu SLN im Allgemeinen) als Arzneistoffträger zur Überwindung der BHS über ein bestimmtes Proteinadsorptionsmuster wohl nicht geeignet sind, da weder eine Anreicherung von ApoE noch eine Verminderung der Adsorption von Opsoninen auf diesen Partikeln festgestellt werden konnte.

Interessanterweise waren die Ergebnisse der 2-DE-Analyse mit diesen Gelatine-NP in Übereinstimmung mit den erwähnten Untersuchungen zur Aufnahme in dendritische Zellen (Coester, 2003b). Die starke Opsonisierung der Gelatine-NP erklärt die festgestellte starke Aufnahme dieser Partikel in immunkompetente Zellen. Die genaue Zusammensetzung der Proteinadsorptionsmuster auf den unterschiedlichen Gelatine-NP (Abb. 5.3-3) verdeutlichte dies ebenfalls. Auf allen Partikeln wurde nicht nur eine Anreicherung von IgG, IgM und Fibrinogen festgestellt, sondern auch von α 2-Macroglobulin (α 2-MG), für das ebenfalls spezifische Rezeptoren auf den MPS-Zellen existieren (Van Leuven et al., 1986) und das deshalb als starkes Opsonin gilt (Patel, 1992).

Die Detektion von α 2-MG auf Gelatine-NP in einer relativen Menge von 10-13% war außerdem in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bucke et al. (1997), die auf Gelatine-modifizierten Liposomen ebenfalls eine Anreicherung von α 2-MG feststellen konnten. Der relative Anteil von α 2-MG am insgesamt detektierten Proteinmuster lag da bei ca. 12% (Bucke et al., 1997). Unmodifizierte bzw. mit Poloxamer- oder Polysorbat-modifizierte Liposomen zeigten dagegen keine Adsorption von α 2-MG, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dieses Opsonin eine gewisse Affinität zu Gelatine besitzt.

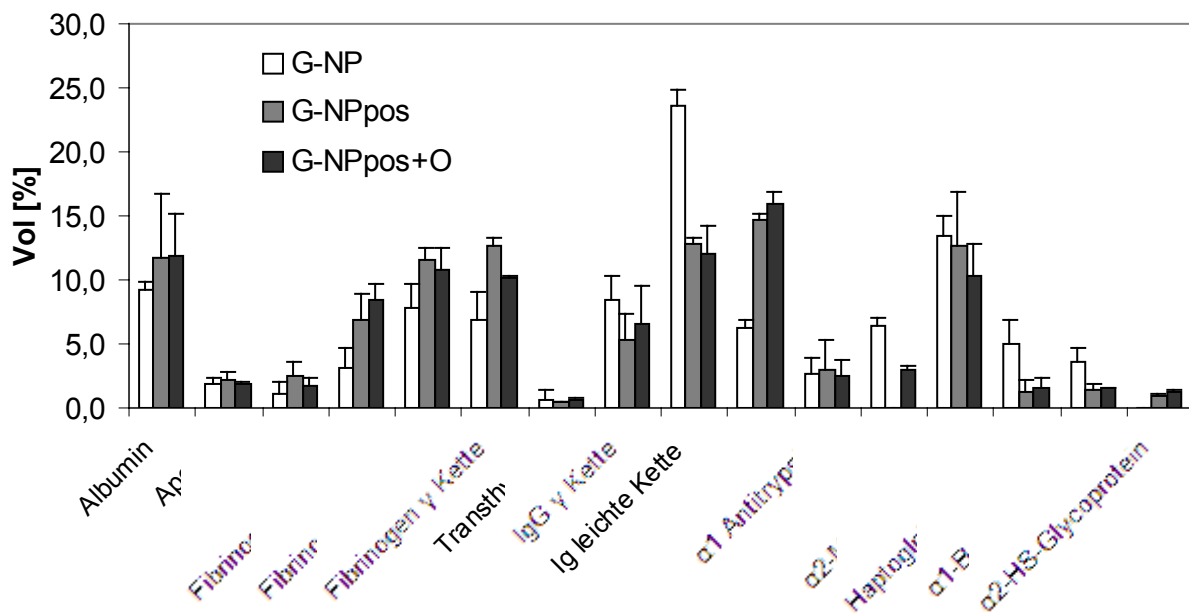


Abb. 5.3-3: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Proteinmuster auf Gelatine-NP nach Inkubation in Humanplasma (in Volumen [%]), n = 2.

Beim Vergleich der Gele (Abb. 5.3-1) bzw. der semiquantitativen Auswertung dieser (Abb. 5.3-3) fiel zudem auf, dass die Modifikation der Partikel mit Cholamin, also die positive Oberflächenladung, einen größeren Einfluss auf das Adsorptionsmuster hatte, als die zusätzliche Beladung der G-NPpos mit einem Oligonukleotid. Obwohl das Oligonukleotid an die Oberfläche der Partikel bindet (ionische Wechselwirkung) hatte dies keine signifikante Auswirkung auf das Proteinmuster von G-NPpos.

Auf G-NPpos bzw. G-NPpos+O wurden im Vergleich zu G-NP ein erhöhter Anteil von Fibrinogen, IgM und teilweise auch von Albumin und ApoJ festgestellt. Dagegen wurde ein erniedrigter Anteil der Proteine Haptoglobin β , α 1-B-Glycoprotein, IgG, IgA und der Ig leichten Ketten auf den positiv geladenen Gelatine-NP detektiert.

Insgesamt muss aber festgehalten werden, dass die drei Adsorptionsmuster untereinander relativ ähnlich waren.

Da mit diesen Partikeln eine *In-vivo*-Studie an Ratten zur Organverteilung nach i. v. Injektion geplant war, wurden zusätzlich die Plasmaproteinadsorptionsmuster nach Inkubation in Rattenplasma (Wistar-Ratten, Institut für Infektionsmedizin der medizinischen Universität Berlin) bestimmt (Abb. 5.3-4).

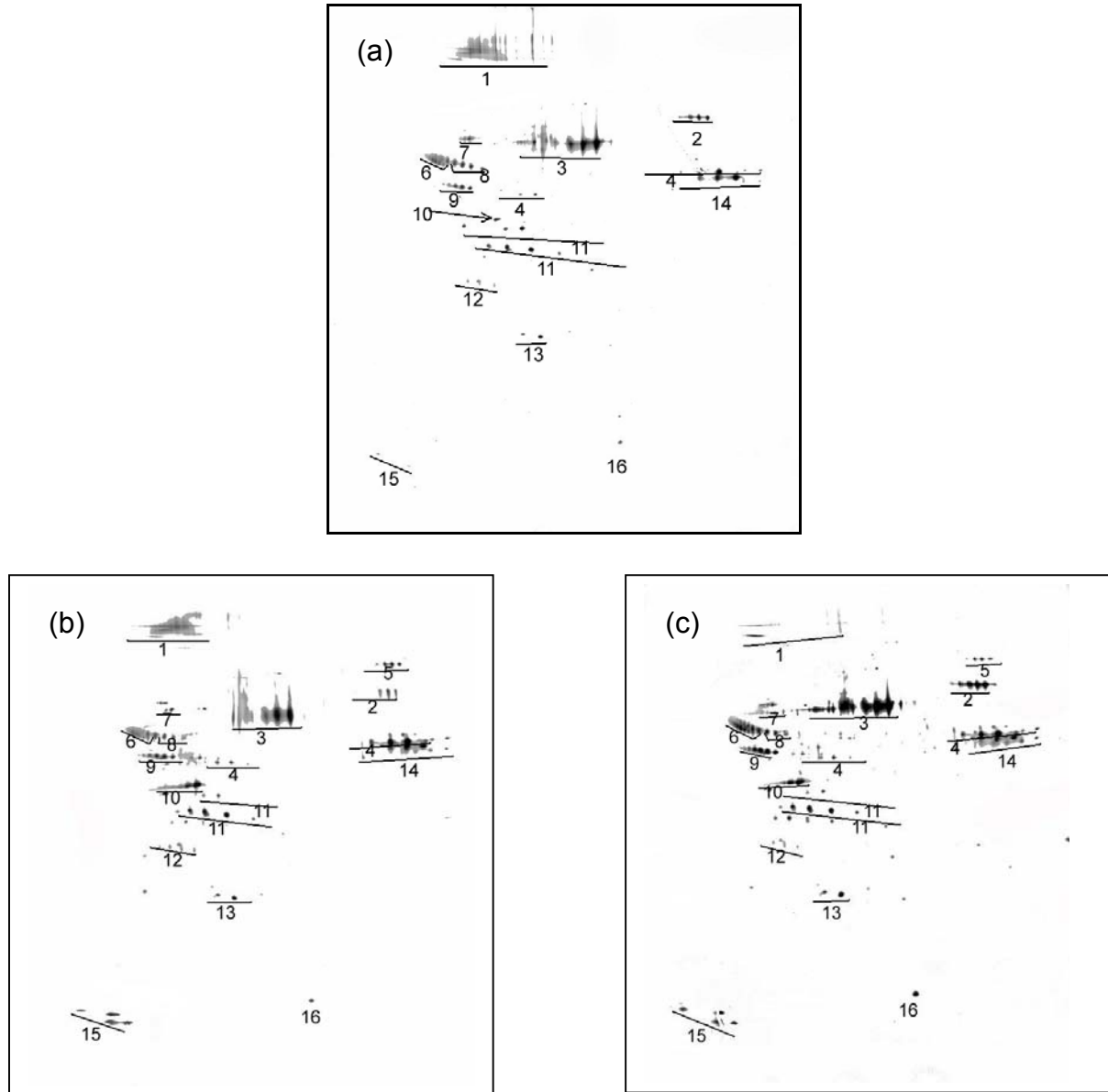


Abb. 5.3-4: Proteinadsorptionsmuster auf Gelatine-NP nach Inkubation in Rattenplasma. (a) G-NP, (b) G-NPpos, (c) G-NPpos+O. Die ganzen Gele sind gezeigt (Abszisse: pH 4-9 (von links nach rechts), Ordinate: MW 250 kDa-6 kDa (von oben nach unten)). Markierte Proteinspots: (1) α 2-Macroglobulin, (2) IgM μ Kette, (3) Albumin, (4) Fibrinogen, (5) Transferrin, (6) Kallikrein bindendes Protein, (7) α 1-B-Glycoprotein, (8) α 2-HS-Glycoprotein, (9) α 1-Antitrypsin, (10) ApoA-IV, (11) Haptoglobin β Kette, (12) ApoJ, (13) ApoA-I, (14) IgG γ Kette, (15) ApoC, (16) Transthyretin.

Im Vergleich zu den Gelen nach Inkubation in Humanplasma zeigte sich hier ein etwas anderes Bild, was schon alleine daher kommt, dass die Form und Lage vieler Proteinspots auf dem 2-DE Gel von Rattenplasma eine andere ist. Die Identifizierung aller detektierten Proteinspots war jedoch mit Hilfe einer 2-DE Referenzkarte von Rattenserum problemlos möglich (Haynes et al., 1998). Außerdem entsprachen die Fibrinogenspots in Form und Lage ziemlich genau denen auf der 2-DE Referenzkarte von Humanplasma, sodass auch diese gut zugeordnet werden konnten.

Trotz der speziesspezifischen Zusammensetzung der unterschiedlichen Plasmen muss betont werden, dass sich bei qualitativer Betrachtung der Gele (Abb. 5.3-4) deutliche Übereinstimmungen mit den Gelen nach Inkubation in Humanplasma ergaben. So waren die Hauptproteine nach Inkubation in Rattenplasma auf allen Gelatine-NP wiederum Albumin, Fibrinogen, Immunoglobulin und α 2-MG. Die semiquantitative Auswertung der Gele (Abb. 5.3-5) verdeutlichte dies. Die Hauptunterschiede zu den Gelen nach Inkubation in Humanplasma waren zum einen, dass Albumin hier das dominierende Protein war und zum anderen, dass die Apolipoproteine insgesamt etwas stärker vertreten waren. So konnten hier z. B. ApoA-IV (2,9-7,8%) und ApoC (1,9-6,2%) detektiert werden, was nach Inkubation in Humanplasma nicht der Fall war.

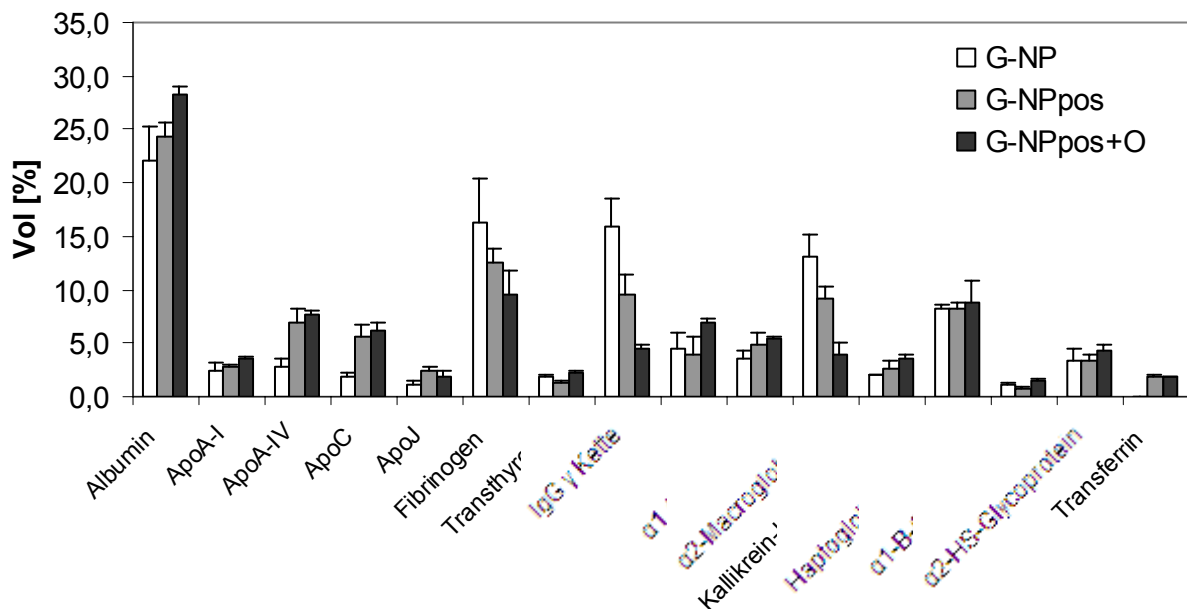


Abb. 5.3-5: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Proteinmuster auf Gelatine-NP nach Inkubation in Rattenplasma, n = 2.

Beim Vergleich der drei Muster untereinander (Abb. 5.3-4 und Abb. 5.3-5) konnten die mittels Humanplasma erzielten Ergebnisse weitgehend bestätigt werden. So

wurden bei einigen Proteinspezies, hinsichtlich der Affinität zu ungeladenen bzw. positiv geladenen Gelatine-NP, die gleichen Trends wie zuvor erkannt. Sowohl in Humanplasma als auch in Rattenplasma wurde im Falle von Albumin, ApoJ und IgM eine höhere Affinität zu G-NPpos bzw. G-NPpos+O festgestellt als zu G-NP. Im Falle von IgG und α 2-MG war die Affinität erneut zu G-NP höher, d. h. auch hier waren sich die Adsorptionsmuster von G-NPpos und G-NPpos+O ähnlicher als die von G-NPpos und G-NP. Deshalb kann festgehalten werden, dass die Beladung von positiv geladenen Gelatine-NP mit einem Oligonukleotid keinen großen Einfluss auf das resultierende Proteinmuster hatte und dementsprechend keine allzu großen Auswirkungen auf die Organverteilung in Ratten zu erwarten wäre. Dies galt es in der Tierstudie zu überprüfen.

Statistisch gesicherte Daten der *In-vivo*-Studie lagen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor. Ersten Ergebnissen zufolge zeigten sich jedoch keine Unterschiede bei der Organverteilung der beschriebenen Gelatine-NP in Ratten (Akkumulation v. a. in Zellen des MPS) (Zillies, 2005), was die Ergebnisse dieser 2-DE-Studie bestätigen würde. Für genaue Ergebnisse und die Beschreibung der angewandten Methoden sei auf die Dissertation von Herrn Zillies (2006) verwiesen.

5.3.3 Zusammenfassung und Fazit

Die Untersuchung der Plasmaproteinadsorption auf unterschiedlichen Gelatine-NP zeigte, dass Apolipoproteine keineswegs auf allen Partikeln die dominierende Proteinspezies darstellt. Die Apolipoproteine kamen über einen relativen Anteil von ca. 3% nicht hinaus, stattdessen waren Fibrinogen- und Immunglobulin-Ketten die Hauptproteine auf diesen Partikeln. Entsprechend wurde geschlussfolgert, dass dieser Arzneistoffträger (zumindest in dieser Form und im Vergleich zu SLN) ein ungeeignetes System darstellt, um über ein bestimmtes Plasmaproteinadsorptionsmuster einen Arzneistoff über die BHS zu transportieren. Vielmehr scheinen Gelatine-NP dafür geeignet zu sein, um in immunkompetente Zellen aufgenommen zu werden und z. B. in Form von positiv geladenen, DNA-beladenen Partikeln als alternatives Gentransfersystem eingesetzt zu werden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Oberflächenmodifikation von Gelatine-NP mit Cholamin zu positiv geladenen Partikeln eine größere Auswirkung auf das Proteinmuster hat, als die Bindung eines Oligonukleotids an die Oberfläche der

positiv geladenen Partikel. Allgemein waren die Adsorptionsmuster der unterschiedlichen Gelatine-NP dennoch sehr ähnlich. Zu den gleichen Schlussfolgerungen kam man auch nach Inkubation der Partikel in Rattenplasma und Bestimmung der jeweiligen Proteinmuster.

5.4 Plasmaproteinadsorption auf „Kern-Schale-Nanopartikeln“

5.4.1 Verwendung partikulärer Arzneistoffträger gegen intrazelluläre Parasiten

Leishmanien und Toxoplasmen sind obligat intrazelluläre Protozoen (einzellige, tierische Parasiten), die insbesondere Zellen des MPS (v. a. Makrophagen) infizieren und sich dort vermehren (Leyke et al., 2005). Um dies tun zu können, setzen sie die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen herab.

Zu den Leishmaniosen gehören die Orientbeule, eine Hautinfektion, und Kala-Azar, bei der viszerale Organe (Leber, Milz) befallen werden. Zur Therapie dieser Erkrankungen dient Stibogluconat-Natrium. Bei Versagen oder Kontraindikation gegen diesen Arzneistoff wird Pentamidin (PM) (Pentacarinat[®]) gegeben (Mutschler, 2001). PM ist ein Antiprotozoenmittel aus der Gruppe der aromatischen Diamidine (Abb. 5.4-1). Hauptprobleme von PM sind die sehr schlechte Bioverfügbarkeit bei peroraler Applikation und die hohe Nebenwirkungsrate nach i. v. Infusion, wo es bei etwa der Hälfte der Patienten zu Nierenschäden kommt (Mutschler, 2001).

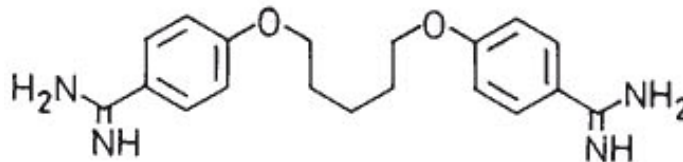


Abb. 5.4-1: Strukturformel von Pentamidin (PM).

Im Gegensatz zu Leishmanien sind Toxoplasmen weit verbreitete Protozoen. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infiziert sehr viele Vögel und Säuger (v. a. Katzen), jedoch werden bei einem intakten Immunsystem bzw. aufgrund von Resistenzen selten Krankheiten hervorgerufen. Beim Menschen treten schwere Verlaufsformen insbesondere bei gestörter Immunabwehr (z. B. häufig bei AIDS- oder Tumorpatienten) durch Reaktivierung von sogenannten Pseudozysten nach einer vorausgegangenen latenten Infektion auf (Reaktivierungstoxoplasmose). Das häufigste klinische Symptom einer Reaktivierungstoxoplasmose ist eine Enzephalitis, bei der die Parasiten Zysten im Gehirn bilden und die unbehandelt tödlich verläuft. Voraussetzung für eine Therapie ist also auch hier ein Arzneistoff bzw. ein Carrier, der die BHS überwinden kann.

Problematisch wird die Infektion auch bei Schwangeren, da die Toxoplasmen transplazentar zum ungeborenen Kind gelangen und dort (abhängig von der Schwangerschaftswoche) schwere und irreparable Schäden anrichten können.

Zur Behandlung werden Langzeitsulfonamide (z. B. Sulfadiazin) alleine bzw. vor allem in Kombination mit Pyrimethamin (Fansidar[®]) eingesetzt. Außerdem zeigte das ursprünglich als Malariamittel entwickelte Atovaquon (Malarone[®] = Kombi mit Proguanil), das mittlerweile auch in der Therapie der Pneumocystis-carinii-Pneumonie eingesetzt wird (Wellvone[®]), exzellente therapeutische Wirkung im Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmose, wenn es als Nanosuspension appliziert wurde (Schöler et al., 2001, Dunay et al., 2004). In den ersten Schwangerschaftsmonaten, in denen die Gabe von Fansidar[®] kontraindiziert ist, kann auch mit Spiramycin A (SM) (Rovamycine[®]) behandelt werden (Mutschler, 2001). SM gehört zu den Makroliden, einer Gruppe komplex aufgebauter Antiinfektiva mit 14-16-gliedrigem Lactonring (Abb. 5.4-2). Makrolide hemmen in erster Linie das Wachstum von grampositiven Bakterien. Die Wirkung gegenüber *T. gondii* ist allerdings eher mäßig, wobei SM in der Reihe der Makrolide hier noch am effektivsten ist.

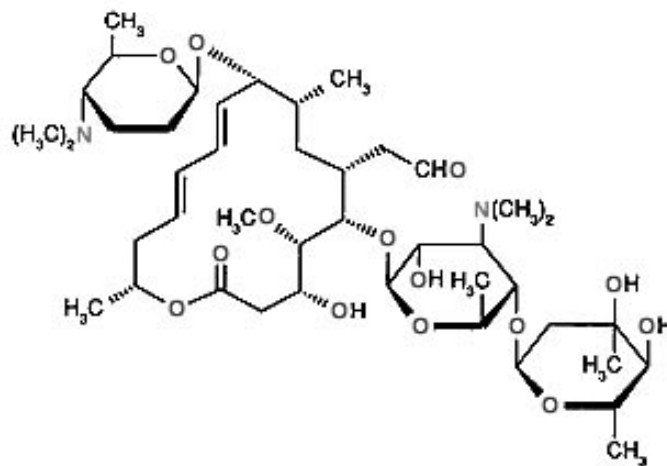


Abb. 5.4-2: Strukturformel von Spiramycin A (SM).

Die Behandlung von solchen Erkrankungen, die von intrazellulären Mikroorganismen ausgelöst werden, ist häufig problematisch. Zum einen, weil der Arzneistoff erst einmal in die Wirtszelle aufgenommen werden muss und zum anderen, weil es aufgrund fehlender Zellselektivität zu schwerwiegenden Nebenwirkungen der eingesetzten Chemotherapeutika kommen kann. Deshalb ist auch hier der Einsatz von Nanopartikeln ein vielversprechender Ansatz, um diese Probleme zu verhindern bzw. zumindest zu minimieren. Das Ziel ist die Entwicklung spezieller Nanopartikel, die zu einem Drug Targeting zu den infizierten Zellen führen. In so einem Fall wären

dann selbst Polymerpartikel mit den beschriebenen Toxizitätsproblemen von Nutzen, da die infizierten Zellen ohnehin sterben. Auch könnte so z. B. die Nierentoxizität von Pentamidin, ähnlich wie bei liposomal verkapseltem Amphotericin B, verringert werden. Zur Zeit gibt es sogar Hinweise darauf, dass selbst unbeladene Nanopartikel ohne Arzneistoff einen therapeutischen Effekt auf Makrophagen, die mit Leishmanien oder Toxoplasmen infiziert wurden, haben könnten (Leyke et al., 2005). Die Nanopartikel könnten die Phagozytose und Zerstörung der Parasiten wieder anregen und damit der negativen Wirkung der Protozoen auf die Immunzellen entgegenwirken.

Aus diesem Grund wurden in dieser Studie die Aufnahme- und Therapieeffizienz von unbeladenen bzw. arzneistoffbeladenen (PM bzw. SM) Polymernanopartikeln in einem *In-vitro*-Modell (infizierte Makrophagen) untersucht. Hierbei handelte es sich um sogenannte „Kern-Schale-Nanopartikel“ (MC81cs) mit einem Partikelkern aus Polystyrol und einer bioabbaubaren Schale aus PBCA. Da die Nanopartikel vor der Aufnahme in die Zellen *in vivo* mit den Blutproteinen in Kontakt kommen bzw. das Inkubationsmedium des *In-vitro*-Modells aus fötalem bovinem Serum (FBS) bestand, sollten außerdem die entsprechenden Proteinadsorptionsmuster der Partikel bestimmt werden. Ziel war es mögliche Korrelationen zwischen der Aufnahmeeffizienz und den Proteinmustern festzustellen und einen ersten Hinweis zu bekommen, wie eine entsprechende Oberflächenmodifikation der Partikel aussehen müsste.

5.4.2 Vergleich der Proteinadsorptionsmuster auf „Kern-Schale-Nanopartikeln“

Die „Kern-Schale-Nanopartikel“ wurden von Frau Silja Leyke mittels Emulsions- und Saatpolymerisation hergestellt. Für eine Kurzbeschreibung der Synthese siehe Kapitel 4.1.3.

Vor der 2-DE-Analyse erfolgte die physikochemische Charakterisierung der Partikel von Frau Leyke hinsichtlich ihrer mittleren Partikelgröße, ihres ZP und ihrer Oberflächenhydrophobie (Tab. 5.4-1 und Abb. 5.4-3). Die Bestimmung der Oberflächenhydrophobie erfolgte über den Bengalrosa-Verteilungskoeffizienten Q (vgl. Kapitel 4.2.4.1).

Tab. 5.4-1: Mittlere Partikelgröße, ZP und Oberflächenhydrophobie der mittels 2-DE untersuchten MC81-Partikel (Leyke, 2006)

	MC81cs	MC81cs+PM	MC81cs+SM
PCS [nm]	213	222	198
PI	0,046	0,052	0,040
ZP [mV]	-93,2	-79,7	-81,2
Steigung der Geraden (ml/m ²) als Maß der Hydrophobie	6,8	5,7	6,9

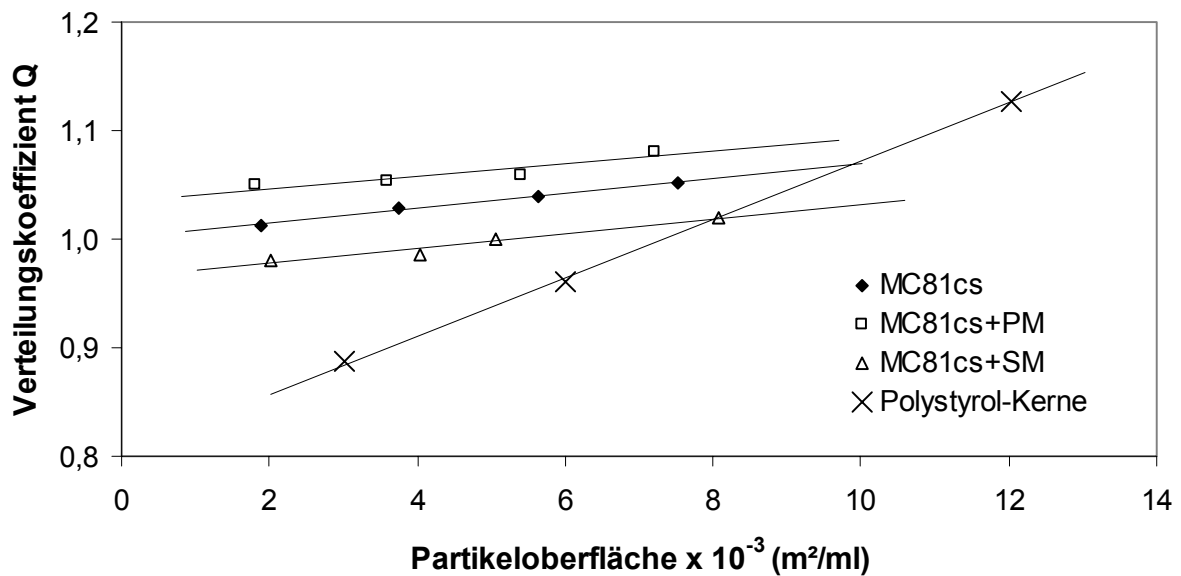


Abb. 5.4-3: Bengalrosa-Verteilungskoeffizient (Q) als Funktion der Partikeloberfläche (Leyke, 2006).

Die physikochemischen Eigenschaften der Partikel waren sehr ähnlich, d. h. die Beladung mit Arzneistoff hatte keinen großen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Vor allem die Oberflächenhydrophobie war bei allen drei Partikelsorten gleich (schwach) ausgeprägt. Abb. 5.4-3 zeigt, dass die Oberflächenhydrophobie der „Polystyrol-Kerne“ vor der Saatpolymerisation mit PBCA stärker ausgeprägt war (Steigung ca. 26,9 ml/m²). Lediglich das ZP zeigte größere Unterschiede, wobei die unbeladenen Partikel die größte Ladung aufwiesen. Das ZP der beladenen Partikel war jeweils ca. 10 mV geringer.

5.4.2.1 Adsorptionsmuster nach Inkubation in Humanplasma

In Abb. 5.4-4 sind die 2-D-Pherogramme der beschriebenen MC81cs-Partikel nach Inkubation in Humanplasma gegenüber gestellt. Auf den ersten Blick fiel auf, dass die Plasmaproteinadsorptionsmuster untereinander sehr ähnlich waren und wie bei

SLN (bzw. im Gegensatz zu Gelatine-Nanopartikeln) die Apolipoproteine dominierten. Da die Oberfläche der Partikel aus PBCA bestand und bereits zuvor mit reinen PBCA-Nanopartikeln eine Anreicherung dieser Proteine gezeigt werden konnte (Lück, 1997), war dieses Ergebnis nicht überraschend.

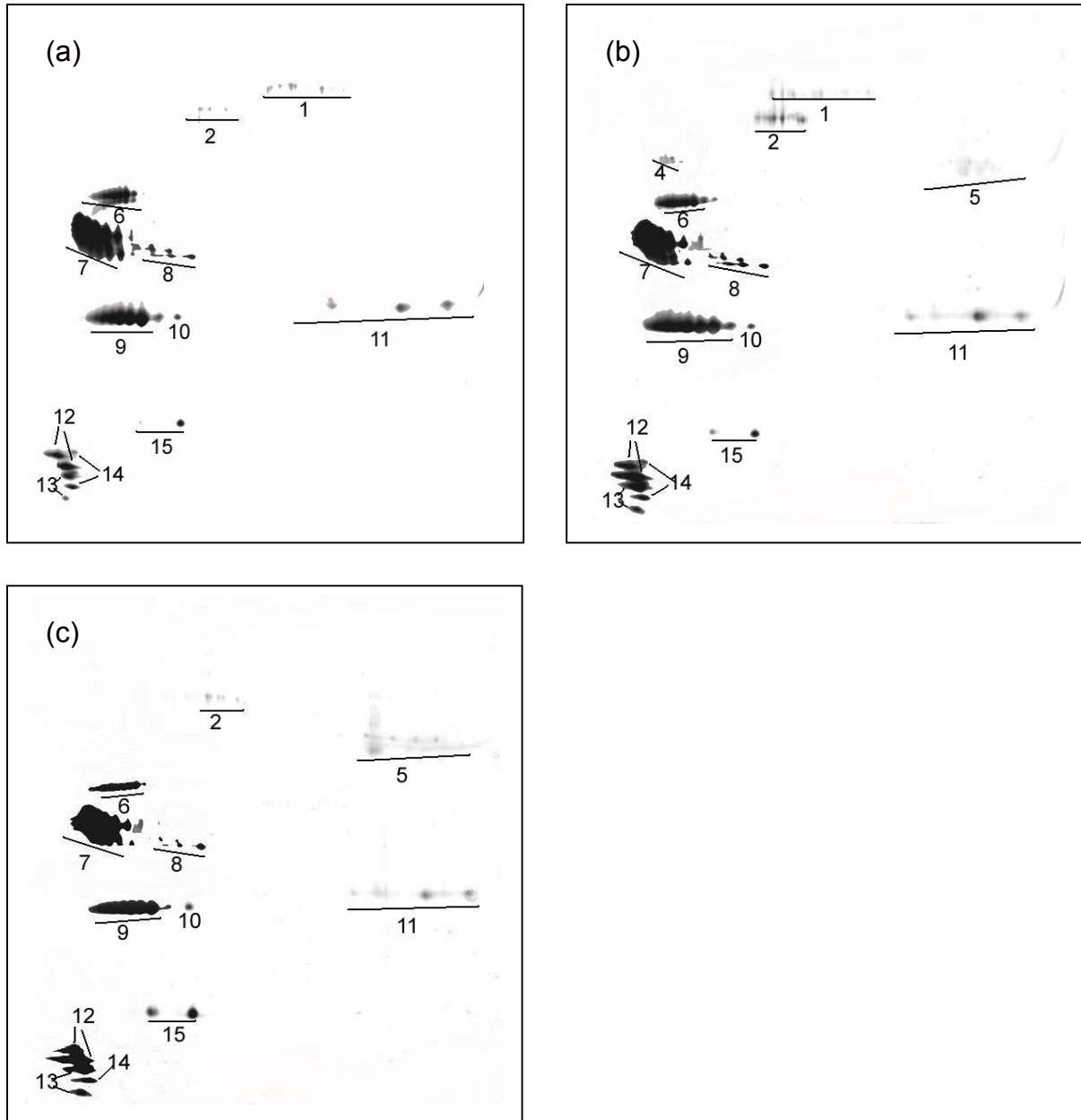


Abb. 5.4-4: Proteinadsorptionsmuster auf (a) MC81cs, (b) MC81cs+PM bzw. (c) MC81+SM nach Inkubation in Humanplasma.. Die ganzen Gele sind gezeigt (Abszisse: pH 4-9 (von links nach rechts), Ordinate: MW 250 kDa-6 kDa (von oben nach unten)). Markierte Proteinspots: (1) IgM μ Kette, (2) Albumin, (4) α 1-Antitrypsin, (5) IgG γ Kette, (6) ApoA-IV, (7) ApoJ, (8) ApoE, (9) ApoA-I, (10) ProApoA-I, (11) Ig leichte Ketten, (12) ApoC-III, (13) ApoC-II, (14) ApoA-II, (15) Transthyretin.

Überraschend war lediglich die Tatsache, dass fast ausschließlich Apolipoproteine auf den Partikeln adsorbierten und z. B. Albumin, welches das Hauptprotein auf unmodifizierten, 264 nm PBCA-Partikeln war (27,9%) (Lück, 1997), nur in vernachlässigbarer Menge detektiert wurde (vgl. Abb. 5.4-5).

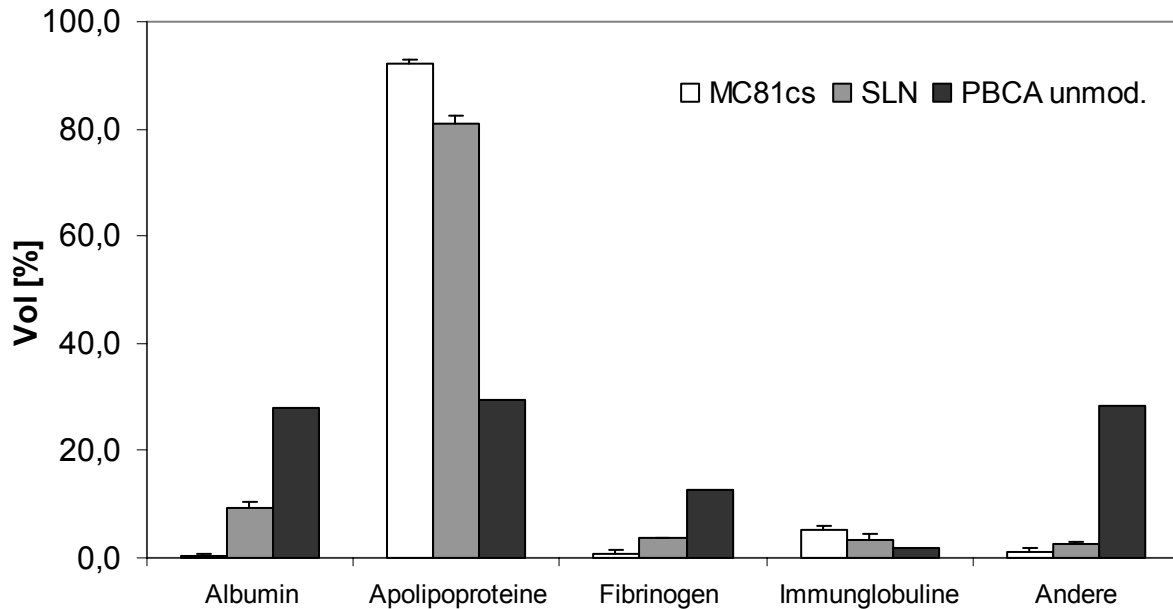


Abb. 5.4-5: Plasmaproteinadsorptionsmuster auf MC81cs-Polymerpartikeln, SLN (n = 2) bzw. unmodifizierten PBCA-Partikeln (n = 1, Daten von Lück (1997)).

Die Gründe für diese überdurchschnittlich starke Anreicherung von Apolipoproteinen (ca. 92%) auf MC81cs-Partikeln blieben unklar. Auch eine mögliche unvollständige Saatpolymerisation (bzw. Umhüllung) wäre keine befriedigende Erklärung, denn die entsprechenden Polystyrol-Kerne zeigten auch keine ausgeprägte Oberflächenhydrophobie (vgl. Abb. 5.4-3). Andererseits erklärt die schwach ausgeprägte Oberflächenhydrophobie von MC81cs zumindest das Ausbleiben der Adsorption von Oponinen wie z. B. Fibrinogen, sodass die hohe Adsorption von Apolipoproteinen eventuell auch nur als „opportunistisch“ angesehen werden kann.

Abb. 5.4-6 zeigt die genauen Zusammensetzungen der adsorbierten Proteinschichten. Der bereits bei qualitativer Betrachtung der Gele festgestellte Eindruck wurde hier durch die semiquantitative Auswertung bestätigt. Sowohl die qualitativen als auch die quantitativen Zusammensetzungen der adsorbierten Proteine auf unbeladenen bzw. arzneistoffbeladenen MC81cs-Partikeln waren sehr ähnlich. Die einzigen kleinen Unterschiede, die festgestellt werden konnten, waren eine etwas höhere Adsorption von ApoJ bzw. eine etwas erniedrigte Adsorption von ApoA-I,

ApoA-IV und ApoC-II auf unbeladenen MC81cs-Partikeln. Mit anderen Worten, da die Beladung der Partikel mit PM bzw. SM nur einen sehr geringen Einfluss auf das Adsorptionsmuster nach Inkubation in Humanplasma hatte, konnte davon ausgegangen werden, dass die Arzneistoffe die Oberflächeneigenschaften der Partikel nicht entscheidend beeinflussen (mit Ausnahme des geringeren ZP) und entsprechend weitgehend in der PBCA-Hülle der Partikel lokalisiert sein dürften. Selbst SM mit seiner vergleichsweise großen Molekülstruktur (MW = 843,1) (Abb. 5.4-2) hatte keinen größeren Einfluss auf das Adsorptionsmuster.

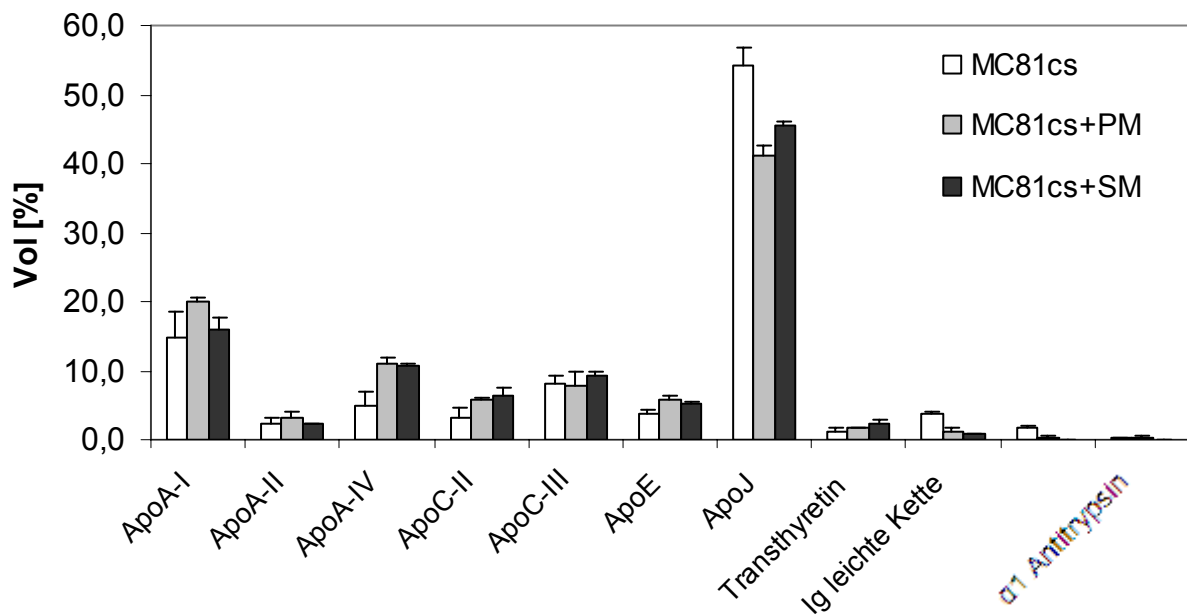


Abb. 5.4-6: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Proteinmuster auf MC81cs-Polymerpartikeln nach Inkubation in Humanplasma (in Volumen [%]), n = 2.

Interessant war die Betrachtung der Gele auch unter dem Aspekt eines eventuellen Gehirn-Targetings mit diesen Partikeln. Wie bereits erwähnt, befinden sich die Parasiten bei einer Reaktivierungstoxoplasmose hauptsächlich in Zysten im Gehirn. Deshalb kann eine Therapie nur erfolgen, wenn der Arzneistoff die BHS überwinden kann. Die untersuchten MC81cs-Polymerpartikel scheinen durchaus in der Lage zu sein, ähnlich wie die beschriebenen PBCA-PS80 (Müller et al., 2001), Arzneistoffe durch die BHS zu transportieren, da es nicht nur zu einer Anreicherung von ApoE auf diesen Partikeln kam, sondern vor allem, weil die Anreicherung der typischen Opsonine wie z. B. IgG ausblieb.

In Abb. 5.4-7 sind die aus der Sicht des Gehirn-Targetings wichtigsten Eigenschaften der Adsorptionsmuster dieser Partikel zusammengefasst und mit denen von PBCA-PS80 bzw. P235-SLN verglichen.

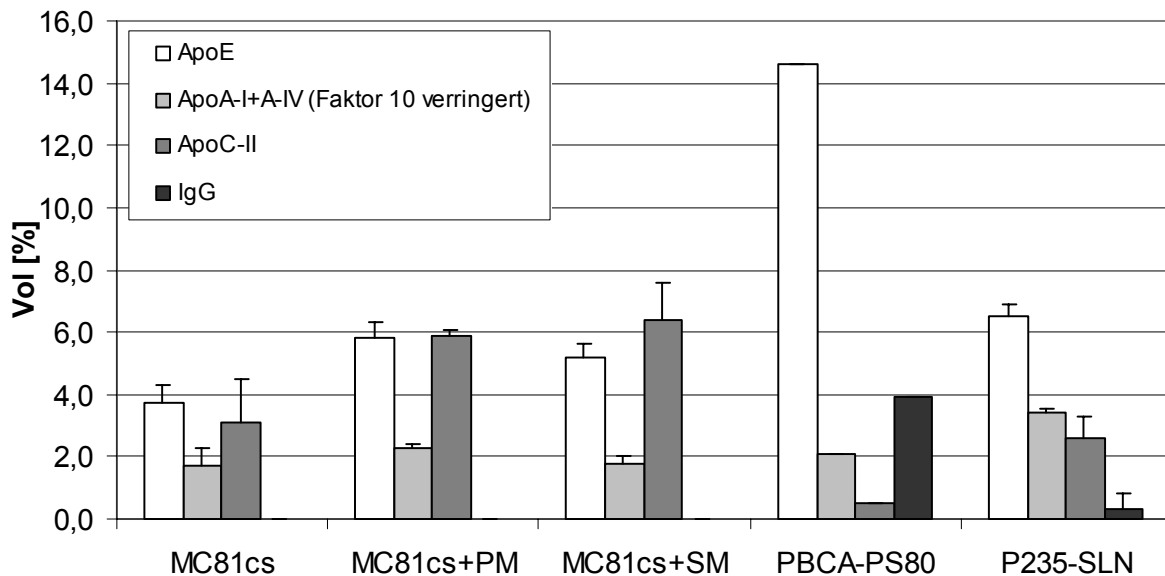


Abb. 5.4-7: MC81cs-Polymerpartikel in der Gegenüberstellung mit der vermeintlich besten SLN-Formulierung P235 (n = 2) bzw. mit dem Goldstandard PBCA-PS80 (n = 1, Daten von Lück (1997)).

Wenn man PBCA-PS80 als Goldstandard für die Effizienz beim Arzneistofftransport über die BHS annimmt, kann man hier gut erkennen, dass man weder mit MC81cs noch mit P235-SLN einen derart hohen relativen Anteil von ApoE (14,6%) an der Gesamtmenge adsorbierter Proteine erreichen konnte. Auch die Adsorption von ApoC-II, die der Bindung von ApoE an den LDL-Rezeptor entgegenwirkt, war auf PBCA-PS80 am geringsten. Andererseits waren die Werte der Alternativsysteme aber auch nicht so weit vom Goldstandard entfernt, wie die vieler anderer Systeme. Hinzu kommt, dass die Adsorption von IgG auf MC81cs bzw. P235-SLN geringer und die Adsorption von ApoA-I und ApoA-IV höher war als auf PBCA-PS80, was die „schlechteren Werte“ von ApoE und ApoC-II (zumindest teilweise) kompensieren könnte.

Bei einem derartigen Vergleich muss jedoch berücksichtigt werden, dass MC81cs-Partikel wohl zu ähnlichen Toxizitätsproblemen führen wie PBCA-PS80. Wie bereits ausführlich beschrieben, ist dies bei SLN nicht zu erwarten, weshalb P235-SLN den beiden anderen Systemen, trotz des geringeren relativen Anteils an adsorbiertem ApoE, wohl überlegen sein dürfte. P235-SLN sind den MC81cs-Partikel ohnehin bei den Werten von ApoE, ApoA-I+A-IV und ApoC-II überlegen.

5.4.2.2 Adsorptionsmuster nach Inkubation in FBS

Zusätzlich zu dem Adsorptionsmuster nach Inkubation in Humanplasma wurde das Muster nach Inkubation in FBS (Biochrom AG, Berlin) bestimmt, da dieses als Medium für die *In-vitro*-Zellversuche verwendet wurde. Tab. 5.4-2 zeigt den Vergleich der Zusammensetzungen der beiden Medien.

Tab. 5.4-2: Proteinzusammensetzung von FBS bzw. Humanplasma nach der Eiweiß-Elektrophorese. α -Globulin: u. a. α 1-Antitrypsin und α 1-Glycoprotein; β -Globulin: u. a. Apolipoproteine und Fibrinogen; γ -Globulin: fast ausschließlich Immunglobuline. F gibt an, um welchen Faktor die jeweilige Proteinfraktion im Humanplasma konzentrierter ist

	FBS	Humanplasma	Faktor F
Albumin [g/100 ml]	2,3	3,8-5,2	1,7-2,3
α -Globulin [g/100 ml]	0,40	0,39-0,94	1,0-2,4
β -Globulin [g/100 ml]	0,10	0,50-0,90	5,0-9,0
γ -Globulin [g/100 ml]	0,50	0,70-1,50	1,4-3,0

Es fiel auf, dass insbesondere die Fraktion der Apolipoproteine (β -Globulin-Fraktion) im FBS viel niedriger konzentriert vorliegt als im Humanplasma (5-9 mal geringer). Die anderen Proteinfractionen sind zwar im FBS auch niedriger konzentriert, jedoch nur um den Faktor 1-3.

Da die Konzentrationsverhältnisse der Proteine im Inkubationsmedium eine sehr wichtige Rolle bei der Proteinadsorption spielen (vgl. „Vroman-Effekt“ Kapitel 5.1.4) war deshalb zu erwarten, dass die Apolipoproteine im Vergleich zu den im Humanplasma bestimmten Adsorptionsmustern in einer nicht ganz so großen Menge detektiert werden, sondern entsprechend mehr Albumin, Immunglobuline bzw. andere Proteinspezies wie z. B. α 1-Antitrypsin (die Konzentration der α -Globulin-Fraktion in FBS ist vergleichsweise hoch).

In Abb. 5.4-8 sind die resultierenden 2-DE-Gele von MC81cs bzw. MC81cs+SM dargestellt. Die qualitative Auswertung zeigte, dass es hier erwartungsgemäß (aufgrund der höheren relativen Konzentration in FBS) zu einer höheren Adsorption von Albumin auf den Partikeln kam.

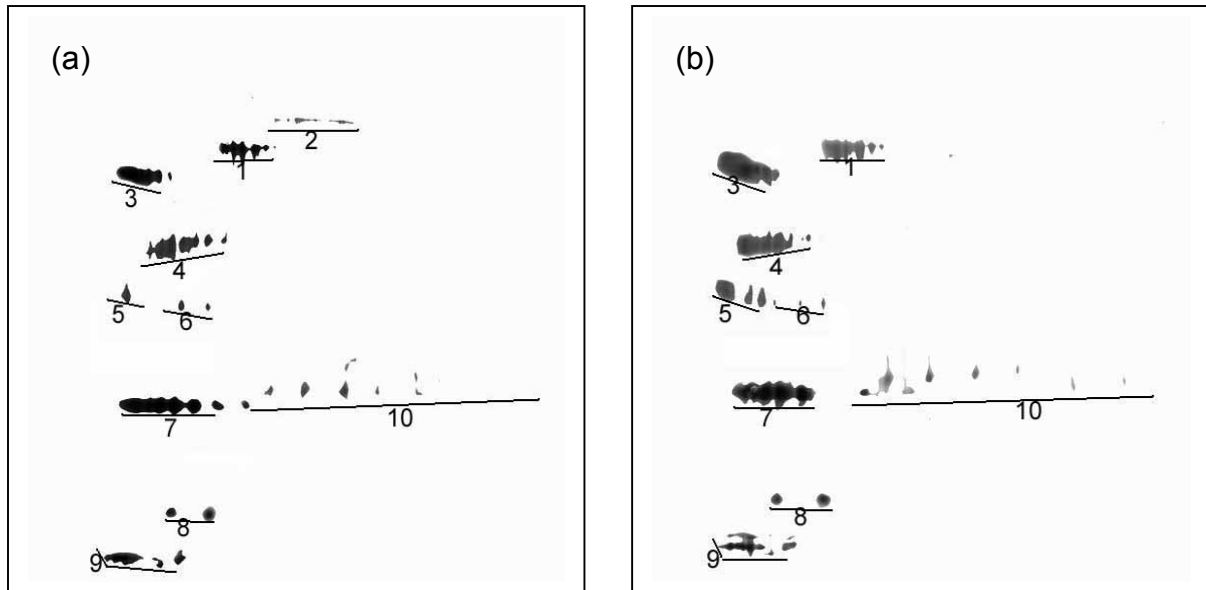


Abb. 5.4-8: Proteinadsorptionsmuster auf (a) MC81cs bzw. (b) MC81cs+SM nach Inkubation in FBS. Die ganzen Gele sind gezeigt. Markierte Proteinspots: **(1) Albumin**, **(2) IgM μ Kette**, **(3) α 1-Antitrypsin**, **(4) ApoA-IV**, **(5) ApoJ**, **(6) ApoE**, **(7) ApoA-I**, **(8) Transthyretin**, **(9) ApoC**, **(10) Ig leichte Ketten**.

Die Gegenüberstellung der relativen Mengenanteile der wichtigsten Proteingruppen (Abb. 5.4-9) zeigte, dass die Zunahme der Anteile von Albumin, der Immunglobuline bzw. der anderen Proteine (v. a. α 1-Antitrypsin) wie erwartet auf Kosten der Apolipoproteine ging.

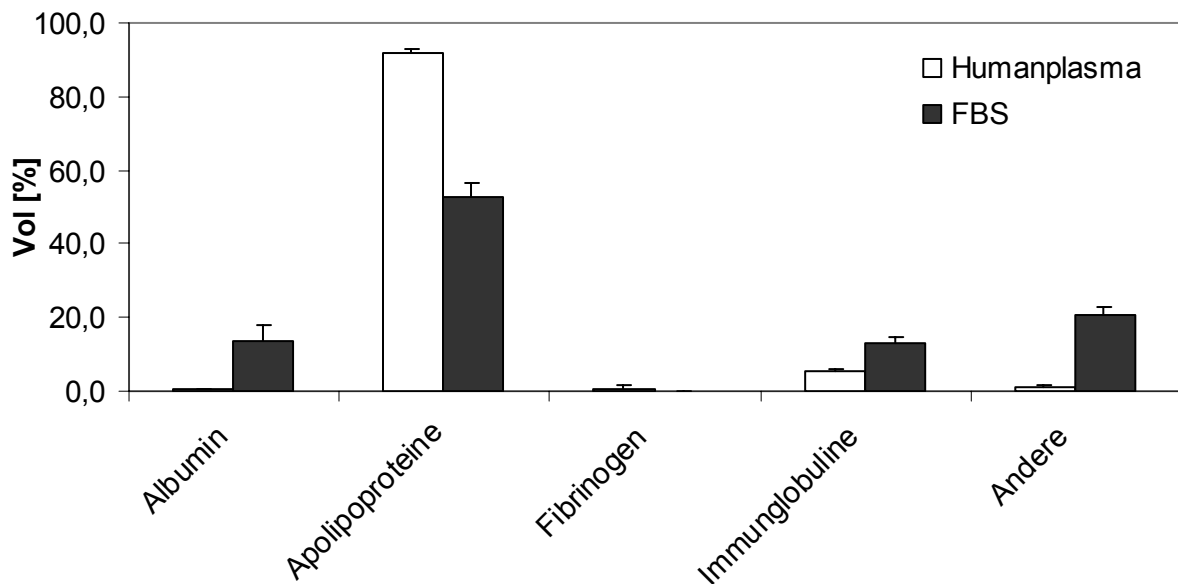


Abb. 5.4-9: Plasmaproteinadsorptionsmuster auf MC81cs nach Inkubation in Humanplasma bzw. FBS, n = 2.

Abb. 5.4-10 zeigt die genauen Zusammensetzungen der adsorbierten Proteinschichten auf den Partikeln nach Inkubation in FBS.

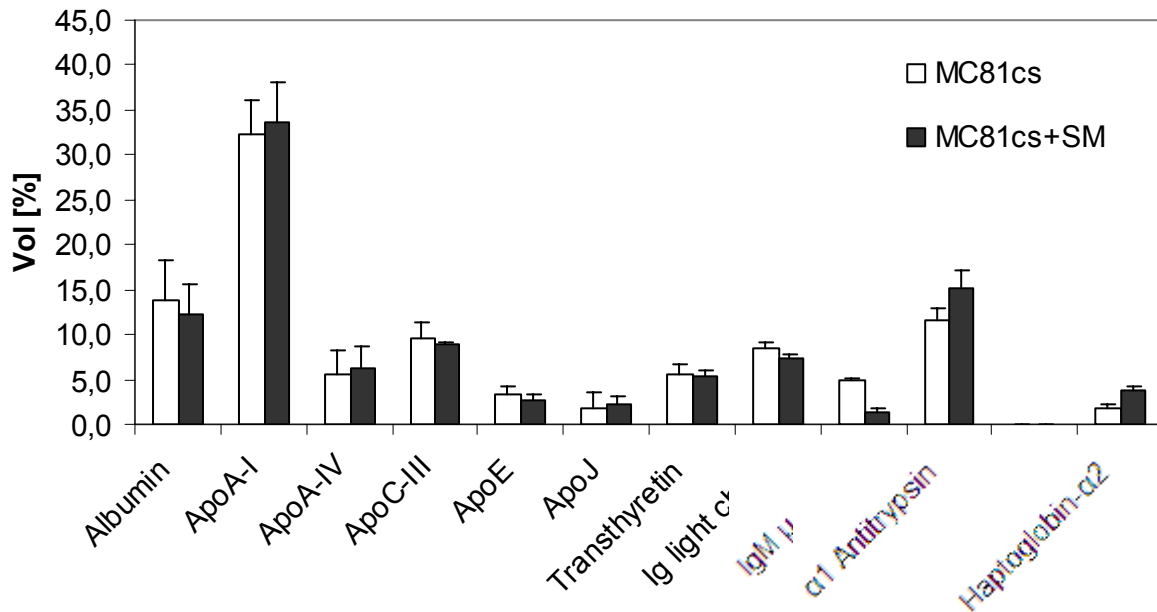


Abb. 5.4-10: Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Proteinmuster auf MC81-Polymerpartikeln nach Inkubation in FBS (in Volumen [%]), n = 2.

Wie nach Inkubation in Humanplasma waren auch hier die Proteinmuster von unbeladenen und arzneistoffbeladenen Partikeln nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ fast identisch, so dass aus Sicht der Proteinadsorption bei den Zellaufnahmeversuchen keine großen Unterschiede zu erwarten wären.

Überraschend war allerdings, dass ApoJ, das Hauptprotein des Adsorptionsmusters nach Inkubation in Humanplasma, auf diesen Gelen nur noch eine sehr untergeordnete Rolle spielte. Dagegen war hier ApoA-I das Hauptprotein, was eventuell durch unterschiedliche Zusammensetzungen innerhalb der β -Globulin-Fractionen von Humanplasma und FBS bedingt sein könnte.

5.4.3 Ergebnisse der *In-vitro*-Zellversuche mit „Kern-Schale-Nanopartikeln“

Da *T. gondii* ein obligat intrazellulärer Parasit ist und vor allem Zellen des MPS infiziert, ist dort der primäre therapeutische Angriffspunkt. Entsprechend bestand das *In-vitro*-Modell aus einer Zellpopulation von Makrophagen der Maus, die mit *T. gondii* GFP infiziert wurden. Für eine Kurzbeschreibung der Methode siehe Kapitel 4.5, eine ausführliche Darstellung findet sich in der Dissertation von Frau Leyke (Leyke, 2006).

Um den Infektions- bzw. den Heilungsverlauf zu beschreiben, wurden drei Parameter definiert:

1. Anzahl infizierter Zellen bezogen auf die Infektionskontrolle (Abb. 5.4-11).
2. Anzahl der extrazellulären Parasiten bezogen auf die Einsaat (korreliert mit der intrazellulären Vermehrung von *T. gondii*) (Abb. 5.4-12)
3. Prozentualer Anteil infizierter Zellen (Tab. 5.4-3).

Alle drei Parameter sind Indikatoren für einen therapeutischen Effekt, aber nur zusammen können sie zeigen, ob der Effekt mit einer Therapie im Tiermodell vergleichbar ist (Leyke et al., 2005).

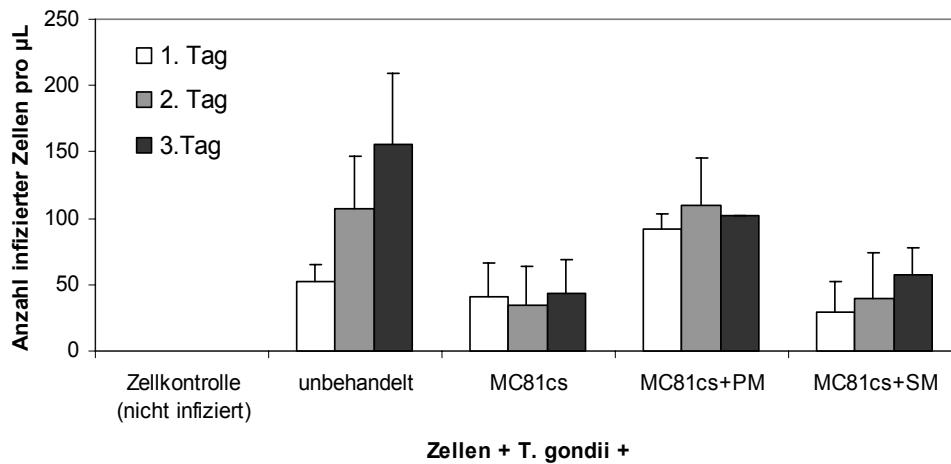


Abb. 5.4-11: Anzahl der infizierten Zellen. n = 7, Fehlerbalken: Standardabweichung (Leyke, 2006).

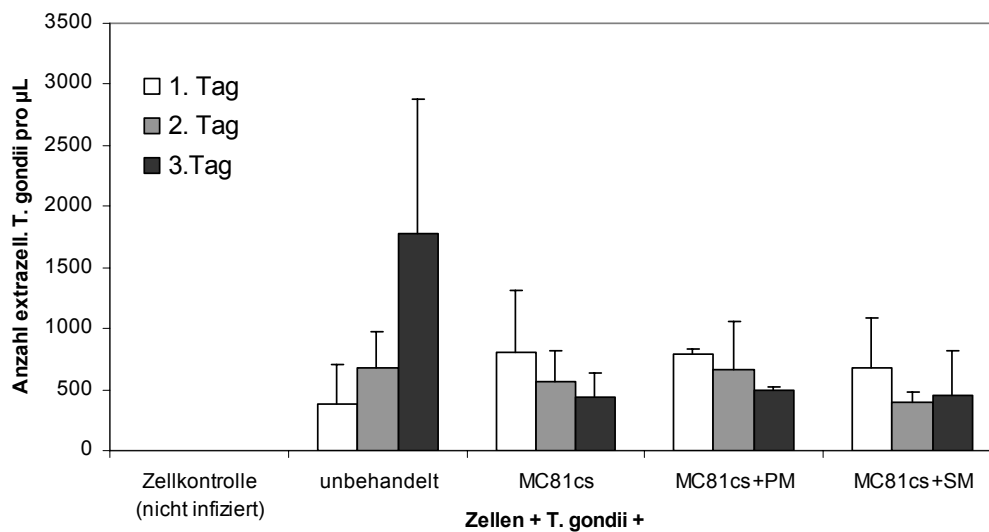


Abb. 5.4-12: Anzahl der extrazellulären Parasiten in der nicht infizierten Zellkontrolle und den unbehandelten bzw. den behandelten Zellen. n = 7, Fehlerbalken: Standardabweichung (Leyke, 2006).

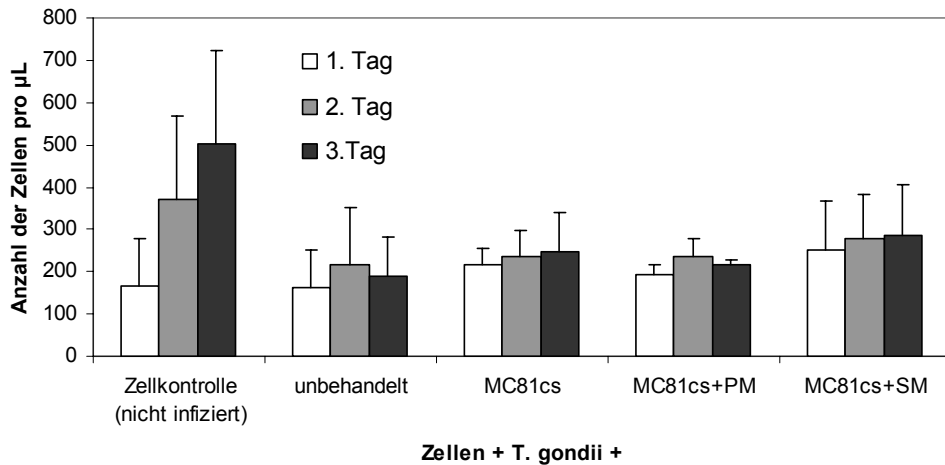


Abb. 5.4-13: Gesamtzellzahl der nicht infizierten Kontrolle und der infizierten, unbehandelten bzw. der behandelten Zellen. n = 7, Fehlerbalken: Standardabweichung (Leyke, 2006).

Tab. 5.4-3: Prozentualer Anteil infizierter Zellen (Quotient aus infizierter Zellenzahl und Gesamtzellzahl) (Leyke, 2006)

	unbehandelt	MC81cs	MC81cs+PM	MC81cs+SM
1. Tag	31,9%	18,9%	47,1%	11,6%
2. Tag	49,8%	14,8%	46,1%	14,3%
3. Tag	82,0%	17,9%	47,0%	20,3%

Im Falle einer ausbleibenden Therapie stieg die absolute Zahl (Abb. 5.4-11) bzw. der prozentuale Anteil (Tab. 5.4-3) der infizierten Zellen und die Zahl der extrazellulären Parasiten (Abb. 5.4-12) kontinuierlich an.

MC81cs-Partikel zeigten tatsächlich (auch ohne Arzneistoffbeladung) einen therapeutischen Effekt. Die absolute Zahl der infizierten Zellen blieb konstant (Abb. 5.4-11) und der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl nahm sogar ab (Tab. 5.4-3). Auch nahm die Anzahl der extrazellulären Parasiten kontinuierlich ab (Abb. 5.4-12). Man erklärt sich diesen therapeutische Effekt durch eine unspezifische, aber starke Stimulation der Makrophagen durch die „Fremdpartikel“ (Leyke et al., 2005). Wie bereits beschrieben, kommt es durch die Toxoplasmen zu einer Unterdrückung der Makrophagen-Aktivität. Dies wurde durch Zugabe von MC81cs offensichtlich wieder aufgehoben.

Durch Arzneistoffbeladung konnte der therapeutische Effekt von MC81cs nicht verstärkt werden. Im Gegenteil, es kam sogar (teilweise) zu einer Verschlechterung. So nahm bei MC81cs+PM und MC81cs+SM die Zahl der extrazellulären Parasiten zwar auch kontinuierlich ab (Abb. 5.4-12), jedoch kam es bei MC81cs+PM nur zu

einer schwachen Abnahme und bei MC81cs+SM sogar zu einer Zunahme des prozentualen Anteils der infizierten Zellen (Tab. 5.4-3). Wie bereits einleitend beschrieben ist die Wirkung dieser Arzneistoffe gegenüber *T. gondii* ohnehin eher mäßig, sodass die stimulierende Wirkung der Polymerpartikel auf das Immunsystem den therapeutischen Effekt der Arzneistoffe wohl überwiegt.

Die Proteinadsorptionsmuster der drei Partikel nach Inkubation im Zellmedium (FBS) (Abb. 5.4-10) und im Humanplasma (Abb. 5.4-6) wurden nach erster Interpretation zwar als gleichwertig eingestuft. Angesichts der Ergebnisse der *In-vitro*-Zellstudie fielen jedoch wohl auch kleinere Unterschiede in den Mustern stärker ins Gewicht, als ursprünglich vermutet. So war vor allem interessant, dass der etwas stärkere therapeutische Effekt der unbeladenen MC81cs-Partikel durch eine etwas stärkere Anreicherung von IgM auf der Oberfläche bedingt sein könnte (Tab. 5.4-4).

Tab. 5.4-4: Korrelation der Ergebnisse der 2-DE-Analyse mit denen der *In-vitro*-Zellstudie. n. b. = nicht bestimmt

	MC81cs	MC81cs+PM	MC81cs+SM
IgM (Humanplasma)	1,8%	0,3%	0,1%
IgM (FBS)	4,9%	n. b.	1,3%
Prozentualer Anteil der infizierten Zellen (Vgl. Tag 1 mit Tag 3)	von 18,9% auf 17,9%	von 47,1% auf 47,0%	von 11,6% auf 20,3%

Da IgM als Opsonin die Phagozytose der Partikel fördert, könnte es zu einer stärkeren Aufnahme von MC81cs in die Makrophagen gekommen sein, weshalb diese Partikel, trotz fehlender Arzneistoffbeladung, eine bessere therapeutische Wirkung in diesem *In-vitro*-Modell zeigten.

5.4.4 Zusammenfassung und Fazit

Die Proteinadsorptionsmuster auf unbeladenen (MC81cs) und arzneistoffbeladenen „Kern-Schale-Nanopartikeln“ wurden nach Inkubation in Humanplasma bzw. FBS bestimmt. Sie zeigten untereinander jeweils keine größeren qualitativen oder quantitativen Unterschiede, was angesichts der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften nicht überraschend war. Die Muster wurden von Apolipoproteinen dominiert und die Partikel könnten Potential besitzen für einen Arzneistofftransport

über die BHS. Überraschend wurde im *In-vitro*-Zellversuch eine etwas stärkere therapeutische Wirkung der unbeladenen MC81cs festgestellt. Eine mögliche Ursache, neben der schwachen pharmakologischen Wirkung der beiden eingesetzten Arzneistoffe, könnte die vergleichsweise stärkere Adsorption von Oponinen (v. a. IgM) auf MC81cs sein. Da es sich bei dem verwendeten *In-vitro*-Zellmodell um Makrophagen handelte und eine stärkere Oponisierung somit zu einer Verstärkung der Phagozytose führt, ist eine Anreicherung von Oponinen in diesem Falle von Vorteil. Da es sich sowohl bei dem therapeutischen Effekt als auch bei der Abstufung der Adsorption von IgM um kleine aber trotzdem deutliche Unterschiede handelte, kann daraus gefolgert werden, dass durchaus auch kleine Veränderungen im Proteinadsorptionsmuster entsprechende Effekte *in vitro* (bzw. eventuell dann auch *in vivo*) mit sich ziehen könnten. Dies trifft wohl vor allem dann zu, wenn diese Veränderungen ein Protein betreffen, das den therapeutischen Effekt entscheidend beeinflusst. Demnach könnte z. B. auch eine kleine Erhöhung der Adsorption von ApoE durchaus schon eine merkliche Verbesserung beim Arzneistofftransport über die BHS bewirken.

