

Optimierung  
Apolipoprotein-modifizierter Albumin Nanopartikel  
zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
  
vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
Frankfurt am Main

Von  
Sebastian Dreis  
aus Mainz

Frankfurt am Main, 2007

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter 1: Prof. Dr. Jörg Kreuter

Gutachter 2: Prof. Dr. Jochen Klein

Datum der Dissertation:.....





## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter angefertigt.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter für die Möglichkeit der Promotion in seinem Arbeitskreis und die Vergabe dieses interessanten Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Klaus Langer für die sehr gute Betreuung und die anregenden Diskussionen. Aus den wissenschaftlichen Gesprächen ergaben sich immer neue Anregungen und Ideen für die hier vorliegende Arbeit.

Danken möchte ich Frau Dr. Svetlana Gelperina für die Durchführung und Koordination der In-vivo-Versuche in Moskau.

Für die In-vitro-Versuche bedanke ich mich beim Institut für medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main besonders bei Herrn PD Dr. Martin Michaelis und Herrn Florian Rothweiler.

Weiter gilt mein Dank den Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Technologie insbesondere Frau Sonja Arnold, Frau Melisande Holzer, Frau Elisabeth Herbert, Frau Dr. Kerstin Michaelis und Herrn Dr. Alexander Bootz. Vielen Dank für die konstruktiven Gespräche und Hilfe bei der Durchführung von In-vivo-Versuchen.

Ich danke Frau Dr. Tikva Vogel für die Bereitstellung der großen Mengen Apolipoprotein E3.

Auch bedanken möchte ich mich bei der Firma Lohmann Therapie Systeme (Andernach) für die finanzielle Unterstützung ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die mir während meiner gesamten Ausbildungsphase immer zur Seite gestanden haben.

Schließlich danke ich meiner Freundin Anja Zensi für die Hilfe bei den Experimenten, die Korrektur meiner Doktorarbeit und immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>3</b>
2.1	Die Blut-Hirn-Schranke .....	3
2.1.1	Aufbau, Struktur und Funktion der BHS .....	3
2.1.2	Arzneistofftransport ins ZNS .....	4
2.1.2.1	Intrazerebrale Injektion oder Infusion .....	6
2.1.2.2	Modulation der BHS .....	7
2.1.2.3	Ausnutzung aktiver Transportmechanismen der BHS.....	8
2.1.2.4	Hemmung von Efflux-Transportern .....	9
2.2	Drug-Targeting .....	3
2.2.1	Passives Drug-Targeting .....	11
2.2.2	Aktives Drug-Targeting .....	13
2.2.2.1	ApoE3 als Drug-Targeting-Ligand zur Überwindung der BHS.....	14
2.2.2.2	Struktur von ApoE .....	15
2.2.2.3	ApoE-Rezeptoren .....	16
2.3	Nanopartikel .....	18
2.4	Zytostatika-beladene Trägersysteme.....	20
2.4.1	Doxorubicin .....	20
2.4.1.1	Physikochemische Eigenschaften .....	22
2.4.1.2	Wirkmechanismus und Nebenwirkungen .....	23
2.4.2	Drug-Delivery-Systeme mit Doxorubicin .....	24
2.4.2.1	Lösliche Konjugate von Doxorubicin .....	24
2.4.2.2	Liposomen mit Doxorubicin .....	25
2.4.2.3	Nanopartikel mit Doxorubicin .....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
3.1	Herstellung von Albumin Nanopartikeln .....	28

3.2	Oberflächenmodifikation von Albumin Nanopartikeln .....	28
3.2.1	Thiolierung von Proteinen .....	29
3.2.1.1	Thiolierung von Apolipoproteinen .....	29
3.2.1.2	Thiolierung von NeutrAvidin .....	30
3.2.1.3	Bestimmung der eingeführten SH-Gruppen .....	30
3.2.2	Aktivierung der Albumin Nanopartikel mit .....	
	bifunktionalen Crosslinkern .....	31
3.2.2.1	NHS-PEG-MAL Crosslinker.....	31
3.2.2.2	Aktivierte HSA-NP.....	31
3.2.3	Konjugation des thiolierten Proteins mit den .....	
	aktivierten HSA-NP .....	32
3.2.3.1	Konjugation von thioliertem ApoE3 an aktivierte HSA-NP....	32
3.2.3.2	Konjugation von thioliertem NAV an aktivierte HSA-NP.....	33
3.2.3.3	Indirekte Bestimmung des konjugierten Proteins.....	34
3.2.3.3.1	Bestimmung mittels UV-VIS-Spektroskopie .....	34
3.2.3.3.2	Bestimmung von ApoE3 mittels Micro-BCA-Assay .....	34
3.2.3.3.3	Bestimmung von ApoE3 mittels SDS-Page und .....	
	Western-Blot.....	34
3.2.3.4	Bindung von Proteinen über das .....	
	NeutrAvidin-Biotin-System .....	36
3.2.3.5	Biotinylierung von ApoE3 .....	36
3.2.3.6	Konjugation von biotinyliertem ApoE3 an NAV-PEG-NP.....	36
3.2.4	Pegylierung der Oberfläche von HSA-NP .....	37
3.2.5	Überzug der Nanopartikel mit Tween 80.....	37
3.3	Loperamid-beladene Albumin Nanopartikel .....	28
3.3.1	Loperamid .....	38
3.3.2	HPLC-Analytik von Loperamid.....	38
3.3.3	Beladung der HSA-NP mit Loperamid.....	38
3.3.4	Beladungsbestimmung .....	39
3.3.5	Desorption von Loperamid .....	39
3.4	Doxorubicin-beladene Nanopartikel.....	38
3.4.1	Doxorubicin .....	40



3.4.2	HPLC-Analytik von Doxorubicin .....	41
3.4.3	Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA .....	41
3.4.3.1	Vorversuche.....	42
3.4.3.2	Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA .....	42
3.4.4	Doxorubicin-Beladung von HSA-NP .....	42
3.4.4.1	Adsorption von Doxorubicin an leere HSA-NP.....	43
3.4.4.2	Einbindung von Doxorubicin in HSA-NP .....	43
3.4.5	Freisetzung von Doxorubicin aus Nanopartikeln .....	44
3.4.6	Langzeitstabilität von Doxorubicin-inkorporierten HSA-NP ....	44
3.4.7	Oberflächenmodifikation von Doxorubicin-beladenen HSA-NP.....	45
3.5	Charakterisierung der Nanopartikel.....	40
3.5.1	Partikelgröße und Zetapotential .....	45
3.5.2	Gehaltsbestimmung (Gravimetrie) .....	46
3.6	Herstellung von Apolipoprotein- und Loperamid-Lösungen .....	45
3.6.1	Herstellung einer ApoE3-Lösung .....	47
3.6.2	Herstellung einer Loperamid-Lösung .....	47
3.6.3	Herstellung einer ApoE3-Loperamid-Lösung .....	47
3.7	In-vitro-Testung (Zellkultur) .....	47
3.7.1	Eingesetzte Zelllinien .....	48
3.7.2	Zell-Viabilitäts-Assay (MTT-Test) .....	48
3.7.3	Testung Doxorubicin-beladener HSA-NP.....	50
3.8	In-vivo-Testung .....	47
3.8.1	In-vivo-Test Loperamid-beladener Nanopartikel .....	50
3.8.1.1	Tail-Flick-Test .....	50
3.8.1.1.1	Verwendete Versuchstiere.....	51
3.8.1.1.2	Durchführung des Tail-Flick-Tests .....	52
3.8.1.1.3	Getestete Zubereitungen .....	53
3.8.2	In-vivo-Test Doxorubicin-beladener HSA-NP .....	54
3.8.2.1	Behandlung von Gehirntumor-tragenden Ratten.....	54
3.8.2.1.1	Versuchstiere.....	55

3.8.2.1.2	Implantation des Tumorgewebes .....	55
3.8.2.1.3	Behandlungsschema und Durchführung .....	56
3.8.2.2	Subchronische toxikologische Studie .....	57
3.8.2.2.1	Versuchstiere .....	58
3.8.2.2.2	Behandlungsschema und Durchführung .....	58
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
4.1	Herstellung und Charakteristika von HSA-NP .....	63
4.1.1	Größe und Zetapotential .....	63
4.1.2	Gravimetrie .....	63
4.2	Bindung von ApoE3 an die Oberfläche von HSA-NP .....	64
4.2.1	Kovalente Bindung von ApoE3 .....	64
4.2.1.1	NHS-PEG-MAL Crosslinker .....	64
4.2.1.2	Thiolierung von ApoE3 .....	66
4.2.1.3	Konjugation und Beladungsbestimmung von thioliertem ApoE3 an aktivierte HSA-NP .....	68
4.2.2	Bindung von ApoE3 über das NeutrAvidin-Biotin-System .....	71
4.3	Loperamid-beladene Nanopartikel .....	60
4.3.1	Beladungsbestimmung von Loperamid .....	73
4.3.1.1	Beladung unmodifizierter Nanopartikel mit Loperamid .....	73
4.3.1.2	Beladung modifizierter Nanopartikel mit Loperamid .....	74
4.3.2	Tail-Flick-Test mit Loperamid-beladenen Nanopartikeln .....	75
4.3.3	Versuchsreihe A .....	75
4.3.4	Desorption von Loperamid .....	79
4.3.5	Schlussfolgerung .....	82
4.3.6	Tail-Flick-Test: Getrennte und zeitversetzte Applikation von ApoE3-NP oder ApoE3-Lösung und Loperamid .....	83
4.3.6.1	Versuchsreihe B .....	83
4.3.6.2	Versuchsreihe C .....	88
4.4	Doxorubicin-beladene Nanopartikel .....	72
4.4.1	Adsorption von Doxorubicin an HSA .....	91

4.4.1.1	Vorversuche.....	91
4.4.1.2	Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA .....	92
4.4.2	Beladung der Nanopartikel.....	95
4.4.2.1	Adsorption von Doxorubicin an die Oberfläche .....	
	der Nanopartikel.....	96
4.4.2.2	Einbindung von Doxorubicin in die Partikelmatrix .....	97
4.4.2.2.1	Freisetzung von Nanopartikeln mit .....	
	eingebundenem Doxorubicin .....	102
4.4.2.2.2	Langzeitstabilität von Doxorubicin-inkorporierten .....	
	HSA-NP.....	104
4.4.3	In-vitro-Testung der Dxr-NP mittels Zell-Viabilitäts-Assay ...	105
4.4.3.1	UKF-NB3-Zelllinie .....	106
4.4.3.2	IMR-32-Zelllinie.....	108
4.4.3.3	Schlussfolgerung .....	109
4.4.4	In-vivo-Testung der Dxr-NP.....	105
4.4.4.1	Behandlung von Gehirntumor-tragende Ratten .....	111
4.4.4.1.1	Versuchsreihe 1: Dxr-NP mit inkorporiertem .....	
	Doxorubicin .....	111
4.4.4.1.2	Versuchsreihe 2: Dxr-NP mit adsorptiv .....	
	gebundenem Doxorubicin .....	114
4.4.4.1.3	Schlussfolgerung .....	116
4.4.4.2	Subchronische toxikologische Studie mit Dxr-NP .....	118
4.4.4.2.1	Gewicht, Hämatologie, Elektrokardiographie.....	120
4.4.4.2.1.1	Gewicht .....	120
4.4.4.2.1.2	Hämatologie.....	121
4.4.4.2.1.3	Elektrokardiographie.....	123
4.4.4.2.2	Organ/Körpergewicht-Index .....	124
4.4.4.2.3	Histologie von Herz- und Hodengewebe .....	127
4.4.4.2.3.1	Histologie des Herzwebes.....	127
4.4.4.2.3.2	Histologie des Hodengewebes .....	129
4.4.4.2.4	Schlussfolgerung .....	131

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>133</b>
5.1	Herstellung und Charakterisierung der ApoE3-modifizierten Nanopartikel.....	133
5.2	Tail-Flick-Test Loperamid-beladener Nanopartikel .....	134
5.3	Doxorubicin-beladene Nanopartikel.....	135
5.3.1	In-vitro-Testung der Dxr-NP .....	135
5.3.2	In-vivo-Testung der Dxr-NP.....	136
5.4	Fazit.....	136
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>154</b>
7.1	Materialien und Geräte .....	154
7.1.1	Laborgeräte.....	154
7.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	155
7.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	155
7.1.4	Puffer und Fließmittel.....	157
7.1.5	Zellen .....	157
7.1.6	Tiere .....	158
7.2	Verwendete Abkürzungen.....	158
7.3	Lebenslauf .....	161
7.4	Publikationsliste .....	161
7.5	Kongressbeiträge .....	163

# 1 Einleitung

Das Gehirn höherer Tiere ist durch die Blut-Hirn-Schranke vor dem Eindringen toxischer und schädlicher Substanzen geschützt. Allerdings bildet diese Barriere auch ein Hindernis für die gezielte medikamentöse Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie zum Beispiel Alzheimer, Gehirntumore oder Parkinson. Leider sind nur wenige potentielle Arzneistoffe für die Therapie dieser Krankheiten in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Somit stellt die Blut-Hirn-Schranke einen limitierenden Faktor für die Arzneimitteltherapie dar.

Besonders zur Behandlung von Gehirntumoren stehen bis heute nur wenige Arzneistoffe zur Verfügung. Viele der klassischen, wirkungsvollen Chemotherapeutika können nicht eingesetzt werden, da sie eine zu geringe bis gar keine Blut-Hirn-Passage besitzen. Um diese Schwierigkeiten bei der Arzneimitteltherapie zu umgehen, werden verschiedene Lösungsansätze verfolgt.

Zum einen ist es möglich, neue Arzneistoffe zu synthetisieren, die eine gute Blut-Hirn-Passage aufweisen. Dies ist jedoch ein sehr aufwendiger und kostspieliger Prozess. Die neuen Arzneistoffe müssen zuerst ausreichend auf ihr Wirkungsprofil hin getestet und pharmakologisch und pharmakokinetisch charakterisiert werden. Weitaus einfacher wäre es hingegen auf bereits bekannte und altbewährte Zytostatika zurückzugreifen und diese durch geeignete Techniken gehirngängig zu machen.

Ein weiteres Problem während der Behandlung mit Zytostatika sind die sehr starken Nebenwirkungen, da der Arzneistoff sich im ganzen Körper meist ungerichtet verteilt und die zytostatische Wirkung auch gesunde Zellen beeinflusst. Zudem wäre eine gezielte Anreicherung im Zielgewebe sinnvoll, da somit die chemotherapeutische Dosis reduziert werden könnte.

Eine Lösung für beide Probleme stellt das aktive Drug-Targeting dar. Hierbei kann entweder der Arzneistoff selbst modifiziert oder ein

geeignetes Trägersystem benutzt werden, um die Anreicherung des Arzneistoffs im Zielgewebe zu erhöhen.

Besonders kolloidale Trägersysteme wie Liposomen und Nanopartikel bergen ein großes Drug-Targeting-Potential. Sie sind von ihrer Größe her sehr gut intravenös applizierbar, haben eine große Trägerkapazität und sind bei der Verwendung geeigneter Materialien im Organismus bioabbaubar und nicht antigen. Die Wirkstoffe können entweder adsorptiv an das Trägersystem oder innerhalb der Partikelmatrix gebunden werden. Durch Veränderung der Oberfläche und Einführung von geeigneten Liganden kann eine zielgerichtete Anreicherung im kranken Gewebe oder sogar das Überwinden von Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke erreicht werden.

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Herstellung, Charakterisierung, In-vitro- und In-vivo-Testung Liganden-modifizierter Nanopartikel auf Proteinbasis zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Als Ligand wurde das Apolipoprotein E, ein Bestandteil von physiologisch vorkommenden HDL, VLDL und LDL-Partikel, verwendet, welches sich in vorangegangenen Untersuchungen als potentieller Ligand zum Transport von Nanopartikeln ins Gehirn erwiesen hat. Diese so mit Apolipoprotein modifizierten Nanopartikel wurden mit dem Modellarzneistoff Loperamid, einem nicht gehirngängigen Opioid, beladen. Diese Zubereitung wurde Mäusen injiziert und der analgetische Effekt mittels des Tail-Flick-Tests bestimmt. Um auch eine therapeutische Anwendung zu erzielen, wurden Apolipoprotein-modifizierte Partikel beladen mit dem Zytostatikum Doxorubicin entwickelt und die chemotherapeutische Effizienz an Gehirntumor tragenden Ratten getestet.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Existenz der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurde zum ersten Mal im 19. Jahrhundert durch den Bakteriologen Paul Ehrlich entdeckt. Er experimentierte mit Anilin-Farbstoffen, die er Ratten injizierte. Hierbei stellte er fest, dass die Farbstoffe alle Organe der Versuchstiere anfärbten, mit Ausnahme des Gehirns (Ehrlich, 1885). 1909 machte Edwin Goldmann, ein Schüler Ehrlichs, eine Gegenkontrolle, indem er dieselben Farbstoffe in das Rückenmark von Ratten injizierte. Das Resultat war, dass das zentrale Nervensystem (ZNS) eingefärbt wurde, der Rest des Körpers aber frei blieb von Farbstoff (Goldman, 1909). Somit war die Existenz einer Barriere zwischen ZNS und dem restlichen Körper bzw. Blutkreislauf erwiesen. Es wurde spekuliert, dass der Grund für dieses Phänomen in der Struktur der Blutgefäße zu finden sei. Allerdings konnten diese Strukturen, die „Tight Junctions“, erst in den 60er Jahren mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden.

#### 2.1.1 Aufbau, Struktur und Funktion der BHS

Alle höheren Lebewesen mit einem komplexen Nervensystem besitzen eine BHS. Diese BHS trennt das ZNS vom übrigen Körper ab und ermöglicht so die Bildung eines abgetrennten Raumes im Organismus. Sie dient der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns, indem sie das Eindringen toxischer Substanzen aus dem Blutstrom in das ZNS verhindert, vor Schwankungen der Blutbestandteile schützt und Konzentrationsunterschiede zwischen Blut und ZNS aufrechterhält. Gebildet wird sie durch zerebrale endotheliale Zellen, die die Kapillaren des Gehirnes ausbilden. Diese Endothelzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie an ihren seitlichen Berührungspunkten sehr stark verdichtete Strukturen aus transmembranösen Proteinen aufweisen (Brightman and Reese, 1969). Diese „Tight Junctions“ verhindern eine freie passive Diffusion von Blutbestandteilen über den parazellulären Weg. Des

Weiteren sind auch andere Zellen wie Perizyten, Astrozyten, Mikroglia und Axonenden an dem Aufbau der BHS beteiligt (Abbildung 1). Besonders die auf der abluminalen Seite die Kapillaren vollständig umgebenden Astrozyten sollen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Eigenschaften der BHS und der Differenzierung der Endothelzellen spielen (Abbott, 2002). Die Barrierefunktion der BHS wird unterstützt durch eine geringe Pinozytoserate, eine hohe metabolische Aktivität und das Vorhandensein von Efflux-Transportern auf der luminalen Seite des Endothels. Im Vergleich zu anderen im Organismus vorkommenden Endothelien zeichnet sich die BHS durch einen hohen transendothelialen Widerstand (TEER) von  $1500\text{-}2000\ \Omega\cdot\text{cm}^2$  aus (Butt et al., 1990). Wegen dieser zahlreichen Schutzmechanismen sind Transportwege für die Versorgung des ZNS mit essentiellen Substanzen vorhanden (Punkt 2.1.2.3).

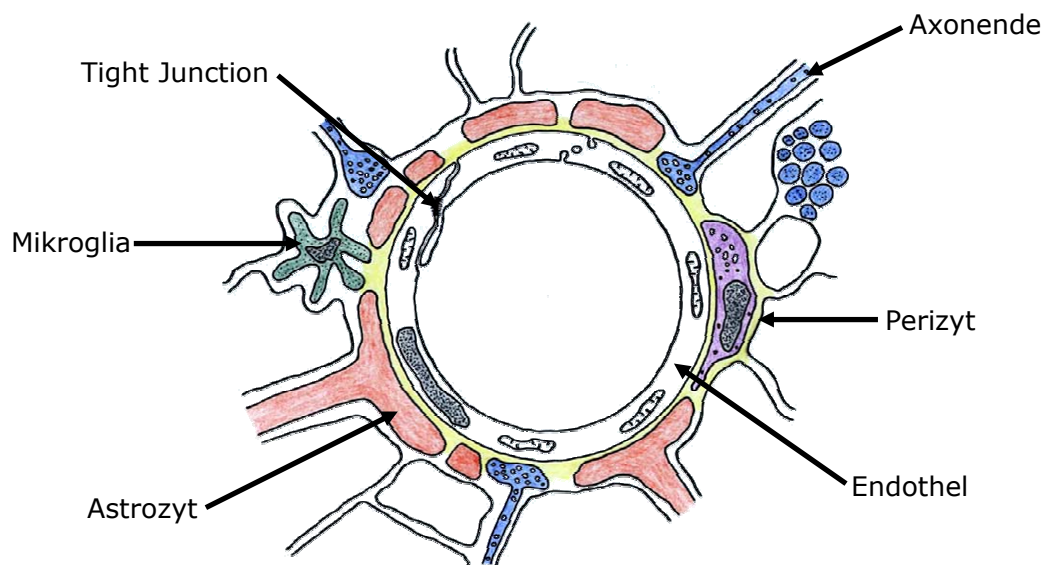


Abbildung 1 Schematische Zeichnung der neurovaskulären Zellen, die die BHS ausbilden, Abbildung modifiziert nach (Begley, 2004a)

### 2.1.2 Arzneistofftransport ins ZNS

Bei der Behandlung von Erkrankungen des ZNS wie z.B. Alzheimer, Parkinson, Meningitis, Enzephalitis und Gehirntumoren ist die BHS der limitierende Faktor für die Arzneimitteltherapie. Viele Arzneistoffe sind nicht in der Lage, die BHS in einer für einen therapeutischen Erfolg



ausreichenden Konzentration zu überwinden. Grund hierfür ist, dass ein passiver Transport auf dem parazellulären oder transzellulären Weg von mehreren physikochemischen Eigenschaften abhängig ist. So hat eine Vielzahl von Arzneistoffen, die zur Behandlungen von Erkrankungen des ZNS eingesetzt werden, ein Molekulargewicht von 150 bis 500 Da, einen log P Wert zwischen -0,5 und 6,0 sowie eine geringe Polarität (Bodor and Buchwald, 2003; Pardridge, 2005). Besonders der log P Wert bzw. die Lipophilie eines Moleküls scheint ein ausschlaggebender Faktor für die Gehirngängigkeit zu sein. So wurde in der Vergangenheit versucht Arzneistoffe mit einer hohen Lipophilie zu entwickeln, die sich im Gehirn anreichern können. Allerdings ergaben sich daraus wiederum andere Probleme, wie z.B. eine verringerte Löslichkeit und Bioverfügbarkeit, eine erhöhte Plasmaeiweißbindung und eine erhöhte Aufnahme der Substanzen durch die Leber oder das retikuloendotheliale System (RES). In den folgenden Abschnitten werden weitere Strategien für den Arzneistofftransport in das Gehirn dargelegt. Diese sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

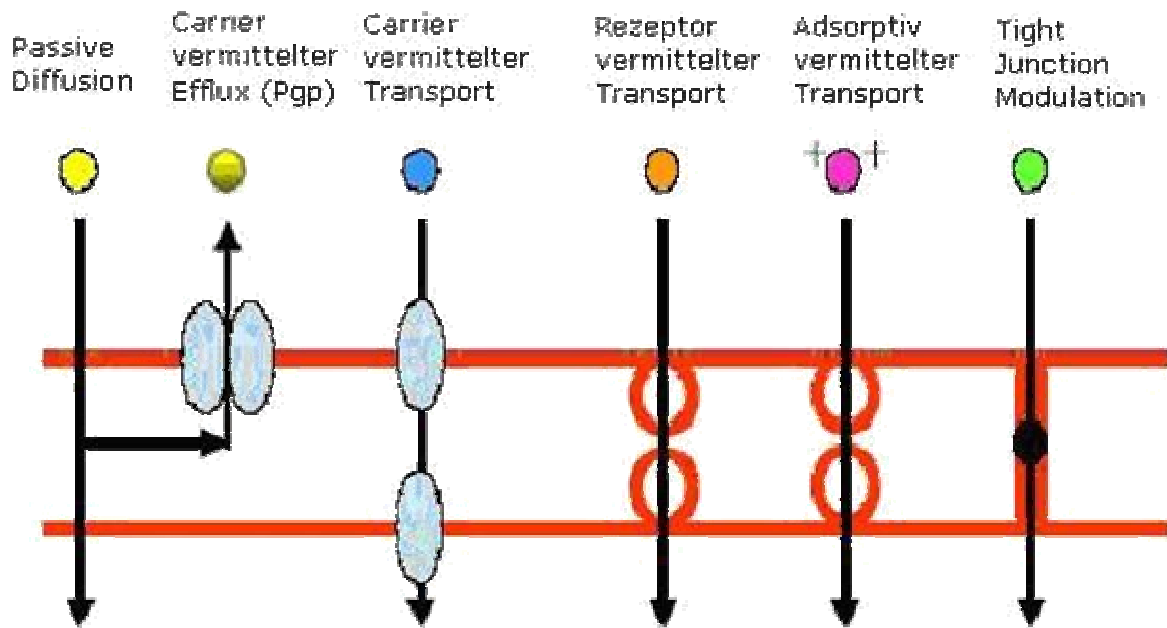


Abbildung 2 Schematische Darstellung möglicher Transportwege für Arzneistoffe zur Überwindung der BHS; Abbildung modifiziert nach (Begley, 2004a)

### 2.1.2.1 Intrazerebrale Injektion oder Infusion

Eine sehr nahe liegende Methode die BHS zu überwinden, ist die direkte Injektion des Arzneistoffs oder eines Arzneistoff-tragenden Implantats in das Hirngewebe. Gerade durch die Einpflanzung eines Implantats kann eine verzögerte und lang anhaltende Freisetzung erzielt werden. Solch eine intrazerebrale Implantation birgt allerdings immer ein hohes Risiko. Im Falle eines Implantats könnte umliegendes Hirngewebe verletzt werden, während durch eine flüssige Injektion der Flüssigkeitsdruck das Hirngewebe schädigen könnte. Generell besteht jedoch die Gefahr einer Infektion. Des Weiteren besteht der Nachteil, dass die Diffusionsstrecke von Arzneistoffen im Gehirn sehr begrenzt ist und nur ca. 1 mm von der Injektionsstelle beträgt (Krewson et al., 1995) und der injizierte Arzneistoff sehr schnell von neu gebildeter Gehirnflüssigkeit abtransportiert wird (Begley, 2004b).

### 2.1.2.2 Modulation der BHS

Die Modulation der „Tight Junctions“ zwischen den Gehirnendothelzellen, um den parazellulären Transport freizugeben, ist eine weitere Methode Arzneistoffe aus dem Blutkreislauf in das Gehirn zu transportieren. Angewandt wurde diese Methode allerdings bisher nur bei Patienten mit Gehirntumoren (Haluska and Anthony, 2004). Hierzu wird eine hypertone Lösung von Arabinose oder Mannitol für 30 Sekunden über die Halsschlagader (Arteria Carotis) infundiert. Dies führt zu einem Schrumpfen der Gehirnendothelzellen aufgrund von osmotischem Wasserverlust und endet in einem Ablösen der extrazellulären Proteine der „Tight Junctions“. Die Öffnung der BHS auf diese Weise hält für bis zu 30 Minuten an. Während dieses Zeitraumes kann ein ebenfalls über die Halsschlagader infundierter Arzneistoff über die BHS ins Gehirn gelangen (Rapoport, 2001). Nachteil dieser Desintegration der BHS ist, dass durch die osmotische Öffnung der parazelluläre Weg über die BHS vollständig geöffnet wird und auch andere größere Bestandteile wie z.B. Toxine und Viren ins Gehirn gelangen können.

Eine weitere Möglichkeit die Durchlässigkeit der BHS zu modulieren besteht durch das Peptid Bradikinin bzw. durch den Bradikinin-Agonisten Cereport (Kemper et al., 2004). Durch beide Substanzen wird der intrazelluläre Calcium-Spiegel der Endothelzellen angehoben, was wiederum Proteine der „Tight Junctions“ beeinflusst und somit deren Durchlässigkeit verändert.

Durch welchen Mechanismus Alkylglycerole die Durchlässigkeit der BHS beeinflussen ist bisher noch unklar. Die Infusion dieser Substanzen über die Arteria Carotis führt zu einer reversiblen Öffnung der BHS für ca. 120 Minuten (Erdlenbruch et al., 2003).

Ebenfalls genutzte Techniken sind die Öffnung der BHS mittels Ultraschall und elektromagnetischer Strahlung. Hierbei wird vermutet, dass ein Erwärmen des Hirngewebes die Integrität der „Tight Junctions“ modulieren könnte. Letztgenannte Strahlung wird besonders in der

Telekommunikationsbranche bei der Benutzung von Mobiltelefonen heiß diskutiert.

Allen Methoden gemeinsam ist, dass die Öffnung der BHS nicht selektiv erfolgt und sich somit potentiell toxische Substanzen im ZNS anreichern könnten.

### 2.1.2.3 Ausnutzung aktiver Transportmechanismen der BHS

Die bereits beschriebenen Methoden hatten überwiegend zum Ziel den passiven Transport von Arzneistoffen in das Gehirn über den parazellulären Weg zu verbessern. Es existieren aber auch zahlreiche aktive Transportmechanismen an der BHS. Diese können in den adsorptiv vermittelten Transport (AMT), den Carrier vermittelten Transport (CMT) und den Rezeptor vermittelten Transport (RMT) unterteilt werden (de Boer et al., 2003).

Bei dem AMT lagern sich kationisierte Proteine oder Peptide aufgrund ihrer Ladung an die negativ geladenen Gehirnendothelmembranen an und induzieren dadurch direkt die Bildung von Vesikeln und deren Internalisierung. Somit ist es möglich durch Kopplung von Arzneistoffen an positiv geladene Proteine die Aufnahme der Arzneistoffe in das ZNS zu verbessern (Mazel et al., 2001).

Durch den CMT werden spezielle endogene kleine Moleküle (< 500 Da) durch einen aktiven, ATP-abhängigen Transporter auf der luminalen Seite der Endothelmembran in die Zellen eingeschleust und auf der abluminalen Seite in das ZNS sezerniert. Auf diese Weise werden z.B. Aminosäuren, Glukose, Nukleoside und kleine Peptide transportiert, die ansonsten nicht das Gehirn erreichen würden. All diese Transporter sind speziell für eine kleine Anzahl an Substraten maßgeschneidert und lassen keine Bindung von Substanzen zu, die nicht den stereochemischen Anforderungen des Carriers entsprechen. Um diese Carrier für den Arzneistofftransport über die BHS auszunutzen, müssen demnach gezielt Arzneistoffe synthetisiert werden. Ein Beispiel hierfür ist der „große neutrale Aminosäuren

Transporter“, der eine relativ weite Variation von Substraten akzeptiert. Die über ihn zu transportierenden Stoffe müssen lediglich eine Carboxyl- und Amino-Gruppe am gleichen C-Atom (oder andere bioisostere funktionelle Gruppen) sowie einen sperrigen hydrophoben Teil aufweisen (Smith and Stoll, 1999). Einige Arzneistoffe wie z.B. Baclofen, L-Dopa und  $\alpha$ -Methyl-Dopa haben eine Affinität zu diesem Carrier und werden auf diesem Weg in das Gehirn transportiert. Auch andere ZNS aktive Arzneistoffe wie Diphenhydramin, Lidocain und Valproinsäure verdanken ihre Wirksamkeit dem CMT (Begley, 2004a).

Größere Proteine und Peptide können nicht nur durch den AMT über die BHS transportiert werden, sondern auch über den RMT. Beim RMT muss das Protein oder Peptid zunächst an einen Rezeptor auf der luminalen Seite der BHS binden. Diese Rezeptor-Liganden-Bindung löst einen endozytotischen Prozess in der luminalen Membran aus und fördert die Bildung eines endozytotischen Vesikels, das den Rezeptor-Liganden-Komplex enthält. Dieses Vesikel kann anschließend durch die Zelle transportiert werden, wobei sich der Rezeptor-Liganden-Komplex wieder löst und das Protein oder Peptid auf der abluminalen Seite der BHS sezerniert wird. Nicht alle Vesikel werden auf der ZNS-Seite exozytiert. Einige verschmelzen auch mit Lysosomen, was zur Folge hat, dass das Protein oder Peptid durch die lysosomalen Enzyme und den sauren pH-Wert hydrolysiert wird. Die Überwindung der BHS mittels RMT ist eine viel versprechende Methode Arzneistoffe in das ZNS einzuschleusen und liegt daher auch im Fokus dieser Arbeit. Weitere Ausführungen hierzu werden unter Punkt 2.2.2 gemacht.

#### 2.1.2.4 Hemmung von Efflux-Transportern

Die Endothelzellen der BHS weisen verschiedene Efflux-Transporter der „ATP-binding-cassette“ (ABC)-Familie auf. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Familie zählt das Para-Glykoprotein (Pgp) mit einem Molekulargewicht von 170 kDa. Zuerst entdeckt wurde es 1976 von Juliano und Ling bei multiresistenten Tumorzellen (Juliano and Ling,

1976). Bis heute wurden zwei Isoformen des Pgp im Menschen nachgewiesen das MDR1 und das MDR2. Pgp hat eine sehr hohe Substratbreite zu der auch zahlreiche Arzneistoffe aus der Gruppe der Zytostatika, Antibiotika, Opiode, Calcium-Kanal-Blocker und viele mehr zählen (Terasaki and Hosoya, 1999). Pgp kommt in vielen Geweben des Körpers in mehr oder weniger großer Dichte vor, wie z.B. in der Niere, im Darm, im Hoden, in der Leber und der Gebärmutterschleimhaut von Schwangeren. Hohe Konzentrationen sind besonders auf der luminalen Seite der Endothelzellen der BHS zu finden. Hier hat das Pgp die Aufgabe Fremdstoffe und potentiell schädliche Substanzen aus den Endothelzellen zurück in den Blutstrom zu pumpen. Das Pgp ist damit maßgeblich an der Barrierefunktion der BHS und der geringen ZNS-Gängigkeit vieler Arzneistoffe beteiligt. Durch den gezielten Einsatz von Inhibitoren dieses Efflux-Systems sollte es möglich sein die Verfügbarkeit vieler therapeutischer Substanzen im Gehirn zu verbessern.

Inhibitoren der 1. Generation sind Verapamil, Cyclosporin A, Chinin und Chinidin. Chinin spielt aktuell eine große Rolle beim Arzneimittelmisbrauch durch Drogenabhängige. So wird Chinin, das als leichtes Muskelrelaxans frei verkäuflich ist (Limptar<sup>®</sup>), von Opioidabhängigen eingenommen um die Gehirngängigkeit des als Antidiarrhoikum eingesetzten Opioids Loperamid (Imodium<sup>®</sup>) zu erhöhen und damit einen Rauschzustand zu erreichen. Diese Möglichkeit wurde bereits von Sadeque et al. im Jahre 2000 in einer klinischen Studie gezeigt und kritisch bewertet (Sadeque et al., 2000). Dennoch wird diese Gefahr vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) in einer Mitteilung vom 20. März 2007 nur als sehr gering eingeschätzt.

Zur 2. Generation der Pgp-Inhibitoren zählen neuere Substanzen wie Valspodar (PSC-833), Elecridar (GF120918) und Biricodar (VX-710) (Fricker and Miller, 2004). In einer In-vivo-Studie mit dem Zytostatikum Paclitaxel, das normalerweise sehr selten bei der Behandlung von Patienten mit Gehirntumor mit intakter BHS eingesetzt wird, wurde Nacktmäusen ein Gehirntumor künstlich intrazerebral eingepflanzt. Vor der

Gabe von Paclitaxel wurden die Mäuse mit dem Pgp-Inhibitor Valspodar vorbehandelt. Dies führte zu einer erhöhten Konzentration von Paclitaxel im Gehirn und somit zu einer Remission des Tumorumfanges um 90% (Fellner et al., 2002).

Die direkte Hemmung des Pgp stellt einen deutlichen therapeutischen Fortschritt dar, wenn eine akute Arzneimittelgabe notwendig ist. Eine dauerhafte Therapie mit Pgp-Inhibitoren ist allerdings kritisch zu sehen, da noch nicht absehbar ist welche Auswirkungen dies auf die protektive Funktion der BHS oder auch auf andere Barrieren im Körper hat.

## **2.2 Drug-Targeting**

Hauptprobleme einer medikamentösen Therapie von Krankheiten ist, dass der Arzneistoff sich im gesamten Körper verteilt, mit der Folge, dass die Arzneistoffkonzentration im pathologischen Gewebe zu niedrig ausfällt. Eine Erhöhung der Dosis erhöht zwar die Konzentration im Zielgewebe, gleichzeitig aber werden dadurch auch medikamentöse Nebenwirkungen und toxische Effekte verstärkt. Wünschenswert wäre somit eine gezielte Anreicherung der therapeutisch wirksamen Substanz im kranken Gewebe. Dieses Prinzip einer selektiven und möglichst quantitativen Anreicherung beschreibt der Begriff des Drug-Targeting, welcher bereits vor über 100 Jahren hypothetisch von Paul Ehrlich beschrieben wurde. Hierbei macht man sich physiologische Unterschiede zwischen normalem und Zielgewebe zu Nutze. Diese Unterschiede können dabei entweder aufgrund der natürlichen Differenzierung des Organismus zustande kommen oder pathologischen Ursprungs sein.

### **2.2.1 Passives Drug-Targeting**

Bei der Verabreichung von Liposomen, Nanopartikeln und anderen kolloidalen Arzneistoffträgern wurde festgestellt, dass sich diese Systeme in erheblichem Maße in den Organen des RES anreichern. Dies bedeutet,

dass diese Arzneistoffträger unspezifisch von Makrophagen phagozytiert und in Leber, Milz, Lunge, Niere und Knochenmark abgelagert werden (Iga et al., 1993). Bei dieser nicht selektiven Anreicherung von Arzneistoffen handelt es sich um ein passives Drug-Targeting, da die verabreichte Arzneiform nicht selbst aktiv zu diesem Effekt beiträgt. Oft ist dieser Effekt aber eher unerwünscht, da er zu einer erhöhten Clearance der kolloidalen Trägersysteme beiträgt und vollkommen andere Organe als Zielstruktur angestrebt werden. Eine gängige Methode die Anreicherung von makromolekularen Arzneistoffträgern im RES zu minimieren, ist die Hydrophilisierung mittels Polyethylenglykol (PEG)-Ketten. So zeigen Liposomen, die PEG-Ketten an der Oberfläche tragen, eine verlängerte Zirkulationszeit im Organismus, da sie nicht vom RES erkannt werden. Diese Nicht-Erkennung durch Makrophagen des RES wird in der Literatur als „Stealth-Effekt“ bezeichnet (Allen and Hansen, 1991; Newman et al., 1999; Wang et al., 2000).

Ein weiteres Beispiel für passives Drug-Targeting macht man sich in der Onkologie zu Nutze. Die meisten soliden Tumore haben eigene pathophysiologische Charakteristika, wie zum Beispiel eine defekte vaskuläre Struktur. Das heißt, das Endothel des Tumorgewebes weist größere Lücken (100 - 600 nm) als normales gesundes Gewebe auf. Größere Blutbestandteile wie Proteine oder Peptide können ungehindert das pathogene Endothel passieren und sich als Nahrungsbestandteile für den Tumor ablagern. Dieses Phänomen ist in der Literatur als der so genannte „Enhanced Permeability and Retention Effekt“ (EPR-Effekt) beschrieben, der bereits in der Tumorthherapie ausgenutzt wird (Maeda et al., 2000; Tanaka et al., 2004) (Abbildung 3).



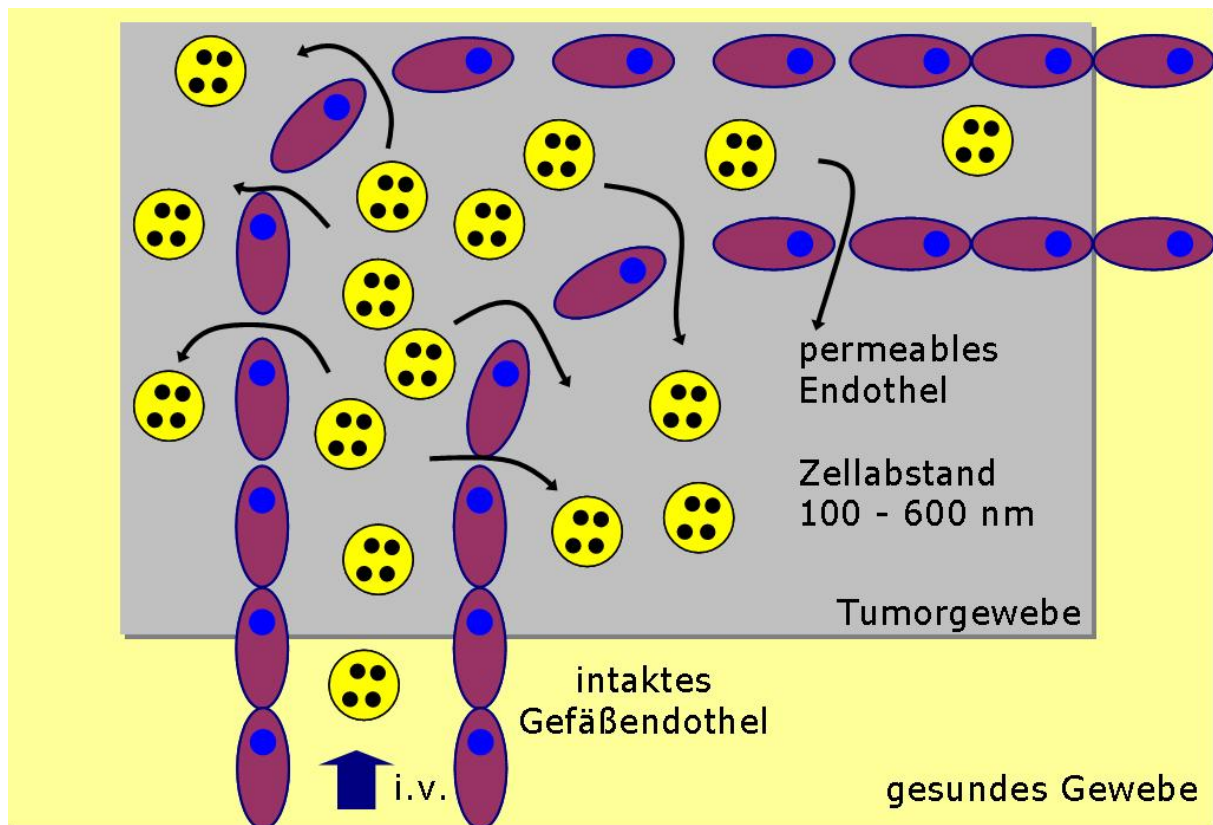


Abbildung 3 Enhanced Permeability and Retention Effekt (EPR-Effekt): Im Gegenteil zu gesundem Gewebe weist das Tumorgewebe ein permeables Endothel auf mit Zellabständen von 100 – 600 nm durch die höher molekulare Substanzen eindringen und sich anreichern können.

### 2.2.2 Aktives Drug-Targeting

Um eine spezifische Anreicherung eines Arzneistoffs im Organismus zu gewährleisten, muss der Arzneistoff mit einem Molekül verbunden werden, das eine spezifische Erkennung und Bindung durch die Zielstruktur gewährleistet. Als solche Drug-Targeting-Liganden kommen z.B. Antikörper, Lipoproteine, Hormone und andere Proteine in Frage. Besonders monoklonale Antikörper wie zum Beispiel der HER2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) werden zum aktiven Targeting eingesetzt. Mit diesem gegen den auf Brustkrebszellen vorkommenden HER2-Rezeptor gerichteten Antikörper war es möglich, eine spezifische Anreicherung von Nanopartikeln in Adieson Brustkrebszellen zu erreichen (Wartlick et al., 2004a). Ein aktives Targeting kann auch eingesetzt werden, um Barrieren wie zum Beispiel die BHS im Organismus zu überwinden. So konnten von

Huwyler et al. 1996 ein Gehirn-Targeting mit Daunomycin beladenen Liposomen erreicht werden. Hierzu wurde der monoklonale Antikörper OX26 eingesetzt, der gegen den auf der luminalen Seite der Gehirndothelzellen vorkommenden Transferrin-Rezeptor gerichtet ist. Liposomen, welche den OX26-Antikörper auf der Oberfläche trugen, zeigten eine Akkumulation im Hirngewebe nach 24 h (Huwyler et al., 1996). Bei diesem aktiven Drug-Targeting zur Überwindung der BHS handelt es sich um einen RMT (Punkt 2.1.2.3). Neben dem Einsatz von Antikörpern können auch Proteine eingesetzt werden, die an ihren entsprechenden Rezeptor binden. Im folgenden Abschnitt wird Apolipoprotein E3 (ApoE3) als potentieller Drug-Targeting-Ligand zur Überwindung der BHS vorgestellt.

### 2.2.2.1 ApoE3 als Drug-Targeting-Ligand zur Überwindung der BHS

Die Entdeckung von ApoE3 als Gehirn-Targeting-Ligand, wie es in dieser Arbeit eingesetzt wurde, ergab sich aus Vorversuchen die BHS mit kolloidalen Trägersystemen zu überwinden. In In-vivo-Experimenten mit Poly(butylcyanoacrylat)-Nanopartikel (PBCA-NP), die das Tensid Tween 80 als Überzug trugen, war es möglich die Arzneistoffe Kytorphin, Dalargin, Doxorubicin, Loperamid und Tubocurarin in das Gehirn der Versuchstiere einzuschleusen und einen zentralen Effekt zu erzielen (Alyautdin et al., 1995; Alyautdin et al., 1997; Schroeder et al., 1998; Gulyaev et al., 1999; Steiniger et al., 2004). Vergleichbare Zubereitungen ohne Tensid-Überzug blieben ohne Effekt. Erst in weiteren Versuchen stellt sich heraus inwiefern das Tensid die Nanopartikel modifiziert und ein Gehirn-Targeting ermöglicht. Aufschluss hierüber ergab die Untersuchung der Adsorption von Plasmaproteinen an Tween 80 überzogene Partikel mittels 2D-Gel-Elektrophorese (Lück et al., 1997). Das erhaltene Adsorptionsmuster zeigte eine deutliche Anlagerung von Lipoproteinen, besonders von Apolipoprotein E (ApoE), Apolipoprotein B (ApoB) und Apolipoprotein A (ApoA). Die Hypothese, dass Apolipoproteine der Schlüsselfaktor für das Gehirn-Targeting sind, wurde von Kreuter et al. 2002 bestätigt, indem

PBCA-NP direkt mit Apolipoproteinen inkubiert und anschließend Mäusen injiziert wurden (Kreuter et al., 2002). Der dabei erzielte zentrale Effekt war bei ApoE besonders stark ausgeprägt. Da eine adsorptive Bindung stets das Risiko einer Desorption während der Zirkulation im Blutstrom mit sich bringt, wurde nach Möglichkeiten gesucht das ApoE dauerhaft zu binden. Erfolg brachte hier die Arbeit von Michaelis et al. 2006, in der ApoE kovalent an Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA) gekoppelt wurde. Mit Hilfe dieses Partikelsystems war es möglich das Opioid Loperamid in das Gehirn von Versuchsmäusen einzubringen und einen analgetischen Effekt zu erzeugen (Michaelis et al., 2006).

#### 2.2.2.2 Struktur von ApoE

ApoE ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa. Es ist Bestandteil von verschiedenen Klassen von Lipoproteinen im Plasma wie Chylomikronen, High-Density-Lipoproteinen (HDL), Low-Density-Lipoproteinen (LDL) und Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL). Hier hat es seine Hauptfunktion darin die Aufnahme dieser Triglycerid- und Cholesterol-haltigen Vesikel in verschiedene Organe im Körper zu vermitteln. Im menschlichen Körper kommen hauptsächlich drei Isoformen von ApoE vor. ApoE3 ist die am häufigsten vorkommende Isoform, gefolgt von ApoE4 das einen Austausch in der Aminosäuresequenz an Position 112 von Cystein durch Arginin hat. ApoE4 spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Arteriosklerose und Alzheimer (Davignon et al., 1988). Die am dritthäufigsten vorkommende Isoform ist das ApoE2 (Position 158 Arginin anstelle von Cystein). Obwohl die Variationen der drei Isoformen außerhalb der Rezeptorbindungsdomäne (Position 136 bis 150) liegen, bestehen Unterschiede in der Affinität zu Lipoprotein-Rezeptoren (Hoffmann et al., 2001). Neben dem Vorkommen im Blutstrom wird ApoE auch in verschiedenen anderen Organen gebildet, wie zum Beispiel dem ZNS. Hier wird ApoE von Astrozyten synthetisiert und ist maßgeblich an der Regeneration und dem Wachstum von Nerven beteiligt. Des Weiteren ist

es ein wichtiger Faktor in der Aufrechterhaltung der Cholesterolemie im Gehirn (Weisgraber et al., 1994).

### 2.2.2.3 ApoE-Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, ist ApoE Bestandteil von Chylomikronen, HDL, LDL und VLDL. Dabei stellt es die entscheidende Komponente dar, die an die entsprechenden Rezeptoren bindet und eine Endozytose der Vesikel vermittelt. Der bekannteste dieser Rezeptoren ist der LDL-Rezeptor (LDLR). Weitere Mitglieder der LDL-Rezeptor-Gen-Familie sind der VLDL-Rezeptor (VLDLR), das LDL-Rezeptor-related-Protein (LRP1), der Megalin-Rezeptor (LRP2) und der ApoE-Rezeptor2 (ApoER2). Insgesamt sind über ein Dutzend Mitglieder dieser Familie bekannt, es werden jedoch nicht alle im Säugetier exprimiert (Nimpf and Schneider, 2000; Herz and Marschang, 2003; Dergunov, 2004). All diese Rezeptoren sind mit einem einzigen Segment in der Plasmamembran verankert und besitzen zytoplasmatische Domänen, die meistens Signalgeber für eine Endozytose enthalten. Eine Cystein-haltige Ligandenbindungsstelle und eine dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Domäne befinden sich bei allen Mitgliedern auf der extrazellulären Seite (Herz and Bock, 2002). In Tabelle 1 sind einige Liganden der LDL-Rezeptor-Gen-Familie aufgeführt.

Tabelle 1 Extrazelluläre Liganden der LDL-Rezeptor-Gen-Familie, aus (Herz and Bock, 2002)

<i>Rezeptor</i>	<i>extrazelluläre Liganden</i>
LDLR	ApoB, ApoE
VLDLR	ApoE, Lipoprotein Lipase, Reelin
LRP1	ApoE, Lipoprotein Lipase, Plasminogen-Aktivator, Faktor XIa, Faktor VIIIa, Faktor VIIa, Komplement C3, Antithrombin III, Amyloid Precursor Protein (APP)
Megalin	ApoE, ApoB, ApoJ, ApoH, Albumin, Plasminogen-Aktivator, Cubilin
ApoER2	ApoE, Reelin

Der LDLR ist der Namensgeber der Familie und wurde zuerst entdeckt. Er kommt nahezu in allen Geweben inklusive der BHS vor. Seine Hauptfunktion ist die Bindung und Endozytose von Cholesterin-tragendem LDL. Die Bindung des LDL erfolgt über ApoE und/oder ApoB. Hierbei spielt allerdings die Isoform des Liganden eine wichtige Rolle. So bindet ApoE3 zu 100% an den LDLR, wohingegen ApoE2 nur eine 5%ige Affinität aufweist (Hoffmann et al., 2001). Bei der Untersuchung dieser beiden Isoformen als Gehirn-Targeting-Liganden stellte Michaelis et al. fest, dass nur ApoE3-modifizierte Nanopartikel in der Lage waren den Arzneistoff Loperamid in das ZNS von Versuchstieren zu transportieren (Michaelis et al., 2006).

Das LRP1 hat eine große Ligandenbreite und wird überwiegend von Hepatozyten und Neuronen im ZNS expremiert. Seine Hauptfunktion ist die Aufnahme von Chylomikronen und großen Triglycerid-haltigen Lipoproteinen. Aber auch andere Funktionen wie die Regulation von Proteasen und Koagulationsfaktoren werden dem LRP1 zugesprochen (Herz and Bock, 2002).

Ein direkter Verwandter des LRP1 ist der Megalin-Rezeptor, auch LRP2 genannt. Er steht in Zusammenhang mit der Aufnahme von Vitamin D<sub>3</sub> aus der Niere, ist aber möglicherweise auch an der Aufnahme von Cholesterin in das ZNS beteiligt oder hat dort eine direkte Funktion als signalgebender Rezeptor (Farese and Herz, 1998).

Die Primärstruktur des VLDLR ist, bis auf eine cysteinreiche Stelle in der Ligandenbindungsstelle, identisch mit der des LDLR. Mit Ausnahme der Leber kommt er überall im Körper vor und vermittelt über ApoE3 die Endozytose von VLDL in Zellen.

ApoER2 kann wie alle anderen Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Gen-Familie ApoE-haltige Lipoproteine binden. Er wird ausschließlich im Gehirn und den Hoden expremiert (Novak et al., 1996). Da das Gehirn bzw. die Astrozyten ein Hauptproduzent von ApoE im Körper sind, könnte der ApoER2 maßgeblich am Lipidtransport zwischen Astrozyten und Neuronen beteiligt sein (Herz and Bock, 2002).

All diese Rezeptoren kommen an der BHS vor und sind somit ein potentielles Traget für ApoE-modifizierte Nanopartikel um die BHS zu überwinden.

### **2.3 Nanopartikel**

Nanopartikel zählen neben Liposomen zu den in der Literatur am ausführlichsten beschriebenen Trägersystemen. Sie sind feste kolloidale Trägersysteme in einem Größenbereich von 1 bis 1000 nm und können Arzneistoffe in ihrer Matrix gelöst oder dispergiert, verkapselt oder an die Oberfläche adsorptiv oder kovalent gebunden tragen (Kreuter, 1983). Nanopartikel können aus natürlichen oder synthetischen Materialien hergestellt werden, wie z.B. Poly(acrylamid) (PAA) (Birrenbach and Speiser, 1976), Poly(methylmethacrylat) (PMMA) (Kreuter and Speiser, 1976), Poly(butylcyanoacrylat) (PBCA) (Couvreur et al., 1982b), Poly(lactic-co-glycolsäure) (PLGA) (Krause et al., 1985), Gelatine (Oppenheim and Stewart, 1979), Alginat (Rajaonarivony et al., 1993) und

Albumin (Marty et al., 1978). Je nach Ausgangsmaterial werden unterschiedliche Herstellungsverfahren angewandt. So werden zum Beispiel Acrylat-Partikel durch Emulsions-Polymerisation, PLGA-Partikel durch eine „Double Emulsion“-Methode oder „Solvent Evaporation“ und Partikel auf Proteinbasis durch Desolvatation hergestellt.

Der Fokus dieser Arbeit richtet sich auf Nanopartikel aus HSA. Die Verwendung eines nativen Proteins als Matrixmaterial für Nanopartikel hat eindeutige Vorteile. Die Partikel besitzen eine geringe Antigenität, sind bioabbaubar, haben eine hohe Trägerkapazität, sind gut intravenös (i.v.) applizierbar, haben an ihrer Oberfläche funktionelle Gruppe für proteinchemische Reaktionen und können reproduzierbar durch Desolvatation hergestellt werden (Weber et al., 2000; Langer et al., 2003) (Abbildung 4). Es befinden sich bereits einige Handelspräparate, die Albumin Nanopartikel beinhalten, auf dem Markt. Eingesetzt werden die Präparate Albunex<sup>®</sup> (Molecular Biosystems, San Diego, USA) und Optison<sup>®</sup> (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB) als Ultraschallkontrastmittel für den linken Ventrikel des Herzens (Feinstein et al., 1990; Geny et al., 1993). Eine therapeutische Anwendung ist erst seit dem Jahr 2005 mit dem Arzneimittel Abraxane<sup>®</sup> (Abraxis Oncology, Schaumburg, USA) in den USA zugelassen. Es besteht aus Paclitaxel beladenen Albumin Nanopartikeln (130 nm), die zur Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms eingesetzt werden und gegenüber herkömmlichen Paclitaxel-Zubereitungen eine verbesserte Applikation und ein besseres pharmakologisches und toxikologisches Profil aufweisen (Damascelli et al., 2001; Ibrahim et al., 2002).

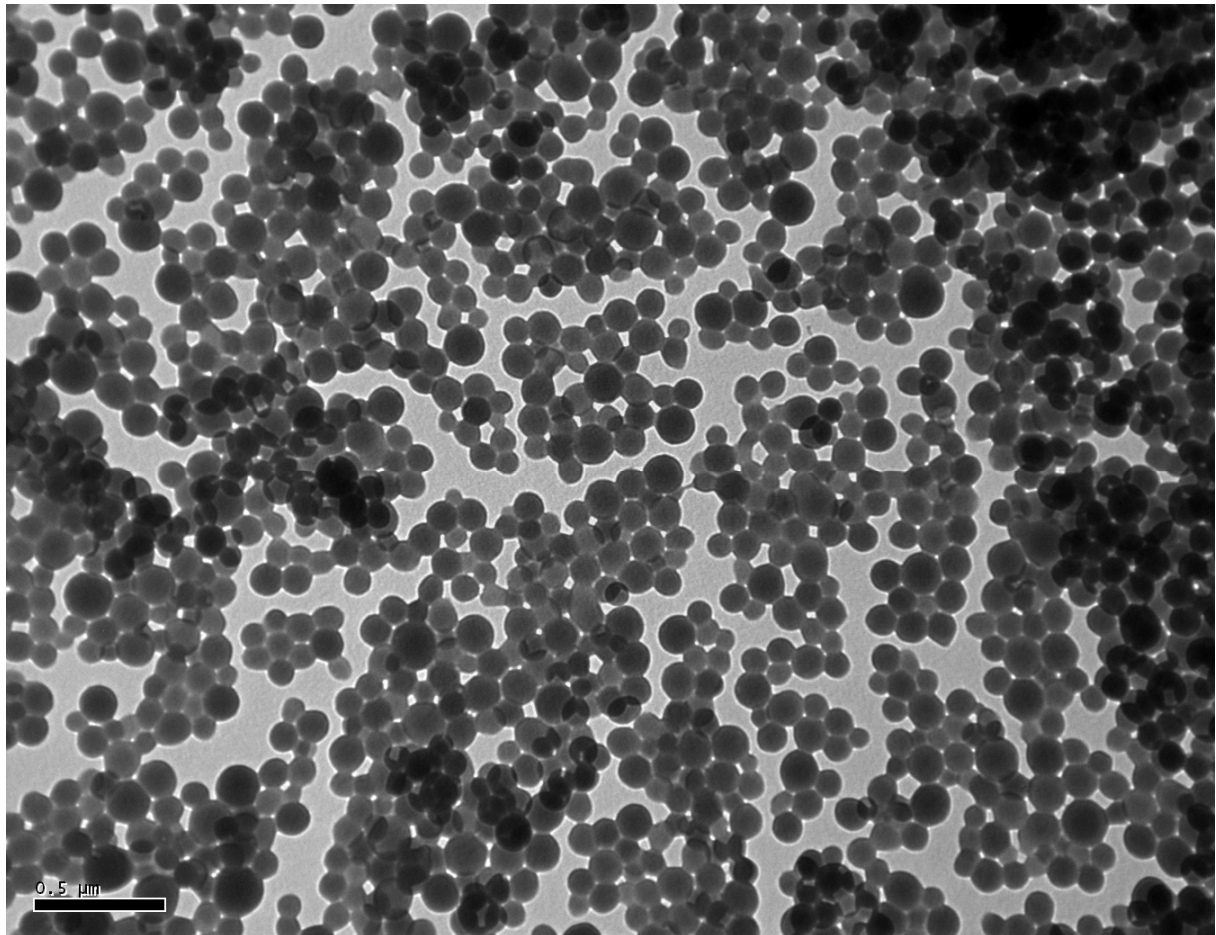


Abbildung 4 Elektronenmikroskopische Aufnahme (TEM) von Nanopartikeln aus HSA

## 2.4 Zytostatika-beladene Trägersysteme

In den folgenden Abschnitten wird speziell auf das in dieser Arbeit verwendete Zytostatikum Doxorubicin und seine Anwendung in Kombination mit Trägersystemen eingegangen.

### 2.4.1 Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Zytostatikum aus der Klasse der Anthracyclin-Antibiotika und besitzt ein planares Anthrachinon-Ringsystem als Grundgerüst (Abbildung 5). Weitere Anthracyclin-Antibiotika sind Epirubicin, Daunorubicin, Idarubicin und Carubicin. Doxorubicin wird durch aerobe Fermentation von Kulturen des Pilzes *Streptomyces peuceticus var. caesius* und anschließender Extraktion oder partialsynthetisch aus



Daunorubicin gewonnen. Eingesetzt wird Doxorubicin in Kombination mit anderen Zytostatika bei der Chemotherapie folgender solider Tumore oder Lymphome (Beck et al., 1982):

- Mammakarzinom
- Ovarialkarzinom
- Malignes Melanom
- Magenkarzinom
- Multiples Myelom
- Bronchialkarzinom
- Schilddrüsenkarzinom
- Morbus Hodgkin
- Non-Hodgkin-Lymphom
- Akute lymphatische Leukämie

Da die orale Bioverfügbarkeit nur sehr gering ist, wird Doxorubicin als kurze Infusion i.v. über 10 bis 15 min verabreicht. Dabei richtet sich die Dosierung nach Art der Erkrankung, sollte aber eine Gesamtdosis von  $550 \text{ mg/m}^2$  Körperoberfläche beim Erwachsenen nicht überschreiten. Nach i.v. Gabe verteilt sich das Zytostatikum sehr rasch im gesamten Körper (Verteilungsvolumen  $25 \text{ l/kg}$ ) mit Ausnahme des ZNS. Es besitzt eine Plasmaeiweißbindung von 80 bis 85% und wird überwiegend in der Leber zu dem aktiven Metaboliten Doxorubicinol und inaktiven Aglykonen, Glucuroniden und Sulfaten biotransformiert.

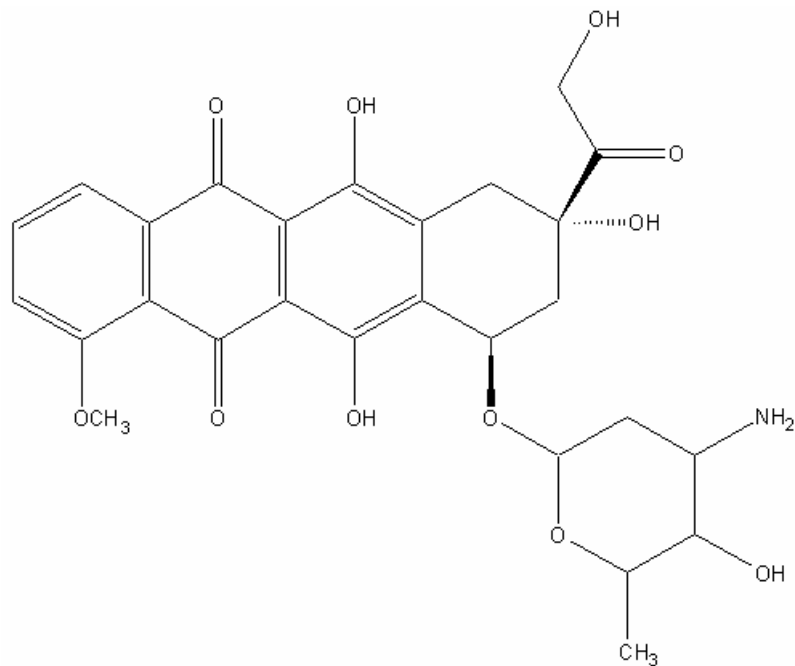


Abbildung 5 Chemische Struktur von Doxorubicin

#### 2.4.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Doxorubicin ist ein rotes Pulver mit einem Molekulargewicht (MW) von 543,5 Da und einem Schmelzpunkt bei 205°C. Eingesetzt wird es häufig als Hydrochlorid (MW = 580,0), welches bei der partialsynthetischen Herstellung als Endprodukt anfällt. Doxorubicin ist leicht löslich in Wasser und Ethanol. Beide Lösungen sind bei neutralem pH-Wert rot gefärbt, ändern aber die Farbe nach blauviolett bei pH-Werten über 9,0. Wässrige Lösungen sind bei Temperaturen unter 5°C unter Lichtausschluss bis zu einem Monat ohne Aktivitätsverlust lagerbar. Die Stabilität von Doxorubicin in wässrigen Lösungen ist stark vom pH-Wert abhängig. Die beste Stabilität haben Lösungen im Bereich von pH 3,0 bis 6,5, wohingegen im basischen Bereich zunehmend Zersetzung zu komplexen, zum Teil farbigen Verbindungen stattfindet (Henke, 2006). Eine ausgeprägte Photoinstabilität von Doxorubicin und ähnlichen Verbindungen wurde bereits 1990 von Wood et al. beschrieben (Wood et al., 1990).

#### 2.4.1.2 Wirkmechanismus und Nebenwirkungen

Die antineoplastische Wirkung von Doxorubicin kommt durch einen vielfältigen Wirkmechanismus zustande. Aufgrund des planaren Ringsystems kann das Zytostatikum in die DNA-Doppelhelix interkallieren und hemmt so die Topoisomerase II, ein Enzym das bei der Reproduktion und Transkription der DNA an der Überspiralisierung und Entfaltung beteiligt ist. Als Folge davon findet keine Transkription statt und somit auch keine Translation und Proteinsynthese. Die behandelten Zellen sterben ab. Neben der Interkalation in die DNA hat Doxorubicin noch weitere Wirkungsmechanismen. Eine Chelatisierung von Metallionen innerhalb der Zelle hemmt wichtige Stoffwechselfvorgänge und Doxorubicin bildet bei der intrazellulären Metabolisierung reaktive Radikale vom Typ der Semichinon-, Peroxid- und Hydroxid-Radikale, die zu DNA-Schäden führen und die Funktion der Zellmembran verändern. Letzterer Mechanismus ist auch für die am häufigsten auftretende Nebenwirkung von Doxorubicin verantwortlich, denn durch die freien Radikale kommt es zu einer Schädigung des Herzgewebes. Diese ausgeprägte Kardiotoxizität kann in den Sofort-Typ und den Spät-Typ unterschieden werden. Der Sofort-Typ tritt bereits 24 h nach Therapiebeginn auf und kann leicht durch Veränderungen im EKG erkannt werden. Beim Spät-Typ kommt es zu irreversiblen Schäden des Herzmyokards aufgrund kumulativer Anreicherung des Arzneistoffs im Organ. Diese Kardiotoxizität äußert sich in einer Linksherzinsuffizienz, die lange nach Beendigung der Behandlung auftreten kann. Neben den für Zytostatika üblichen Nebenwirkungen wie z.B. Übelkeit, Erbrechen und Alopezie sind Störungen des blutbildenden Systems, die sich als Thrombozytopenie und Leukozytopenie zeigen, am häufigsten. Eine Resistenzentwicklung durch Bildung aktiver Efflux-Transporter der Pgp-Familie in den Tumorzellen tritt häufig während der Chemotherapie bei Behandlung maligner Tumore auf.

## 2.4.2 Drug-Delivery-Systeme mit Doxorubicin

In der Vergangenheit wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, um den therapeutischen Nutzen und das Nebenwirkungsprofil von Doxorubicin zu verbessern sowie ein passives oder aktives Targeting in Tumorgewebe zu erreichen. Hierzu wurden zunächst Versuche zu unterschiedlichen Verabreichungsarten von Doxorubicin gemacht (Robert, 1987). Aussichtsreichere Methoden sind allerdings die Benutzung von Drug-Delivery-Systemen, wie lösliche Konjugate, Liposomen und Nanopartikel.

### 2.4.2.1 Lösliche Konjugate von Doxorubicin

Die Herstellung von löslichen Konjugaten von Doxorubicin durch kovalente Bindung von Proteinen oder Peptiden und synthetischen Polymeren ist eine Möglichkeit die pharmakokinetischen Eigenschaften des Zytostatikums zu verändern. So gelang es durch Einführung einer reaktiven Maleinimid-Gruppe über einen pH-sensitiven Hydrazon-Linker in das Doxorubicinmolekül verschiedene thiolierte Proteine oder Peptide kovalent mit dem Arzneistoff zu konjugieren (Kratz et al., 1997). Unter anderem wurden mit dieser Technik Transferrin und Albumin erfolgreich mit Doxorubicin kombiniert und in vitro getestet (Kratz et al., 1998a; Kratz et al., 1998b). Im Falle von Transferrin konnte ein antiproliferativer Effekt in LXFL-529-Lungenkarzinomzellen gezeigt werden. Gleiches war bei Albumin-Konjugaten in einer Brustkrebszelllinie (MDA-MB-468) zu erkennen. Zugleich zeigten diese Konjugate in neuesten Untersuchungen ein vorteilhaftes toxikologisches Profil mit einer deutlich reduzierten Kardiotoxizität (Kratz et al., 2007) und werden demnächst in die klinische Erprobung (Phase 2) gehen (Kratz, 2007).

In der klinischen Erprobung (Phase 2) befinden sich bereits lösliche Konjugate von Doxorubicin mit N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA) zur Behandlung von endokrinen Krebserkrankungen (Duncan, 2003). Diese Konjugate zeichnen sich durch eine verlängerte Zirkulationszeit und einen geringeren initialen Doxorubicin-Spiegel im

Herzgewebe aus (Seymour et al., 1990; Duncan et al., 2005). Durch die verlängerte Plasmahalbwertszeit kann ein passives Tumor-Targeting durch Ausnutzung des EPR-Effektes erreicht werden (Punkt 2.2.1).

#### 2.4.2.2 Liposomen mit Doxorubicin

Liposomen sind kugelförmige hohle Vesikel, deren Membran aus einem Bilayer von amphiphilen Molekülen besteht. Als Ausgangsmaterial werden meist Phospholipide eingesetzt deren hydrophile Teile zum Inneren und Äußeren des Liposoms zeigen. Arzneistoffe können entweder in der inneren, hydrophilen Phase oder in der hydrophoben Membran eingebunden werden.

Mit Doxorubicin beladene Liposomen sind bereits auf dem Markt erhältlich und werden zur Behandlung von Eierstockkrebs und Brustkrebs eingesetzt. Die Handelspräparate sind Doxil<sup>®</sup> der Firma Ortho Biotech aus Bridgewater, USA und Caelyx<sup>®</sup> der Firma Essex Pharma aus München, Deutschland. Bei beiden Präparaten handelt es sich um Stealth-Liposomen (Punkt 2.2.1), die eine verlängerte Plasmahalbwertszeit, ein günstigeres Nebenwirkungsprofil und eine Akkumulation im Tumorgewebe aufgrund des EPR-Effektes aufweisen (Rahman et al., 1986; Gabizon et al., 1994a; Gabizon et al., 1994b; Gabizon, 1994). Eine Überwindung der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Doxorubicin mittels pegylierter Liposomen scheint ein weiterer Vorteil dieses Systems zu sein (Rahman et al., 1992). Die Verwendung Doxorubicin-beladener Liposomen zur Behandlung von Gehirntumoren erscheint ebenfalls viel versprechend, befindet sich jedoch noch nicht in der klinischen Erprobung (Koukourakis et al., 2000; Hau et al., 2004).

#### 2.4.2.3 Nanopartikel mit Doxorubicin

Unter Punkt 2.3 wurde bereits näher auf Nanopartikel, deren Herstellung aus verschiedenen Ausgangsmaterialien und auf dem Markt befindliche

Handelspräparate eingegangen. Solche nanopartikulären Trägersysteme sind auch ein potentiell Drug-Delivery-System für Zytostatika wie Doxorubicin.

Doxorubicin wurde bereits an Nanopartikel aus unterschiedlichen Materialien, wie z.B. PBCA, PLGA, Poly(isohexylcyanoacrylat) (PIHCA), Poly(isobutylcyanoacrylat) (PIBCA) und Gelatine gebunden. Im Vergleich zu einer Lösung des Arzneistoffs zeigten die mit Doxorubicin-beladenen Nanopartikel verschiedene Vorteile. So war es möglich, mit PLGA-NP, bei denen das Polymer vor der Partikelbildung mit Doxorubicin konjugiert wurde, bioabbaubare Nanopartikel mit einer lang anhaltenden Wirkstofffreisetzung zu erhalten, die eine mit einer Lösung des Zytostatikums vergleichbare Zytotoxizität hatten (Yoo et al., 1999). Nanopartikel aus PIHCA oder PIBCA waren in der Lage die Resistenzen von Leberkarzinomzellen und P388-Tumorzellen zu überwinden. Hierbei konnte eine bis zu 4,5fache Reduktion der inhibitorischen Konzentration 50% ( $IC_{50}$ ) des Arzneistoffs in Kombination mit den Nanopartikeln erreicht werden (Soma et al., 1999; Barraud et al., 2005). Ebenfalls erfolgreich war die Einbindung von Doxorubicin in Gelatine-Nanopartikel (Leo et al., 1997). Hierbei wurde festgestellt, dass ein erheblicher Anteil des Arzneistoffs kovalent an das Trägersystem gebunden wurde und hierdurch die Nanopartikel selbst in Anwesenheit proteolytischer Enzyme eine ungenügende Freisetzung zeigten (Leo et al., 1999). Die aussichtsreichsten Ergebnisse liefert die Beladung von PBCA-NP mit Doxorubicin (Gulyaev et al., 1999). Durch die Wahl eines Überzuges aus Tween 80 war es möglich mit diesen Partikeln die BHS zu überwinden und eine Anreicherung im Gehirn von Versuchstieren zu erzielen (Punkt 2.2.2.1) (Steiniger et al., 2004; Ambruosi et al., 2006). Dabei war die erreichte Doxorubicin-Konzentration im Gehirn ausreichend hoch, um eine verlängerte Überlebenszeit und eine Remission von mehr als 20% im Tiermodell mit Glioblastom-tragenden Ratten zu erhalten.

Die Palette der Doxorubicin-tragenden Nanopartikel wurde in dieser Arbeit um Doxorubicin-beladene Nanopartikel aus HSA erweitert. Diese Partikel

wurden auf ihre antiproliferative Wirkung in der Zellkultur, durch Kombination mit dem Gehirn-Targeting-Liganden ApoE auf ihr Potential zur Behandlung von Gehirntumoren sowie auf ihre Toxizität im lebenden Tier getestet.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Herstellung von Albumin Nanopartikeln**

Die Herstellung von Nanopartikeln aus HSA erfolgte nach einer Desolvatationsmethode, die durch Weber et al. und Langer et al. bereits beschrieben wurde (Weber et al., 2000; Langer et al., 2003). Hierzu wurden 200 mg HSA in 2 ml ultrareinem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 0,01 M NaOH auf 8,2 eingestellt. Zu der so eingestellten 10%igen Protein-Lösung wurde unter Rühren auf einer Rührplatte (550 rpm) 8 ml Ethanol 96% (v/v) mit einer Schlauchpumpe (Ismatec IPN, Glattbrugg, Schweiz) gleichmäßig (1 ml/min) hinzugegeben. Die durch Zugabe des Desolvatationsmittels Ethanol entstandenen Nanopartikel wurden mit einer wässrigen 8%igen Glutaraldehyd-Lösung stabilisiert. Die Menge an zugesetztem Glutaraldehyd betrug 1,175 µl pro Milligramm HSA. Dies entspricht einer Quervernetzung von 200% bezogen auf die vorhandenen freien ε-Amino-Gruppen des Lysins im HSA-Molekül. Nach 24 h Quervernetzung bei Raumtemperatur wurden die Partikel zu je 2,0 ml aliquotiert und mehrmals durch wiederholtes Abzentrifugieren (16200 g, 12 min, Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und Redispergieren des Pellets in 2,0 ml ultrareinem Wasser im Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin, Berkin, Deutschland) aufgereinigt. Die erhaltenen gereinigten Nanopartikel wurden anschließend wieder vereinigt und deren Größe, Polydispersität, Zetapotential und Gehalt bestimmt (siehe Punkt 3.4.1).

#### **3.2 Oberflächenmodifikation von Albumin Nanopartikeln**

Auf der Oberfläche von Nanopartikeln aus HSA sind zahlreiche funktionelle Gruppen, wie Amino- und Carboxyl-Gruppen, vorhanden. Diese funktionellen Gruppen sind leicht für proteinchemische Reaktionen zugänglich. So ist es möglich durch einfache Methoden die Oberfläche der Nanopartikel zu modifizieren und geeignete Drug-Targeting-Liganden zu binden.



### 3.2.1 Thiolierung von Proteinen

Die Thiolierung von Proteinen ist ein gängiges Verfahren, um funktionelle Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) in ein Protein einzuführen. Mit diesen neu eingeführten Gruppen ist es anschließend möglich, Proteine durch geeignete Reaktionen zu markieren, zu verknüpfen oder zu immobilisieren. Besonders die Reaktion von SH-Gruppen mit Maleinimid-Strukturen ist eine gängiges Verfahren um Proteine kovalent zu binden. Ein hierfür standardmäßig eingesetztes Reagenz ist das 2-Iminothiolan, auch Traut's-Reagenz genannt. Es reagiert bevorzugt mit primären Aminen in einem pH-Bereich von 7,0 bis 9,0 (Traut et al., 1973).

#### 3.2.1.1 Thiolierung von Apolipoproteinen

Zur Thiolierung wurden 1000 µg ApoE3 (rekombinant Vogel, Weizmann Institut der Wissenschaften, Rehovoth, Israel) in 500 µl Phosphatpuffer pH 8,0 auf dem Vortex-Schüttler gelöst. Nach Zugabe einer einem 50-molaren Überschuss entsprechenden Menge Stammlösung von 2-Iminothiolan (1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 8,0 und Auffüllen auf 1,0 ml mit Phosphatpuffer wurde die Lösung über Nacht im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 21°C und 650 rpm inkubiert. Um das thiolierte Protein von dem niedermolekularen Thiolierungs-Reagenz zu trennen, wurde die Probe mit einer 10,0 ml D-Salt<sup>®</sup> Dextran-Größenausschluss säule (Pierce, Rockford, USA) aufgereinigt. Zunächst wurde die Säule mit Phosphatpuffer pH 8,0 gewaschen und mit einer 2%igen HSA-Lösung abgesättigt, um eine unspezifische Bindung des thiolierten Proteins an das Säulenmaterial zu verhindern. Anschließend wurden Aliquote der Probe von 1,0 ml auf die Säule gegeben und mit jeweils 1,0 ml Phosphatpuffer eluiert. Die erste Fraktion wurde verworfen, die weiteren Fraktionen 2 bis 8 jeweils in einem Eppendorfcap aufgefangen und der Proteingehalt photometrisch bei 280 nm bestimmt. Standardmäßig beinhalteten die Fraktionen 5 und 6 das thiolierte ApoE3. Diese Fraktionen wurden vereinigt und der ApoE3-Gehalt mittels

Gravimetrie bestimmt. Die Menge der eingeführten SH-Gruppen pro Mol ApoE3 wurde wie in 3.2.1.3 beschrieben, quantifiziert.

### 3.2.1.2 Thiolierung von NeutrAvidin

Die Thiolierung des NeutrAvidins (NAV) erfolgte analog der Thiolierung von ApoE3. Hierfür wurden 10 mg NAV in Phosphatpuffer pH 8,0 gelöst und mit einem 50-molaren Überschuss an 2-Iminothiolan-Stammlösung versetzt. Nach Inkubation über Nacht im Thermomixer wurde die Probe wie bereits unter Punkt 3.2.1.1 beschrieben mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt und der Gehalt des thiolierten NAV in den vereinigten Fraktionen bestimmt. Die Bestimmung der SH-Gruppen pro Mol NAV erfolgte analog Punkt 3.2.1.3.

### 3.2.1.3 Bestimmung der eingeführten SH-Gruppen

Um die bei der Reaktion des gelösten Proteins mit 2-Iminothiolan in das Molekül eingeführten SH-Gruppen quantitativ zu bestimmen, wurden 150,0 µl des thiolierten Proteins mit 1315,0 µl Phosphatpuffer pH 7,5 und 35,0 µl einer Stammlösung von 5,0 mg/ml Ellman's-Reagenz umgesetzt. Ellman's-Reagenz (5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)) reagiert spezifisch mit SH-Gruppen zu einem gemischten Disulfid und der bei 412 nm photometrisch detektierbaren 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (Ellman, 1959). Zur Konzentrationsbestimmung der SH-Gruppen wurde eine Kalibrierkurve mit L-Cystein-Standards von  $1,139 \times 10^{-6}$  bis  $1,139 \times 10^{-7}$  mol/ml L-Cystein erstellt. Die Standards wurden entsprechend der zu untersuchenden Probe verdünnt. Nach Inkubation der Lösungen für 15 min bei 25°C im Thermomixer erfolgte die photometrische Messung bei 412 nm und die Konzentration der SH-Gruppen in der Probe wurde berechnet. Die Menge an eingeführten SH-Gruppen pro Mol Protein konnte mithilfe der Gravimetrie (Punkt 3.5.2) rechnerisch ermittelt werden.

### 3.2.2 Aktivierung der Albumin Nanopartikel mit bifunktionalen Crosslinkern

Um Proteine kovalent an die Oberfläche von Protein-Partikeln zu binden, wurden die HSA-NP mit bifunktionalen Crosslinkern aktiviert. Diese Crosslinker besitzen eine N-Hydroxy-Succinimid-Struktur, die reaktiv für Amino-Gruppen auf der Partikeloberfläche ist und eine Maleinimid-Struktur, die im neutralen pH-Bereich 1000 mal langsamer mit Amino-Gruppen reagiert als mit SH-Gruppen.

#### 3.2.2.1 NHS-PEG-MAL Crosslinker

Folgende Crosslinker wurden zur Aktivierung der HSA-NP verwendet.

- NHS-PEG-MAL MW 3400 Da Nektar, Huntsville, USA
- NHS-PEG-MAL MW 5000 Da Nektar, Huntsville, USA

Bei beiden Crosslinkern sind die reaktiven Gruppen durch einen Spacer aus PEG voneinander getrennt. Dieser Spacer soll gewährleisten, dass das zu bindende Protein einen ausreichenden Abstand zur Partikeloberfläche hat und somit sterisch ungehindert an entsprechende Zielstrukturen binden kann. Zudem fördert die PEG-Kette die Hydrophilie des Trägersystems und verhindert dadurch eine unspezifische Anlagerung von Blutbestandteilen.

#### 3.2.2.2 Aktivierte HSA-NP

Es wurden 20 mg der HSA-NP-Suspension abzentrifugiert und in 1,0 ml Phosphatpuffer pH 8,0 redispergiert. Die Aktivierung der Nanopartikel erfolgte mit einem 10molaren Überschuss an Crosslinker. Hierfür wurden 10,74 mg NHS-PEG-MAL 3400, beziehungsweise 15,38 mg NHS-PEG-MAL 5000, in 1,0 ml Phosphatpuffer pH 8,0 gelöst, zu der Nanopartikeldispersion gegeben und mit dem Vortex-Schüttler gemischt. Die Aktivierung der HSA-NP erfolgte unter Schütteln bei 650 rpm, 20°C für

60 min im Thermomixer. Anschließend wurden die aktivierten HSA-NP durch zweimaliges Abzentrifugieren und Redispergieren in ultrareinem Wasser (1,0 ml) gewaschen und Größe und Gehalt bestimmt.

### 3.2.3 Konjugation des thiolierten Proteins mit den aktivierten HSA-NP

Die Konjugation der thiolierten Proteine mit den aktivierten Nanopartikeln erfolgte über Reaktion der noch freien Maleinimid-Struktur mit den in das Protein eingeführten SH-Gruppen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen von pH 8,0 ist die Reaktion der Maleinimid-Struktur mit SH-Gruppen um den Faktor 1000 schneller als die Reaktion mit anderen nukleophilen Gruppen wie z.B. Amino- und Hydroxy-Gruppen. Somit ist gesichert, dass nur das eingesetzte thiolierte Protein selektiv an die aktivierten Nanopartikel kovalent gebunden wird.

#### 3.2.3.1 Konjugation von thioliertem ApoE3 an aktivierte HSA-NP

Das thiolierte ApoE3 (500 µg) wurde mit den aktivierten Nanopartikeln (20 mg/ml) zu gleichen Volumenteilen gemischt und die Konjugation über Nacht bei Raumtemperatur und 650 rpm im Thermomixer durchgeführt. Um die Konjugation des thiolierten ApoE3 zu quantifizieren, wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Kontrollen angesetzt und ebenfalls inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben abzentrifugiert und die Überstände gesammelt. Die Quantifizierung des nicht gebundenen ApoE3 erfolgte durch Analyse der Überstände mittels Micro-BCA-Assay und Western-Blot (WB). Die fertigen ApoE3-PEG-NP wurden entweder in ultrareinem Wasser oder zur Loperamidbeladung in Ethanol 40,6% (v/v) auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und bezüglich ihrer Größe und Gehalt charakterisiert.

Tabelle 2 Proben der Konjugation von thiolierem ApoE3 mit aktivierten HSA-NP

	<i>Vollprobe</i>	<i>Adsorptions Vergleich</i>	<i>100% Wert</i>	<i>Hintergrund akt. HSA-NP</i>	<i>Hintergrund leere NP</i>
<i>akt. HSA- NP</i>	1,0 ml			1,0 ml	
<i>thioliertes ApoE3</i>	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml		
<i>Wasser</i>			1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
<i>leere NP</i>		1,0 ml			1,0 ml

### 3.2.3.2 Konjugation von thiolierem NAV an aktivierte HSA-NP

Die Konjugation von thiolierem NAV mit aktivierten Nanopartikeln erfolgte analog der Konjugation von thiolierem ApoE3 (3.2.3.1). Hierfür wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Proben angesetzt und über Nacht im Thermomixer inkubiert. Nach Aufreinigung der Proben wurden die anfallenden Überstände auf ihren Proteingehalt bei 280 nm photometrisch vermessen und die Bindungsrate des NAV bestimmt.

Tabelle 3 Proben der Konjugation von thiolierem NAV mit aktivierten HSA-NP

	<i>Vollprobe</i>	<i>Adsorptions Vergleich</i>	<i>100% Wert</i>	<i>Hintergrund akt. HSA-NP</i>	<i>Hintergrund leere NP</i>
<i>akt. HSA- NP</i>	1,0 ml			1,0 ml	
<i>thioliertes NAV</i>	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml		
<i>Wasser</i>			1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
<i>leere NP</i>		1,0 ml			1,0 ml

### 3.2.3.3 Indirekte Bestimmung des konjugierten Proteins

#### 3.2.3.3.1 Bestimmung mittels UV-VIS-Spektroskopie

Die Überstände der Proteinkonjugation werden bei 280 nm im Photometer vermessen und durch Subtraktion der Vergleichsproben und Verrechnung des 100%-Wertes die prozentuale Bindung des Proteins an die Partikeloberfläche berechnet.

#### 3.2.3.3.2 Bestimmung von ApoE3 mittels Micro-BCA-Assay

Der BCA-Assay ist eine colorimetrische Methode zur Detektion des Gesamtproteingehalts einer Lösung. Der Assay beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine in alkalischer Lösung und anschließender Chelatisierung der  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen mit Bicinchoniminsäure zu einem lilafarbenen Komplex, der bei 562 nm photometrisch detektiert werden kann (Smith et al., 1985). Eine Verbesserung des BCA-Assay ist der Micro-BCA-Assay mit einer niedrigeren Nachweisgrenze von 0,5 µg/ml Protein und daher geeigneter um die geringen Mengen an ungebundenem ApoE3 in den Überständen nachzuweisen. Hierfür wurden 500 µl der nach der Konjugation von ApoE3 mit den aktivierten Nanopartikeln anfallenden Überstände mit 500 µl Micro-BCA-Reagenz versetzt und für 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem Kühlblock auf Raumtemperatur abgekühlt um die Reaktion zu stoppen und letztendlich bei 562 nm im Photometer vermessen. Zur Bestimmung des Proteingehalts in den Überständen wurde eine Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich von 5,0 bis 100 µg/ml mit ApoE3 und HSA angelegt. Die Berechnung des ungebundenen ApoE3 erfolgte durch Einbeziehen der Vergleichslösungen sowie des 100%-Wertes.

#### 3.2.3.3.3 Bestimmung von ApoE3 mittels SDS-Page und Western-Blot

Eine weitere Methode zum Nachweis des ungebundenen Anteils an ApoE3 ist die elektrophoretische Auftrennung der im Überstand enthaltenen

Proteine nach ihrer Molekülmasse mittels SDS-Page (Laemmli, 1970) und Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Western-Blot) (Towbin et al., 1979). Unspezifische Bindungsstellen der Membran werden durch Waschen mit bovinem Serumalbumin (BSA) oder Milchpulver abgesättigt. Die transferierten Proteine können anschließend durch Inkubation mit einem Erst- und Zweit-Antikörper detektiert werden. Hierbei erfolgt die Detektion über den Zweit-Antikörper. Dieser Antikörper ist gekoppelt an die „Horseradish Peroxidase“ (HRP), einer Peroxidase aus dem Meerrettich. Die Peroxidase setzt das zugegebene Substrat Luminol unter Abspaltung von Stickstoff und Emission von Licht in seine oxidierte Form um (Abbildung 6) (Whitehead et al., 1979). Bei dieser Art von Reaktion spricht man auch von Chemilumineszenz. Die Lumineszenz kann durch Zusatz von Phenol noch um den Faktor 1000 gesteigert werden (Enhanced Chemilumineszenz = ECL). Die maximale Lichtemission liegt bei einer Wellenlänge von 428 nm und kann durch kurzes Belichten eines Films detektiert werden. Es entstehen die für einen Western-Blot charakteristischen Banden. Dieses Verfahren wurde für die ApoE3-haltigen Überstände am Institut für Medizinische Virologie von der Arbeitsgruppe PD Dr. Michaelis durchgeführt. Hierfür wurden die Überstände auf eine theoretische maximale Konzentration von 20 µg/ml eingestellt. Als Vergleich dienten Lösungen des ApoE3 (20 µg/ml). Nach elektrophoretischer Trennung, Blotten und Detektion mit Antikörper konnte die Bandenintensität der ApoE3-Überstände mit der Kontrolle verglichen und unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Micro-BCA-Assay das an die Nanopartikel gebundene ApoE3 quantifiziert werden.

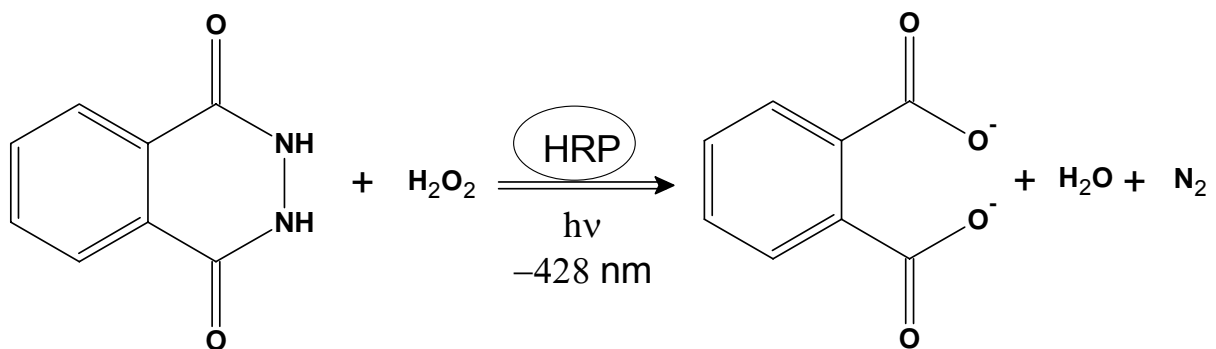


Abbildung 6 Western-Blot Detektion durch „Enhanced Chemilumineszenz“ Reaktion

### 3.2.3.4 Bindung von Proteinen über das NeutrAvidin-Biotin-System

Die Bindung von biotinylierten Liganden an NAV-modifizierte Trägersysteme und Oberflächen ist eine oft in der Molekularbiologie verwendete Technik. Ein NAV-Molekül ist dabei in der Lage bis zu 4 Moleküle eines mit Biotin modifizierten Liganden in einem sehr stabilen Biotin-NAV-Komplex zu binden. Diese Technik wurde hier eingesetzt um den Liganden ApoE3 an die Oberfläche der HSA-NP zu binden.

### 3.2.3.5 Biotinylierung von ApoE3

Zur Biotinylierung von ApoE3 wurden 1000,0 µg des Proteins in Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst und mit einem 20-fach molaren Überschuss von PFP-Biotin (5,0 mg/ml in DMSO) versetzt. Nach Auffüllen des Reaktionsgemisches auf 1,0 ml wurde für 2 h bei 10°C mit dem Thermomixer geschüttelt (650 rpm). Um das biotinylierte Protein von dem überschüssigen Reagenz abzutrennen, wurde wie in 3.2.1.1 beschrieben eine 10,0 ml D-Salt<sup>®</sup> Dextran-Größenausschlusssäule (Pierce, Rockford, USA) und ultrareines Wasser als Eluent verwendet. Die Vermessung der erhaltenen Fraktionen bei 280 nm ergab, dass das gesamte biotinylierte ApoE3 in den Fraktionen 5 und 6 vorhanden war. Diese Fraktionen wurden vereinigt und für die Konjugation an die NAV-PEG-NP aufbewahrt.

### 3.2.3.6 Konjugation von biotinyliertem ApoE3 an NAV-PEG-NP

Zur Kopplung des biotinylierten ApoE3 an die NAV-PEG-NP wurden 500 µg biotinyliertes ApoE3 und 20 mg NAV-PEG-NP in 2,0 ml ultrareinem Wasser suspendiert und über Nacht im Thermomixer bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Bindung des ApoE3 an das Trägersystem zu quantifizieren, wurde am nächsten Tag abzentrifugiert (16200 g, 20 min) und der ApoE3-Gehalt im Überstand durch Western-Blot und Micro-BCA-Assay bestimmt. Bei Herstellung der ApoE3-NAV-NP für Tierversuche wurden die NAV-PEG-NP zunächst mit Loperamid beladen



(Punkt 3.3.1) und erst anschließend die Konjugation mit dem biotinylierten ApoE3 durchgeführt. Auf eine Aufreinigung nach erfolgter Konjugation wurde im Fall der Verwendung der ApoE3-NAV-NP im Tierversuch verzichtet, da keine störenden Puffersalze in der Lösung vorhanden waren und um Verlusten an ApoE3 vorzubeugen.

#### 3.2.4 Pegylierung der Oberfläche von HSA-NP

Zur Pegylierung der Oberfläche der HSA-NP wurde das Reagenz mPEG-SPA-5000 der Firma Nektar, Huntsville, USA eingesetzt. Das Reagenz weist eine für Amino-Gruppen reaktive N-Hydroxy-Succinimid-Ester-(NHS-Ester)-Struktur auf und hat ein mittleres Molekulargewicht von 5000 Da. Die Umsetzung der HSA-NP mit dem Reagenz erfolgte in Phosphatpuffer pH 8,0 mit einem 50molaren Überschuss an Pegylierungs-Reagenz. Für 20 mg HSA-NP wurden 76,9 mg mPEG-SPA in 1,0 ml Puffer gelöst und zu der Nanopartikeldispersion gegeben. Die Umsetzung erfolgte für 60 min unter den gleichen Bedingungen wie in Punkt 3.2.2.2 beschrieben. Nach der Reaktionszeit wurden die pegylierten Partikel durch wiederholtes Zentrifugieren und Redispergieren in ultrareinem Wasser (1,0 ml) aufgereinigt.

#### 3.2.5 Überzug der Nanopartikel mit Tween 80

Um Nanopartikel mit einem Überzug von Tween 80 zu erhalten, wurde eine Stammlösung von 10% (m/v) Tween 80 hergestellt. Hierbei wurden 20 mg Nanopartikel in 200 µl Tween 80 Stammlösung und 1800 µl ultrareinem Wasser resuspendiert und für 2 h unter Schütteln inkubiert (650 rpm, 21°C). Das gleiche Verfahren wurde auch zum Überziehen von arzneistoffbeladenen Nanopartikeln verwendet. Bei Verwendung von Tween 80 überzogenen Zubereitungen für Tierversuche wurde die Inkubation der Partikel mit Tween 80 erst kurz vor Versuchsbeginn durchgeführt.

### **3.3 Loperamid-beladene Albumin Nanopartikel**

#### 3.3.1 Loperamid

Der Arzneistoff Loperamid gehört zur Klasse der Opiode, besitzt aber wegen seiner geringen Gehirngängigkeit keinen zentral-analgetischen Effekt und wird daher als Antidiarrhoikum in der Arzneimitteltherapie eingesetzt. Das hier verwendete Loperamidhydrochlorid hat eine Molekülmasse von 513,5 Da und ist schlecht löslich in Wasser, dagegen aber sehr gut löslich in Ethanol.

#### 3.3.2 HPLC-Analytik von Loperamid

Zur Gehaltsbestimmung von Loperamid wurde ein D7000 HPLC-System der Firma Hitachi Ltd. (Tokio, Japan) verwendet. Die Trennung erfolgte über eine Luna-C18(2)-Säule mit einer Porenweite von 5 µm. Eingesetzt wurde eine isokratische mobile Phase bestehend aus 20 mM Natriumdihydrogenphosphat und Acetonitril im Verhältnis 60% : 40% und einem pH-Wert von 4,0 bis 5,0 (Chen et al., 2000). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min und Loperamid wurde bei einer Wellenlänge von 195 nm spektrometrisch detektiert. Loperamid hat unter den gewählten Bedingungen eine Retentionszeit von 18 Minuten. Die Konzentrationsbestimmung wurde durch Integration der Peakflächen und Vergleich mit externen Standards durchgeführt.

#### 3.3.3 Beladung der HSA-NP mit Loperamid

Zunächst wurde eine Stammlösung von 10,0 mg/ml Loperamidhydrochlorid in einer Mischung aus Ethanol : Wasser 0,7 zu 1 (40,6% v/v) hergestellt. Anschließend wurden 20 mg HSA-NP mit 7,0; 6,6 und 3,3 mg Loperamid (entspricht 700 µl, 660 µl und 330 µl der Stammlösung) versetzt und auf 2,0 ml mit Ethanol 40,6% (v/v) aufgefüllt. Zur Adsorption des Arzneistoffs wurde die gesamte Mischung für 2 h bei Raumtemperatur und 650 rpm inkubiert, abzentrifugiert und die

Überstände zur Beladungsbestimmung gesammelt. Bei der Herstellung von ApoE3-PEG-NP mit kovalent gebundenem ApoE3 wurde das fertige ApoE3-modifizierte Trägersystem mit Loperamid beladen, der ungebunden Anteil Loperamid mittels HPLC bestimmt und die beladenen Nanopartikel in 2,0 ml ultrareinem Wasser resuspendiert. Zur Beladung von ApoE3-NAV-NP erfolgte die Inkubation mit Arzneistoff nach der Konjugation mit NAV. Nach Aufreinigung und Vereinigung wurden die NAV-PEG-NP mit biotinyliertem ApoE3 zum fertigen Trägersystem umgesetzt.

#### 3.3.4 Beladungsbestimmung

Zur Beladungsbestimmung der Nanopartikel wurden die nach der Inkubation erhaltenen Überstände 1 : 100 verdünnt und in die HPLC eingespritzt. Mithilfe von externen Standards von 1,25 bis 50,0 µg/ml Loperamid wurde die Konzentration des nicht gebunden Loperamids bestimmt und somit der an die Nanopartikel adsorptiv gebundene Anteil berechnet.

#### 3.3.5 Desorption von Loperamid

Um die Stabilität der adsorptiven Beladung von Loperamid an die HSA-NP in unterschiedlichen Medien zu untersuchen wurden Nanopartikel mit 7,0; 6,6 und 3,3 mg Loperamid pro 20 mg HSA-NP hergestellt und die Beladung durch HPLC-Analyse bestimmt. Jeweils 1,0 mg der hergestellten Loperamid-NP (10 mg/ml) wurden mit unterschiedlichen Medien auf 1,0 ml aufgefüllt (Tabelle 4) und für jeweils 15 min und 120 min bei Raumtemperatur im Thermomixer (650 rpm) geschüttelt. Anschließend wurden die Nanopartikel bei 16200 g für 15 min abzentrifugiert und im Überstand die Menge des desorbierten Loperamidanteils mittels HPLC analysiert. Berechnet wurde der desorbierte Anteil des Arzneistoffs in Bezug auf die absolute Beladung der Nanopartikel.

Tabelle 4 Desorptionsmedien der Loperamid-beladenen Nanopartikel

	<i>NP</i>	<i>Wasser</i>	<i>ICR/CD1 Serum</i>	<i>Tween 80 10% (m/V)</i>
NP in Wasser	100 µl	900 µl		
NP in 10% Serum	100 µl	800 µl	100 µl	
NP in 90% Serum	100 µl		900 µl	
NP in Tween 80 1%	100 µl	800 µl		100 µl

### 3.4 Doxorubicin-beladene Nanopartikel

#### 3.4.1 Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Zytostatikum aus der Reihe der Anthracyclin-Antibiotika. Es wird aus Kulturen des Pilzes *Streptomyces peuceticus var. caesius* gewonnen. Das Molekulargewicht des hier eingesetzten Doxorubicinhydrochlorids (Sicor, Milan, Italien) beträgt 580,0 Da. Es ist ein feines, rotes Pulver mit einer sehr guten Löslichkeit in Wasser und Ethanol und ist praktisch unlöslich in Aceton, Benzol und Ether (Beck et al., 1982). Doxorubicinhydrochlorid ist als kristalline Substanz sehr stabil. Wässrige Lösungen sind unter Lichtausschluss bei Temperaturen unter 5°C bis zu einem Monat ohne Aktivitätsverlust lagerbar. Bei einem pH-Wert oberhalb von 9,0 ändert sich die Farbe von orangerot nach blauviolett und es tritt zunehmende Zersetzung ein (Henke, 2006).

Weitere Eigenschaften von Doxorubicin sowie der Wirkungsmechanismus, Nebenwirkungen und therapeutische Verwendung wurden bereits unter Punkt 2.4.1 näher erläutert.

### 3.4.2 HPLC-Analytik von Doxorubicin

Für die quantitative Analytik des Doxorubicinhydrochlorids wurde ein D7000 HPLC-System der Firma Hitachi Ltd. (Tokio, Japan) ausgerüstet mit einem UV-VIS-Detektor und einem Fluoreszenz-Detektor verwendet. Die Trennung der Substanz von den übrigen Probenbestandteilen erfolgte über eine C18-Reverse-Phase-Säule vom Typ LiChroCart<sup>®</sup> 250-4 LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). Hierbei wurde eine isokratische mobile Phase aus Wasser und Acetonitril (70% : 30%) mit einem Anteil von 0,1% Trifluoressigsäure verwendet (Configliacchi et al., 1996). Die Flussrate betrug 0,8 ml/min. Die Absorption bei 250 nm sowie die Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 560 nm, Emissionswellenlänge 650 nm) wurden über einen Zeitraum von 20 min aufgenommen. Unter diesen Bedingungen betrug die Retentionszeit für Doxorubicinhydrochlorid 12 min und die Fläche der erhaltenen Peaks wurde mittels der HPLC-Software (HPLC System Manager, Hitachi Ltd., Tokio, Japan) errechnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe externer Standards (6,75 bis 100,0 µg/ml). Hierbei lieferten die Daten des UV-VIS-Detektors und des Fluoreszenz-Detektors die gleichen Ergebnisse. Die Nachweisgrenze von Doxorubicin unter den gewählten Bedingungen lag bei 0,5 µg/ml für den UV-VIS-Detektor und 0,05 µg/ml für den Fluoreszenz-Detektor.

### 3.4.3 Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA

Die Anlagerung von niedermolekularen Stoffen aus einer Lösung an einen höhermolekularen Stoff bezeichnet man als Adsorption. Das Adsorptionsgleichgewicht ist ein dynamisches Gleichgewicht, dessen Lage durch Faktoren wie Temperatur und Konzentration bestimmt wird. Adsorptionsisothermen beschreiben den Verlauf dieses Gleichgewichts in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffkonzentration. Um eine möglichst hohe Beladung der Nanopartikel zu erreichen, wurde die Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an gelöstes HSA bestimmt.

### 3.4.3.1 Vorversuche

In Vorversuchen musste eine geeignete Methode gefunden werden, um gelöstes Doxorubicin von gelöstem HSA abzutrennen. Hierfür wurde ein Amicon-Ultrafree-MC Zentrifugenfilter mit einer Biomax<sup>®</sup>30-Membran (Bredford, USA) und einer Porengröße von 30000 Da verwendet. Zunächst musste sichergestellt werden, dass keine unspezifische Adsorption des Arzneistoffs an die Filtermembran stattfindet. Um dies zu gewährleisten, wurden Doxorubicin-Lösungen mit Konzentrationen von 0,5 – 4,0 mg/ml filtriert und die Arzneistoffkonzentration im Ultrafiltrat bestimmt. Des Weiteren wurde sichergestellt, dass das gelöste HSA vollständig von dem Filter zurückgehalten wird, indem eine Lösung von 20 mg/ml HSA filtriert wurde. Die Bestimmung des Proteins im Ultrafiltrat erfolgte mittels BCA-Assay (Pierce, Rockford; USA) (Smith, 1995).

### 3.4.3.2 Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA

Zur Bestimmung der Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA wurden unterschiedliche Mengen von Doxorubicin (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0 mg/ml) eingesetzt und in einer Lösung von 20 mg/ml HSA für zwei Stunden im Thermomixer (650 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben durch einen Amicon-Ultrafree-MC Filter zentrifugiert und die Konzentration des Doxorubicin im Ultrafiltrat durch HPLC-Analytik bestimmt. Anschließend wurden die Gleichgewichtskonzentration und die adsorbierte Arzneistoffmenge pro HSA ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) berechnet und die resultierenden Werte an unterschiedliche Adsorptionsmodelle angepasst.

### 3.4.4 Doxorubicin-Beladung von HSA-NP

Es bestehen unterschiedliche Möglichkeiten Nanopartikel mit einem Arzneistoff zu beladen. Um den Arzneistoff möglichst unverändert an das

Trägersystem zu binden, wurden zwei Strategien der Arzneistoffbeladung verfolgt:

1. Adsorption an die Oberfläche der Nanopartikel
2. Einbindung des Arzneistoffs in die Partikelmatrix

#### 3.4.4.1 Adsorption von Doxorubicin an leere HSA-NP

Für die Beladung wurde eine Stammlösung von 5,0 mg/ml Doxorubicinhydrochlorid hergestellt. Hiervon wurden unterschiedliche Mengen von 50 bis 800  $\mu$ l (entspricht 250 bis 4000  $\mu$ g Doxorubicinhydrochlorid) abgenommen und zu 20 mg leerer HSA-NP hinzugegeben. Das Volumen wurde mit ultrareinem Wasser auf 4,0 ml aufgefüllt und das Gemisch für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln (650 rpm) inkubiert, um ein Adsorptionsgleichgewicht des Doxorubicins an der Partikeloberfläche zu erreichen. Anschließend wurden die Nanopartikel abzentrifugiert, redispergiert (analog Punkt 3.1), die Überstände gesammelt und das freie Doxorubicin mittels HPLC bestimmt.

#### 3.4.4.2 Einbindung von Doxorubicin in HSA-NP

In Bezug auf die Adsorptionsversuche von Doxorubicin an HSA und die daraus resultierende Adsorptionsisotherme wurden Mengen von 0,5 bis 4,0 mg Doxorubicin und 20 mg HSA in einem Milliliter ultrareinem Wasser gelöst. Um zu gewährleisten, dass sich ein Gleichgewicht der Adsorption des Arzneistoffs an das Protein eingestellt hat, wurde wiederum für zwei Stunden unter Rühren inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Ethanol 96% (v/v) über eine Peristaltikpumpe (LKB, Bromma, Schweden) mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min bei einer Rührgeschwindigkeit von 550 rpm bildeten sich Nanopartikel aus. Dieser Desolvationsschritt wurde bei zwei unterschiedlichen pH-Werten, nämlich 6,5 und 8,2 durchgeführt. Zur Stabilisierung der Nanopartikel wurde eine 8%ige wässrige Glutaraldehyd-Lösung zu den Partikeln hinzugegeben und für

24 h unter Rühren quervernetzt. Um Partikel mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad zu erhalten und den Einfluss des Vernetzungsgrades auf die Einbindung von Doxorubicin in die Partikelmatrix zu untersuchen wurden Mengen von 0,294 bis 1,175 µl Glutaraldehyd 8% pro Milligramm HSA verwendet. Dies entspricht einem Quervernetzungsgrad von 50 bis 200% bezogen auf die vorhandenen freien ε-Amino-Gruppen des Lysins im HSA-Molekül. Anschließend wurden die mit Doxorubicin beladenen HSA-NP wie in Punkt 3.1 beschrieben durch wiederholtes Abzentrifugieren und Redispergieren aufgereinigt. Die dabei erhaltenen Überstände wurden vereinigt, anschließend der ungebundene Anteil Doxorubicin mittels HPLC bestimmt und die Beladung der Nanopartikel mit Zytostatikum berechnet. Die Partikel wurden in Bezug auf Größe, Polydispersität und Zetapotential charakterisiert.

### 3.4.5 Freisetzung von Doxorubicin aus Nanopartikeln

Um zu untersuchen in welchem Maße das eingebundene Doxorubicin aus den Partikeln wieder freigesetzt wird, wurden Nanopartikel mit 1,0 mg Doxorubicin pro 20,0 mg HSA hergestellt und mit 0,588 µl Glutaraldehyd 8% pro mg HSA stabilisiert (Quervernetzung 100%). Die erhaltenen Dxr-NP wurden aufgereinigt, die anfallenden Überstände in der HPLC vermessen und der Partikelgehalt mittels Gravimetrie bestimmt. Anschließend wurden Aliquote von 2,0 mg Dxr-NP entnommen und in 1,0 ml NaCl 0,9% Lösung redispergiert. Die Suspensionen wurden im Thermomixer (650 rpm, 37°C) geschüttelt, je 3 Vials nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240 min und 24 h abzentrifugiert und in den Überständen das freigesetzte Doxorubicin quantitativ bestimmt.

### 3.4.6 Langzeitstabilität von Doxorubicin-inkorporierten HSA-NP

Wässrige Dispersionen von Nanopartikeln mit inkorporiertem Doxorubicin wurden für bis zu 1,5 Jahren im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zu definierten Lagerzeiten von 1 Tag, 1 Woche, 3 Wochen, 6 Monaten, 1 Jahr



und 1,5 Jahren wurden die Proben auf Raumtemperatur gebracht und die Nanopartikel für eine Minute mit dem Vortex-Schüttler redispergiert. Als Stabilitätsparameter wurden die Partikelgröße und die Polydispersität bestimmt.

#### 3.4.7 Oberflächenmodifikation von Doxorubicin-beladenen HSA-NP

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden verschiedene oberflächenmodifizierte Dxr-NP hergestellt und getestet.

Zum Erhalt von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln mit inkorporativ gebundenem Doxorubicin wurden zuerst die entsprechenden Partikel hergestellt (Punkt 3.4.4.2) und anschließend die Oberflächenmodifikation analog Punkt 3.2 durchgeführt.

Zum Erhalt von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln mit adsorptiv gebundenem Doxorubicin wurden zunächst leere HSA-NP gemäß Punkt 3.1 hergestellt und diese nach Punkt 3.2 oberflächenmodifiziert. Anschließend erfolgte die adsorptive Bindung des Doxorubicin wie in Punkt 3.4.4.1 beschrieben.

### 3.5 Charakterisierung der Nanopartikel

#### 3.5.1 Partikelgröße und Zetapotential

Zur Partikelgrößenbestimmung von Nanopartikeln wird routinemäßig die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt, eingesetzt. Hierbei wird der hydrodynamische Durchmesser der Teilchen in einer Lösung anhand der Brownschen Molekularbewegung bestimmt. Um eine freie Bewegung der Nanopartikel zu gewährleisten, wurden die zu untersuchenden Proben 1 : 400 mit durch einen 0,22 µm Membranfilter filtriertem, demineralisiertem Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte mit einem Malvern Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Großbritannien) bei 25°C in geeigneten Einmalküvetten. Die Wellenlänge des im Gerät befindlichen

Helium-Neon-Lasers betrug 633 nm und die Lichtstreuungsintensität wurde in einem festen Winkel von 90° über einen Photomultiplier gemessen. Die Analyse der Streulichtintensitäten zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte mit der vom Gerätehersteller gelieferten Software. Daraus resultierte unter Annahme einer monomodalen Größenverteilung die Partikelgröße und Polydispersität der untersuchten Proben.

Dasselbe Messgerät, modifiziert mit einer Dip-Cell, wurde für die Messung des Zetapotentials verwendet. Das Zetapotential ist das elektrische Potential zwischen Scherebene eines bewegten, suspendierten Teilchens und Neutralbereich der das Teilchen umgebenden Lösung und ist ein Maß für die Oberflächenladung der Nanopartikel. Da das Zetapotential abhängig vom pH-Wert ist, wurden alle Messungen in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. Die Proben wurden 1 : 200 mit dem Puffer verdünnt und die Bewegung der Nanopartikel im elektrischen Feld mittels Laser-Doppler-Mikroelektrophorese bestimmt. Die Kalkulation des Zetapotentials erfolgte durch die Gerätesoftware.

### 3.5.2 Gehaltsbestimmung (Gravimetrie)

Um den Gehalt von Nanopartikeln in wässrigen Lösungen zu bestimmen wurden 50,0 µl der zu untersuchenden Probe in ein zuvor tariertes Wägeschiffchen (Lüdi AG, Flawil, Schweiz) überführt und für 90 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet. Nach vollständigem Verdampfen des Wassers wurde die Probe entnommen und erneut auf der Mikrowaage (Supermicro S4, Sartorius, Göttingen, Deutschland) ausgewogen. Aus der Differenz der Massen des leeren Wägeschiffchens und dessen Gewicht nach der Trocknung ergab sich der Gehalt der Nanopartikel (mg/ml). Bei Suspensionen der Partikel in Puffermedien wurden zusätzlich Wägeschiffchen mit reinem Puffer mit einbezogen, um das Gewicht der Puffersalze zu bestimmen. Diese wurden anschließend vom Gewicht der Nanopartikelprobe abgezogen.

### **3.6 Herstellung von Apolipoprotein- und Loperamid-Lösungen**

#### **3.6.1 Herstellung einer ApoE3-Lösung**

Zur Herstellung einer ApoE3-Lösung wurden 800 µg lyophilisiertes ApoE3 in 4,0 ml ultrareinem Wasser auf einem Vortex-Schüttler gelöst. Die resultierende Lösung hatte eine Konzentration von 200 µg/ml ApoE3. Bei Verwendung der Lösung für Tierversuche wurde das Protein in sterilem Wasser für Injektionszwecke gelöst.

#### **3.6.2 Herstellung einer Loperamid-Lösung**

Zur Herstellung einer Loperamid-Stammlösung wurden 2,8 mg Loperamid in 280 µl Ethanol 40,6% (v/v) gelöst. Zu dieser Stammlösung wurden 3,72 ml ultrareines Wasser hinzugegeben. Die resultierende Lösung hatte eine Konzentration von 0,7 mg/ml Loperamid und 2,6% (v/v) Ethanol. Bei Verwendung der Lösung für Tierversuche wurde steriles Wasser für Injektionszwecke verwendet.

#### **3.6.3 Herstellung einer ApoE3-Loperamid-Lösung**

Zur Herstellung einer ApoE3-Loperamid-Lösung wurden 800 µg lyophilisiertes ApoE3 in 3,72 ml ultrareinem Wasser auf einem Vortex-Schüttler gelöst. Anschließend wurden 280 µl einer Loperamid-Stammlösung (10 mg/ml) in Ethanol 40,6% (v/v) hinzugegeben. Die resultierende Lösung hatte eine Konzentration von 200 µg/ml ApoE3, 0,7 mg/ml Loperamid und 2,6% (v/v) Ethanol. Bei Verwendung der Lösung für Tierversuche wurde steriles Wasser für Injektionszwecke eingesetzt.

### **3.7 In-vitro-Testung (Zellkultur)**

Nach der Herstellung und Charakterisierung von Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln (Punkt 3.3.1) blieb zu beweisen, dass der adsorbierte bzw.

inkorporierte Arzneistoff durch die Kombination mit Nanopartikeln nicht an antineoplastischer Wirksamkeit verliert. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Dxr-NP in der Zellkultur auf ihre antiproliferative Wirkung hin getestet. Die Versuche wurden am Institut für Medizinische Virologie der Universitätsklinik Frankfurt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Michaelis durchgeführt.

### 3.7.1 Eingesetzte Zelllinien

Die Doxorubicin-beladenen Nanopartikelzubereitungen wurden in zwei verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien getestet. Die UKF-NB3-Zelllinie wurde aus Metastasen von Patienten mit rezidivierendem Evans stage 4 Neuroblastom gewonnen (Cinatl et al., 1992). Die IMR-32-Zelllinie ist kommerziell bei ATCC (Manassass, VA, USA) erhältlich. Beide Zelllinien wurden in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FBS), 100 IU/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin bei 37°C kultiviert.

### 3.7.2 Zell-Viabilitäts-Assay (MTT-Test)

Um den Einfluss der Doxorubicin-beladenen Nanopartikel auf die Zellviabilität der Neuroblastom-Zellen zu untersuchen, wurden der 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Farbreduktions-Assay verwendet (Mosmann, 1983; Michaelis et al., 2004). Bei diesem Assay wird das gelbe MTT in den Mitochondrien von lebenden Zellen in das violette Formazan umgewandelt (Abbildung 7). Je stärker die violette Färbung ist, desto weniger Einfluss hat demzufolge die untersuchte Substanz auf die Viabilität der Zellen.

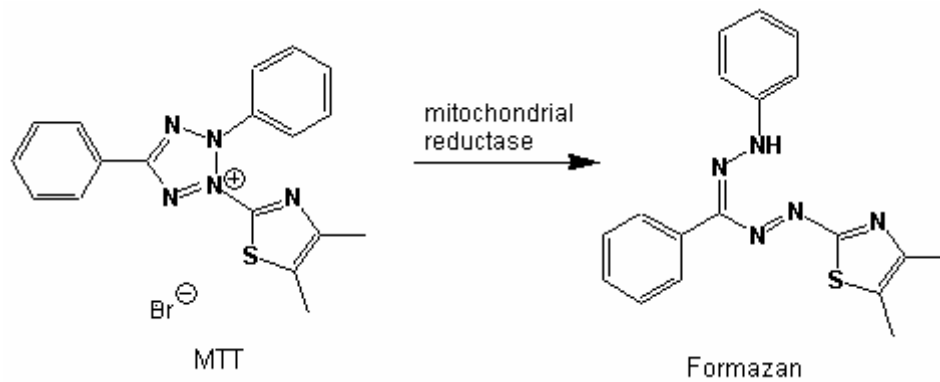


Abbildung 7 Reduktion von gelbem MTT in das violette Formazan durch mitochondriale Reduktasen, Abbildung aus <http://content.answers.com/main/content/wp/en/0/04/Mttscheme.png>

Hierfür wurden die Zellen in 96-Well Platten ausgesät und mit den entsprechenden Doxorubicinzubereitungen inkubiert. Die Konzentration betrug 0,75 bis 100 ng/ml berechnet auf den Doxorubicingehalt. Nach 5 Tagen Inkubation wurde zunächst 25 µl MTT-Reagenz je Well für 4 h und danach 100 µl SDS-Lösung (20% SDS in DMF/H<sub>2</sub>O 1:1) für 20 h hinzugegeben. Die auftretende violette Färbung wurde bei 560 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm mit einem Multiwell-Scanning-Spectrometer (GENios, Firma Tecan, Crailsheim, Deutschland) vermessen. Die Zellviabilität wurde über die Intensität der violetten Färbung bestimmt, da diese in direkter Korrelation mit der Menge an lebenden Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Zell-Kontrolle steht. Aus den erhaltenen Werten wurde die Konzentration an Doxorubicin berechnet, bei der die Zellviabilität auf 50% sinkt (inhibitorische Konzentration 50% = IC<sub>50</sub>).

### 3.7.3 Testung Doxorubicin-beladener HSA-NP

Folgende Zubereitungen wurden in der Zellkultur an UKF-NB3- und IMR-32-Zellen getestet.

Tabelle 5 In der Zellkultur getestete Doxorubicin Zubereitungen

	<i>Zubereitung</i>	<i>Dxr-Gehalt</i>	<i>Beladung</i>	<i>Quervernetzung</i>
1	Dxr-NP	17,1 µg/mg NP	eingebunden	50%
2	Dxr-NP	19,5 µg/mg NP	eingebunden	75%
3	Dxr-NP	21,4 µg/mg NP	eingebunden	100%
4	Dxr-NP	24,3 µg/mg NP	eingebunden	200%
5	Dxr-NP	33,5 µg/mg NP	eingebunden	50%
6	Dxr-NP	39,9 µg/mg NP	eingebunden	75%
7	Dxr-NP	42,5 µg/mg NP	eingebunden	100%
8	Dxr-NP	48,4 µg/mg NP	eingebunden	200%
9	Dxr-NP	24,6 µg/mg NP	adsorptiv	
10	Dxr-NP	49,7 µg/mg NP	adsorptiv	
11	Dxr-Lösung	250 mg/ml		

Hierbei war es von besonderem Interesse welchen Einfluss die Beladungsmenge, die Beladungsart und die Stabilisierung der Dxr-NP auf die zytostatische Wirkung des Arzneistoffs haben. Alle Proben wurden entsprechend ihrem Arzneistoffgehalt in beiden Zelllinien eingesetzt (0,75 bis 100 ng/ml), die IC<sub>50</sub>-Werte rechnerisch ermittelt und mit der reinen Arzneistofflösung verglichen.

## 3.8 In-vivo-Testung

### 3.8.1 In-vivo-Test Loperamid-beladener Nanopartikel

#### 3.8.1.1 Tail-Flick-Test

Der Tail-Flick-Test wird verwendet um die Schmerzempfindlichkeit von Versuchstieren zu untersuchen. So soll getestet werden, ob die

verwendeten nanopartikulären Zubereitungen in der Lage sind ein normalerweise nicht ZNS-gängiges Opioid in das Gehirn der Versuchstiere einzuschleusen. Hierzu wird über eine Infrarotquelle ein gezielter Hitzereiz auf den Schwanz des Tieres ausgeübt. Sobald das Tier Schmerz empfindet, entzieht es seinen Schwanz selbstständig dem Infrarotstrahl. Diese Bewegung löst eine Photozelle aus, die eine integrierte Stoppuhr anhält (Isabel et al., 1981). Auf diese Weise wird die Reaktionszeit, die mit der Schmerzempfindlichkeit der Tiere korreliert, gemessen. Zeigt das Tier kein Schmerzempfinden, wird der Versuch nach 10 Sekunden abgebrochen („cut off time“). Anhand der Reaktionszeiten vor der Injektion der Zubereitung und nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation kann der prozentuale Anteil des maximal möglichen Effekts (% „Maximal Possible Effect“ = %-MPE) nach der Formel 1 errechnet werden. Dieser drückt die antinociceptive Wirkung der verwendeten Zubereitung in Prozent aus, wobei ein Wert von 100% eine starke analgetische Wirkung und ein Wert von  $\leq 20\%$  keine analgetische Wirkung bedeutet.

$$\%MPE = \frac{\text{post drug latency} - \text{pre drug latency}}{\text{cut off time} - \text{pre drug latency}} \times 100\%$$

Formel 1 Berechnungsformel des prozentualen maximal möglichen Effekts (%-MPE)

#### 3.8.1.1.1 Verwendete Versuchstiere

Für den Tail-Flick-Test wurde der Maus-Auszuchtstamm ICR/CD1 verwendet. Die ausschließlich weiblichen Tiere mit einem Gewicht von 10 bis 15 g wurden über die Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Während einer 14-tägigen Eingewöhnungsphase hatten die Tiere ständigen Zugang zu Wasser und Standard-Nagerfutter und wurden unter einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere wurden bei Erreichen eines Gewichts von 20 bis 25 g für den Versuch verwendet.

### 3.8.1.1.2 Durchführung des Tail-Flick-Tests

Der Versuch wurde nach den Vorschriften des allgemeinen Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Darmstadt durchgeführt.

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn gewogen und die Reaktionszeit vor Applikation bestimmt. Die Zubereitungen wurden mit einer 1,0 ml Spritze und einer Kanüle Größe 8 (Braun, Melsungen, Deutschland) den Tieren in die Schwanzvene appliziert. Die entsprechenden Zubereitungen wurden bezogen auf das Körpergewicht dosiert. Für Loperamid lag die Dosierung bei 7,0 mg/kg Körpergewicht. Die Kontrollzubereitungen ohne Arzneistoff wurden entweder auf die Nanopartikel-Konzentration (100 mg/kg) oder die ApoE3-Konzentration (2,0 mg/kg) bezogen dosiert. Um das Versuchstier nicht unnötig zu belasten, wurde ein maximales Volumen von 220 µl pro Tier i.v. gespritzt. Die Applikation des Opioid-Antagonisten Naloxons erfolgte in einer Dosierung von 0,1 mg/kg bzw. 0,5 mg/kg intraperitoneal (i.p.). Nach zuvor definierten Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min) wurde die Reaktionszeit der Tiere mittels Tail-Flick-Apparatur (Tail-Flick-Analgesia-Meter, Ugo Basile, Comerio, Italien) bestimmt. Um zu überprüfen, ob auch eine getrennte Injektion der ApoE3-NP bzw. der ApoE3-Lösung von dem Arzneistoff zu einem Effekt führt, wurde den Tieren 1/4 h, 1/2 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h vor Injektion einer Loperamid-Lösung die ApoE3-NP oder ApoE3-Lösung in die Schwanzvene gespritzt. Mit den erhaltenen Werten wurden nach oben aufgeführter Formel (Formel 1) die %-MPE-Werte berechnet. Die Gruppenstärke lag bei 10 Tieren. Gemäß den gesetzlichen Bestimmungen wurden die Tiere nach Versuchsende durch Inhalationsnarkose mit CO<sub>2</sub> und anschließendem Überstrecken getötet.



## 3.8.1.1.3 Getestete Zubereitungen

In verschiedenen Versuchsreihen wurden folgende Zubereitungen untersucht:

## Versuchsreihe A

Tabelle 6 Zubereitungen Tail-Flick-Test Versuchsreihe A

1	ApoE3-PEG5000-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
2	ApoE3-PEG3400-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
3	ApoE3-NAV-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
4	HSA-NP + ApoE3-Lösung	Loperamid 7,0 mg/kg
5	HSA-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
6	Lopermid-Lösung	Loperamid 7,0 mg/kg
7	ApoE3-PEG5000-NP	ohne Arzneistoff

## Versuchsreihe B

Tabelle 7 Zubereitungen Tail-Flick-Test Versuchsreihe B, getrennte Applikation mit zeitlichem Versatz von ApoE3-PEG-NP oder ApoE3-Lösung zu einer Loperamid-Lösung

1	ApoE3-PEG5000-NP	Injektion Loperamid-Lösung 7,0 mg/kg 1/4 h, 1/2 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h nach Injektion von ApoE3-PEG-NP
2	ApoE3-Lösung	Injektion Loperamid-Lösung 7,0 mg/kg 1/4 h, 1/2 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h nach Injektion von ApoE3-Lösung
3	ApoE3-Lösung + Lopermid 7,0 mg/kg	

Versuchsreihe C

Tabelle 8 Zubereitungen Tail-Flick-Test Versuchsreihe C, Applikation einer Naloxon-Lösung vor Injektion einer ApoE3-Lösung mit Loperamid 7,0 mg/kg

1	Naloxon-Lösung 0,1 mg/kg i.p.	nach 10 min ApoE3-Lösung + Loperamid 7,0 mg/kg
2	Naloxon-Lösung 0,5 mg/kg i.p.	nach 30 min ApoE3-Lösung + Loperamid 7,0 mg/kg
3	Naloxon-Lösung 0,5 mg/kg i.p.	Kontrolle

3.8.2 In-vivo-Test Doxorubicin-beladener HSA-NP

3.8.2.1 Behandlung von Gehirntumor-tragenden Ratten

Die Behandlung von Gehirntumoren stellt eine große Herausforderung an die pharmazeutische Technologie dar. Um zu untersuchen, ob es möglich ist mit dem ApoE3-modifizierten Trägersystem das Zytostatikum Doxorubicin in das Gehirn zu transportieren und einen antineoplastischen Effekt zu erzielen, wurde Ratten künstlich ein Glioblastom xenotransplantiert und die Tiere anschließend mit den Nanopartikelzubereitungen behandelt. Im Vergleich zu Kontrollgruppen wurde überprüft, ob es bei den behandelten Tieren zu einer Verlängerung der Überlebenszeit oder sogar zu einer vollständigen Remission des Tumors kommt. Diese Versuche wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Svetlana Gelperina am Institut für Humane Morphologie in Moskau, Russland nach den Richtlinien des Russischen Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung des Russischen Gesundheitsministeriums durchgeführt.

### 3.8.2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Auszucht-Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200 - 250 g verwendet. Die von Charles River (Stolbovaya, Moskau, Russland) bezogenen Tiere wurden für 10 Tage in Käfigen zu je 5 Tieren bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h gehalten. Während der gesamten Versuchsdauer hatten die Ratten freien Zugang zu Wasser und Nagerfutter. Bei Tumorimplantation betrug das Gewicht der Tiere  $250 \pm 50$  g.

### 3.8.2.1.2 Implantation des Tumorgewebes

Als Tumorgewebe wurde das 101/8-Glioblastom verwendet. Dieser Tumor ist in Bezug auf Morphologie und biologisches Verhalten sehr stark verwandt mit menschlichen Glioblastomen. Erzeugt wurde er durch lokale Injektion von  $\alpha$ -Dimethylbenzanthracene (DMBA) in das Cerebellum von Wistar-Ratten und weitere Anzüchtung und Passage in Donortieren (Iablonskaia and Spryshkova, 1970). Für die hier durchgeführten Versuche wurde zunächst tiefgefrorenes Tumormaterial aufgetaut und in Ratten weiter vermehrt. Die Tiere wurden durch i.p. Injektion von Pentobarbital (50 mg/kg) anästhesiert und ein 1,5 mm großes Loch mit einem Zahnarztbohrer in den rechten lateralen Ventrikel gebohrt. Ungefähr  $10^6$  Zellen des Tumormaterials wurden mit einer Tuberculin-Spritze durch das Loch ca. 4 mm unterhalb des Schädelknochens platziert. Nach Verschließen des Loches mit Gewebekleber (Turbo 2000 Kleber, Bold & Co, Wermelskirchen, Deutschland) wurden die Tiere bis zur Entwicklung von klinischen Symptomen (ca. 14 Tage) gehalten und anschließend durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet. Das Tumormaterial wurde aus dem Schädel entnommen und 5 mg große Teile mit Hilfe der gleichen Technik in die für den eigentlichen Versuch verwendeten Tiere eingepflanzt.

### 3.8.2.1.3 Behandlungsschema und Durchführung

Für die Behandlung der Tumor-tragenden Ratten wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Zubereitungen verwendet. Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren, von denen jedes an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation eine intravenöse Injektion von 1,5 mg/kg, bezogen auf die Konzentration von Doxorubicin, in der jeweiligen Zubereitung erhielt. Zusätzlich blieb eine Gruppe zur Kontrolle unbehandelt. Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer auf klinische Symptome wie Verhalten und Gewichtsverlust hin beobachtet. Bei einem Gewichtsverlust von  $\geq 20\%$  oder Paralyse wurden die Tiere eingeschläfert. Als Auswertungsparameter wurde die mittlere Überlebenszeit („Mean Survival Time“) in Bezug auf die unbehandelte Kontrollgruppe berechnet und der Versuchsverlauf mittels Kaplan-Meier-Plot grafisch dargestellt.

Tabelle 9 Zubereitungen zur Behandlung von Gehirntumor-tragenden Ratten

<i>Doxorubicin inkorporiert in Nanopartikel; Quervernetzung 100%; 44,0 µg Dxr / mg NP</i>		
1	Dxr-NP	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
2	ApoE3-Dxr-NP	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
3	PEG-Dxr-NP	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
4	Dxr-NP + 1% (m/V) Tween 80	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
5	Dxr-Lösung	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
<i>Doxorubicin adsorptiv an Nanopartikel gebunden; 47,1 µg Dxr / mg NP</i>		
6	Dxr-NP	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
7	ApoE3-Dxr-NP	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
8	PEG-Dxr-NP	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
9	Dxr-NP + 1% (m/V) Tween 80	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation
10	Dxr-Lösung	3 mal 1,5 mg/kg an Tag 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation

### 3.8.2.2 Subchronische toxikologische Studie

In dieser mit Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln (Quervernetzung 100%, 1,0 mg Dxr / 20 mg HSA) durchgeführten Studie sollte untersucht werden, inwieweit die bei einer Gabe von Doxorubicin auftretenden toxischen Nebenwirkungen durch Einbindung des Arzneistoffs in das Trägersystem beeinflusst werden. Hierzu wurden Ratten mehrmals Doxorubicin-beladene HSA-NP gespritzt und auf die Anthracyclin-typische

Toxizität untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Körpergewicht, Elektrokardiogramm und das Blutbild gerichtet. Nach der Tötung der Versuchstiere wurde eine makroskopische Untersuchung der Organe durchgeführt und das Herz und die Hoden auf histologische Veränderungen hin untersucht. Diese Versuche wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Svetlana Gelperina am Institut für Humane Morphologie in Moskau, Russland durchgeführt.

### 3.8.2.2.1 Versuchstiere

Für die subchronische toxikologische Studie wurden ausgewachsene männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 120 – 150 g von der Russischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften bezogen. Die Tiere wurden zum Akklimatisieren für 14 Tage in Käfigen zu je 5 Tieren bei einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Während der gesamten Versuchsdauer hatten die Tiere ständigen Zugang zu Wasser und Nagerfutter.

### 3.8.2.2.2 Behandlungsschema und Durchführung

Die erhaltenen Wistar-Ratten wurden zufällig in Gruppen zu je 12 Tieren aufgeteilt und jede Gruppe erhielt eine der in Tabelle 10 aufgeführten Zubereitungen. Eine Gruppe blieb als Kontrolle unbehandelt. Alle Zubereitungen wurden, gemäß dem Behandlungsschema in Punkt 3.8.2.1.3, mit einer Dosierung von 1,5 mg/kg Doxorubicin 3mal mit einem 72-stündigen Abstand verabreicht. Vor der Behandlung wurde ein klinischer Bluttest und eine Elektrokardiographie durchgeführt sowie das Körpergewicht bestimmt. Diese Parameter wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt gemessen. Das Körpergewicht wurde 15 und 30 Tage nach Behandlung bestimmt. Klinische Bluttests wurden 3, 5, 7, 14 und 30 Tage nach Behandlung wiederholt und die Elektrokardiographie an den Tagen 15 und 30 nach Behandlung durchgeführt. Zur Untersuchung der Organe wurden 6 der 12 Tiere 15 Tage nach Behandlung und die

restlichen Tiere 30 Tage nach Behandlung eingeschläfert und die Organe entnommen. Die Organe wurden gewogen und der relative Organ/Körpergewichts-Index berechnet. Eine histologische Untersuchung erfolgte für das Herz- und Hodengewebe, indem die Organe in Formalin eingebettet, geschnitten und mit Eosin angefärbt wurden.

Tabelle 10 Zubereitungen der subchronischen toxikologischen Studie

1	Dxr-NP	3 mal 1,5 mg/kg alle 72 h
2	Dxr-NP + 1% (m/V) Tween 80	3 mal 1,5 mg/kg alle 72 h
3	Dxr-Lösung	3 mal 1,5 mg/kg alle 72 h
4	Dxr-Lösung + 1% (m/V) Tween 80	3 mal 1,5 mg/kg alle 72 h

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die BHS ist der limitierende Faktor in der gezielten Arzneimitteltherapie von Erkrankungen des ZNS wie z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Epilepsie, Schizophrenie, Chorea Huntington, bakterielle und virale Infektionen und Gehirntumoren. Sie besteht aus verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Astrocyten, Pericyten und Microglia mit besonderen morphologischen Eigenschaften. Diese sind, das Vorhandensein von „Tight Junctions“, eine verminderte Pinocytoserate, der verstärkte Metabolismus von Substanzen und Expression von aktiven Efflux-Transportern auf der luminalen Seite (Terasaki and Hosoya, 1999). Aufgrund dieser Schutzmechanismen sind nur solche Substanzen in der Lage die BHS zu überwinden, die unpolar und ungeladen sind und deren Molekulargewicht unter 500 Da liegt (Pardridge, 2005). Körpereigene Substanzen wie Glukose, Fettsäuren und Cholesterol besitzen spezifische Transportwege über Rezeptoren oder Transporter, um ins Gehirn zu gelangen (Pardridge, 1991). Bisher war es nur möglich über invasive Methoden wie z.B. osmotische Öffnung der BHS oder nicht invasive Methoden wie z.B. Verwendung von Prodrugs einen Arzneistoff ins Gehirn einzuschleusen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung, Charakterisierung und In-vitro- sowie In-vivo-Testung eines kolloidalen Trägersystems zur Überwindung der BHS. Auf diesem Gebiet wurden in der Vergangenheit einige Erfolge erzielt. So war es zum Beispiel möglich, die Arzneistoffe Kytorphin, Dalargin, Doxorubicin, Loperamid, und Tubocurarin mit Hilfe von Tween 80 überzogenen PBCA-NP hirngängig zu machen und zentrale Effekte zu erzeugen (Alyautdin et al., 1995; Alyautdin et al., 1997; Schroeder et al., 1998; Gulyaev et al., 1999). In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass eine Anlagerung von Apolipoproteinen aus dem Blut an die Tween 80 überzogenen PBCA-NP ein möglicher Schlüsselfaktor des Transportes der Arzneistoffe ins Gehirn darstellt (Lück, 1997; Lück et al., 1997). Daraufhin wurden Apolipoproteine in Folgeversuchen adsorptiv an die PBCA-NP gebunden und somit ein Gehirn-Targeting erreicht



(Kreuter et al., 2002). Hierbei tat sich besonders ApoE3 als potentieller Gehirn-Targeting-Ligand hervor.

ApoE3 ist Bestandteil von Lipoproteinpartikeln wie HDL, LDL oder VLDL und ist somit maßgeblich am Transport dieser Lipoproteine und damit vergesellschaftetem Transport von Cholesterol und Fettsäuren in das ZNS beteiligt. Die Aufnahme dieser Lipoproteinpartikel erfolgt über Bindung des Apolipoprotein-Bestandteils an Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Gen-Familie (Punkt 2.2.2.3) (Nimpf and Schneider, 2000; Herz and Marschang, 2003; Dergunov, 2004). Diese auch an der BHS vorkommenden Rezeptoren werden zusammen mit dem gebunden Lipoproteinpartikel internalisiert und in das Gehirn eingeschleust (Dehouck et al., 1997).

Um einer möglichen Desorption von Liganden wie z.B. ApoE3 von der Partikeloberfläche vorzubeugen und die Menge des einzusetzenden Liganden zu verringern, wurde in vorangegangenen Doktorarbeiten Nanopartikel aus HSA entwickelt (Weber et al., 2000; Langer et al., 2003), mit denen es möglich war diese Strukturen direkt an die Oberfläche des Trägersystems zu binden (Wartlick et al., 2004a). Vorteile von Nanopartikeln aus HSA sind ihre geringe Antigenität, die einfache Herstellung und die für proteinchemische Modifikationen vorhandenen Amino- und Carboxyl-Gruppen auf der Oberfläche. So ist es möglich einen Drug-Targeting-Liganden durch einen geeigneten bifunktionalen Crosslinker direkt kovalent an die Oberfläche der HSA-NP zu binden (Langer et al., 2000). Auf Verwendung des kritisch zu bewertenden Tensids Tween 80 als Überzug kann somit verzichtet werden. Die Entwicklung eines ApoE3-modifizierten Trägersystems trieb vor allem Frau Michaelis voran (Michaelis, 2005). Es wurden unterschiedliche Crosslinker und Bindungsstrategien verwendet um das Protein an die Partikel zu binden. Nach der Beladung der entwickelten ApoE3-modifizierten Nanopartikel mit einem Modellarzneistoff konnten erste Erfolge beim Gehirn-Targeting im Tiermodell erzielt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die korrekte Bindungssequenz des Liganden zum Rezeptor zur Überwindung der BHS nötig ist (Michaelis et al., 2006).

Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit war es die ApoE3-modifizierte Nanopartikel routinemäßig herzustellen und weitere Versuche im Tiermodell durchzuführen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Variation der einzelnen Komponenten gelegt, wie z.B. Bindungslänge des Crosslinkers, Art der Bindung des ApoE3 und/oder des Arzneistoffs Loperamid. Auch die getrennte und zeitlich versetzte Applikation der aktiven Komponenten wurde untersucht.

Ein weiteres Ziel war es, das so entwickelte Trägersystem auf eine therapeutische Anwendung hin zu übertragen. Von besonderem Interesse war dabei die Behandlung von Gehirntumoren. Für diese Art der Erkrankung des ZNS stehen nur wenige therapeutisch wirksame Arzneistoffe aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe (Camustin, Lomustin) zur Verfügung. Die konventionelle Therapie erfolgt durch Bestrahlung oder operative Entfernung des Tumors. Zur Behandlung von Gehirntumoren wurden im Rahmen dieser Arbeit HSA-NP entwickelt, die als Arzneistoff das Zytostatikum Doxorubicin tragen. Dieser zur konventionellen Krebstherapie eingesetzte Arzneistoff wurde aufgrund seines vielseitigen Wirkmechanismus und seines sehr gut bekannten pharmakologischen Profils hin ausgewählt. Es wurden zwei Beladungsstrategien für den Arzneistoff verfolgt. Zum einen die adsorptive Bindung des Arzneistoffs an das Trägersystem nach Herstellung der HSA-NP, zum anderen die Einbindung von Doxorubicin in die Matrix der Partikel. Zuletzt genannte Strategie hat den Vorteil, dass der Arzneistoff vor äußeren Einflüssen wie Desorption, Inaktivierung durch Enzyme und oxidative Prozesse geschützt ist. Um sicherzustellen, dass das Doxorubicin nach der Bindung an das Partikelsystem noch seine volle antineoplastische Wirkung hat, wurde in Zellkulturexperimenten mit Neuroblastomzellen die antiproliferative Wirkung des Arzneistoffs bestimmt.

An diese Versuche schloss sich die Herstellung von ApoE3-modifizierten Doxorubicin-tragenden HSA-NP an. Wie bereits mit Doxorubicin-beladenen PBCA-NP geschehen (Steiniger et al., 2004), wurden diese Dxr-NP im Tierversuch an Glioblastom tragenden Ratten eingesetzt und im Vergleich

zu einer unbehandelten Kontrollgruppe die mittlere Überlebenszeit bestimmt.

Des Weiteren war es von Interesse ob die entwickelten Dxr-NP im Vergleich zu einer Standard Zytostatika Therapie mit einer Doxorubicin Lösung einen Vorteil im Nebenwirkungsprofil haben. Hierfür wurde eine subchronische toxikologische Studie an männlichen Ratten durchgeführt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den für eine Doxorubicinbehandlung typischen Nebenwirkungen wie z.B. Kardiotoxizität, Blutbildveränderungen und der Einfluss auf schnell teilendes Gewebe (Hoden).

## **4.1 Herstellung und Charakteristika von HSA-NP**

### 4.1.1 Größe und Zetapotential

Die routinemäßige Herstellung von leeren HSA-NP erfolgte nach der von Weber et al. und Langer et al. beschriebenen Desolvationsmethode (Weber et al., 2000; Langer et al., 2003). Die so erhaltenen Nanopartikel hatten eine Größe von  $205,9 \pm 16,6$  nm ( $n = 10$ ) und eine Zetapotential von  $-48,0 \pm 2,6$  mV ( $n = 5$ ).

### 4.1.2 Gravimetrie

Der Gehalt der Nanopartikel in den jeweiligen Proben wurde gravimetrisch nach der in Punkt 3.5.2 beschriebenen Methode bestimmt. Bei allen Nanopartikel-Präparationen, sowohl mit als auch ohne Arzneistoff sowie mit als auch ohne Oberflächenmodifikation, wurde der Nanopartikel-Gehalt nach allen Reaktionsschritten und Umsetzungen bestimmt. Je nach Anwendung der entsprechenden Zubereitung wurden die Nanopartikelsuspensionen im letzten Arbeitsschritt auf einen Gehalt von 10,0 bis 20,0 mg/ml eingestellt. Bei der Verabreichung der Nanopartikel an Mäuse wurde immer eine Konzentration von 10,0 mg/ml eingestellt.

## 4.2 Bindung von ApoE3 an die Oberfläche von HSA-NP

### 4.2.1 Kovalente Bindung von ApoE3

Die kovalente Bindung von Liganden an die Oberfläche von kolloidalen Trägersystemen wurde bereits 1974 von Molday et al. beschrieben (Molday et al., 1974). Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es zahlreiche Publikationen in denen verschiedene Drug-Targeting-Liganden wie z.B. Antikörper und körpereigene Proteine die kovalent an Trägersysteme gekoppelt sind zu einer Anreicherung im Zielgewebe führten (Huwyler et al., 1996; Zhang et al., 2002; Li et al., 2003; da Cruz et al., 2004; Wartlick et al., 2004a). In dieser Arbeit wurde ApoE3 als Ligand für eine gezielte Anreicherung von Nanopartikeln aus HSA im Gehirn verwendet.

#### 4.2.1.1 NHS-PEG-MAL Crosslinker

Die Bindung des Liganden ApoE3 wurde durch die Verwendung von bifunktionalen Crosslinkern (NHS-PEG-MAL) erreicht. Diese Crosslinker, der Firma Nektar Huntsville, USA, enthalten zwei für die Pegylierung gebräuchliche funktionelle Gruppen. Selektiv für die Reaktion des Crosslinkers mit SH-Gruppen, wie sie in ApoE3 eingeführt wurden, ist die Maleinimid-Struktur. Für die Reaktion mit Amino-Gruppen auf der Partikeloberfläche steht der reaktive N-Hydroxy-succinimid-Ester (NHS-Ester) zur Verfügung. Die Reaktion der Maleinimid-Struktur mit SH-Gruppen ist im neutralen pH-Bereich ( $\text{pH} = 7,0$ ) um den Faktor 1000 schneller als mit anderen nucleophilen Gruppen (Amino- oder Hydroxy-Gruppen). Verschiebt man den pH-Wert in den leicht alkalischen Bereich ( $\text{pH} \geq 8,0-9,0$ ) verlagert sich das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Amino-Gruppen, die mit den SH-Gruppen um die Maleinimid-Funktion konkurrieren. Zudem besitzen beide funktionellen Gruppen unterschiedliche Stabilitäten in wässrigem Medium. Der NHS-Ester ist im Gegensatz zur Maleinimid-Struktur hydrolytisch instabil. Aus diesem Grund wurde bei der kovalenten Konjugation von ApoE3 an die HSA-NP zunächst über die NHS-Ester-Funktion der Crosslinker an die

Amino-Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche gebunden. Durch die unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten der Maleinimid-Struktur gegenüber dem NHS-Ester, bleibt die Aktivität der Maleinimid-Gruppe erhalten. Bedingt durch die höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Maleinimid-Komponente gegenüber SH-Gruppen war es dann möglich, das vorher thiolierte ApoE3 kovalent an die Oberfläche des Trägersystems zu binden. Ein Schema der Reaktion der beiden funktionellen Gruppen des Crosslinkers mit SH- und Amino-Gruppen ist in Abbildung 8 dargestellt.

Zwischen den beiden reaktiven Gruppen befindet sich eine PEG-Kette definierter Länge. In dieser Arbeit wurden Crosslinker verwendet bei denen diese Kette ein mittleres Molekulargewicht von 3400 Da bzw. 5000 Da hat. Vorteil dieser PEG-Ketten ist ein ausreichend großer Abstand zwischen Ligand und Oberfläche der Partikel um mögliche sterische Hinderungen zur Zielstruktur auszuschließen. Zudem sorgt die PEG-Kette für eine Hydrophilisierung der Nanopartikel. Hierdurch wird eine Oponisierung durch Immunglobuline und Faktoren des Komplementsystems und die damit verbundene Phagozytose durch Makrophagen verringert und folglich die Zirkulationszeit des Trägersystems im Blutstrom verlängert. Dieser Effekt ist in der Literatur auch als „Stealth Effect“ bekannt und wurde zuerst bei pegylierten Liposomen beobachtet (Allen and Hansen, 1991; Newman et al., 1999; Wang et al., 2000).

## Ergebnisse und Diskussion

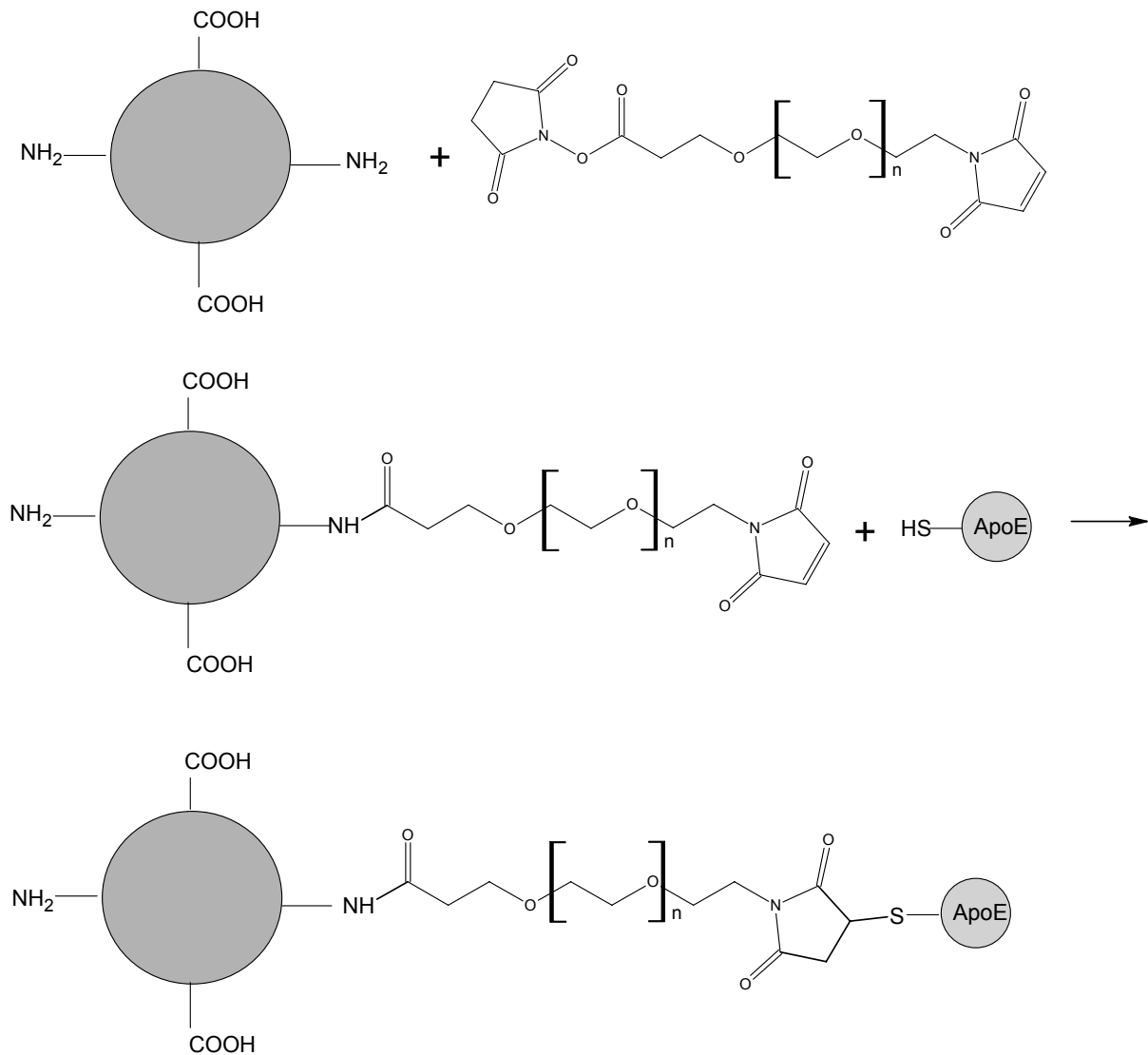


Abbildung 8 Reaktionsschema des NHS-PEG-MAL Crosslinkers mit Amino-Gruppen der HSA-NP und SH-Gruppen des thiolierten Liganden am Beispiel ApoE3

### 4.2.1.2 Thiolierung von ApoE3

Um den hier verwendeten Drug-Targeting Liganden ApoE3 an die Maleinimid-Struktur des Crosslinkers zu binden, wurden in das 34 kDa große Molekül durch Reaktion mit Traut's-Reagenz SH-Gruppen eingeführt. Traut's-Reagenz ist ein zyklisches Thioamid (2-Iminothiolan), das in einem pH-Bereich von 7,0 bis 9,0 mit primären Amino-Gruppen unter Ringaufspaltung reagiert und somit SH-Gruppen in ein Zielmolekül einführt (Abbildung 9). Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist die

Reaktion mit primären Aminen 100-fach schneller als mit aliphatischen und phenolischen Hydroxy-Gruppen.

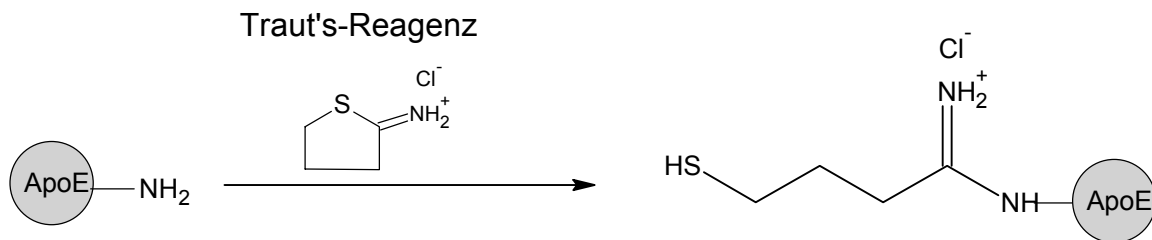


Abbildung 9 Reaktionsschema: Thiolierung von ApoE3 mit Traut's Reagenz

Der Nachweis der eingeführten SH-Gruppen wurde durch Reaktion mit Ellman's-Reagenz (5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) = DTNB) durchgeführt. Hierbei reagiert das DTNB quantitativ mit freien SH-Gruppen zu einem gemischten Disulfid und 2-Nitro-Thiobenzoessäure (TNB) (Ellman, 1959) (Abbildung 10). Das bei der Reaktion entstandene TNB ist gelb gefärbt und hat bei einem pH-Wert zwischen 7,6 und 8,6 einen molaren Extinktionskoeffizienten von  $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die Menge des freigesetzten TNB ist somit proportional zu der Menge an vorhandenen SH-Gruppen.

Die Thiolierung des ApoE3 mit einem 50-fachen molaren Überschuss an Traut's-Reagenz ergab nach der Reaktion mit Ellman's-Reagenz und Vergleich mit L-Cystein-Standards, dass im Durchschnitt  $1,43 \pm 0,37$  mol SH-Gruppen pro mol ApoE3 ( $n = 5$ ) eingeführt wurden.

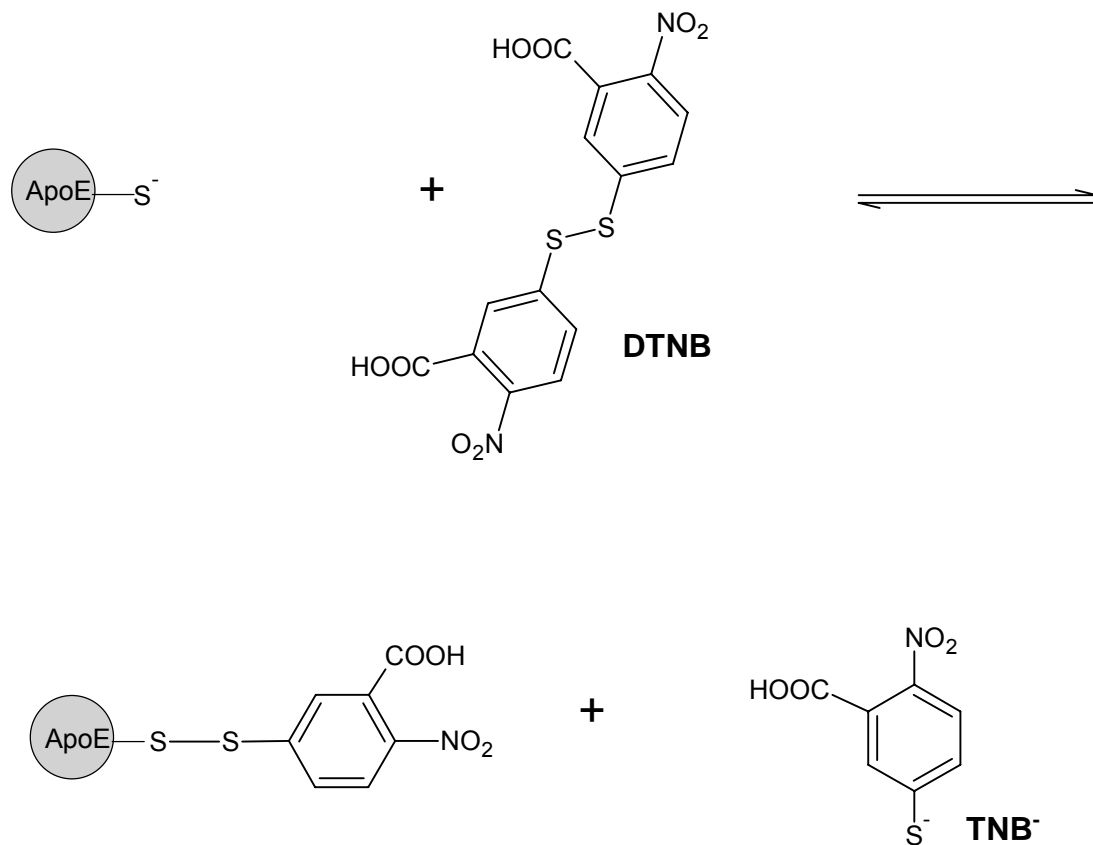


Abbildung 10 Reaktionsschema: Nachweis der eingeführten SH-Gruppen mit Ellman's-Reagenz am Beispiel von ApoE3

#### 4.2.1.3 Konjugation und Beladungsbestimmung von thiolierem ApoE3 an aktivierte HSA-NP

Die mit dem Crosslinker NHS-PEG-MAL aktivierten Nanopartikel wurden mit dem thiolierem ApoE3 versetzt und inkubiert. Die noch freie und aktive Maleinimid-Struktur des Crosslinkers reagierte mit den eingeführten SH-Gruppen im ApoE3-Molekül über Nacht, wobei das ApoE3 kovalent an die Oberfläche der Partikel gebunden wurde. Das entstandene ApoE3-modifizierte Trägersystem ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt.



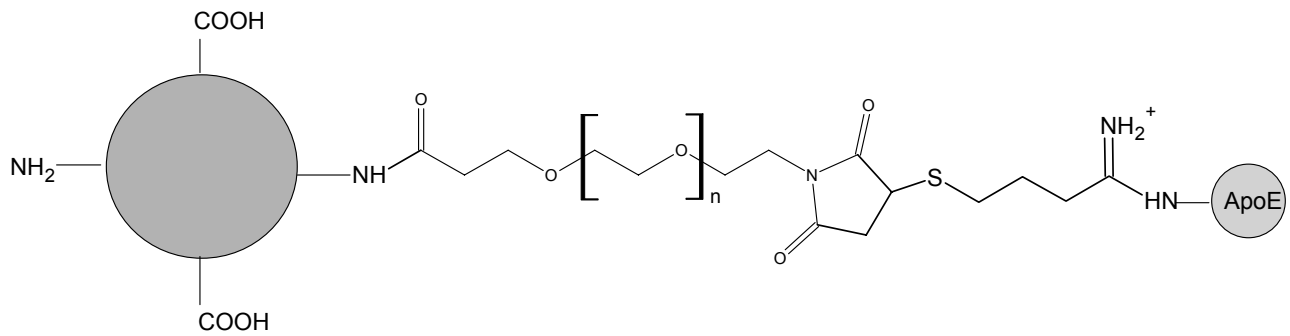


Abbildung 11 Struktur der ApoE3-modifizierten HSA-NP mit kovalent gebundenem ApoE3

Um zu quantifizieren wie viel des eingesetzten ApoE3 an das Trägersystem gebunden hat, wurden zwei analytische Verfahren, Western-Blot und Micro-BCA-Assay, eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte indirekt, das heißt, es wurde der ungebundene Anteil des Liganden im Überstand der Nanopartikel quantifiziert und rechnerisch der gebundene Anteil bestimmt.

Im Micro-BCA-Assay wird der Gesamtproteingehalt einer Lösung bestimmt. Bei den hier vorhandenen Überständen nach Inkubation (Punkt 3.2.3.1) könnten theoretisch nur zwei Proteine vorhanden sein, erstens ungebundenes ApoE3 und zweitens aus der Partikelmatrix freigesetztes HSA. Um eine Verfälschung des Ergebnisses durch freies HSA auszuschließen, wurden zwei Hintergrund-Kontrollen mit aktivierten HSA-NP und leeren HSA-NP angesetzt (Tabelle 2). Zusätzlich wurde eine Adsorptions-Kontrolle von ApoE3 an HSA-NP ohne Crosslinker durchgeführt, um das Ergebnis um den unspezifisch gebundenen Anteil von ApoE3 zu korrigieren. Durch Vergleich mit dem 100%-Wert konnte der kovalent gebundene Anteil von ApoE3 nach Versetzen mit dem Micro-BCA-Reagenz photometrisch bestimmt werden. Die Auswertung des Micro-BCA-Assay ergab eine Bindungseffizienz von  $40,2 \pm 9,5\%$  ( $n = 10$ ) des thiolierten ApoE3 an die aktivierten HSA-NP. Das entspricht einer Beladung von  $2,16 \times 10^{-2} \pm 0,68 \times 10^{-2}$  mol ApoE3 pro mol HSA bzw.  $11,35 \pm 3,59$   $\mu\text{g}$  ApoE3 pro mg HSA-NP ( $n = 7$ ).

Zur Kontrolle der Ergebnisse des Micro-BCA-Assay wurde mit den nach der Konjugation erhaltenen Überständen ein SDS-Page (Laemmli, 1970) mit

anschließendem Western-Blot (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Zur Detektion des ApoE3 wurde sich der Methode der „Enhanced Chemilumineszenz“-Reaktion, wie bereits unter Punkt 3.2.3.3.3 beschrieben, bedient. Ein charakteristisches Laufbild ist in Abbildung 12 zu sehen. Sowohl die Überstände als auch die Positiv-Kontrolle wurden auf eine ApoE3-Konzentration von 20 µg/ml eingestellt, die Belichtungszeit betrug 10 Sekunden. Es ist deutlich zu sehen, dass eine starke Bande bei der Positiv-Kontrolle (Linie 4) bei einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa auftrat. Dies entspricht dem Molekulargewicht von ApoE3 (34200 Da). Bei den Partikelüberständen (Linie 1 – 3) waren die Bandenintensitäten im Vergleich zur Kontrolle deutlich abgeschwächt bis kaum erkennbar. Dies bedeutet, dass ein beträchtlicher Anteil des ApoE3 an den Crosslinker und somit an das Trägersystem gebunden hat. Eine genaue Quantifizierung mittels WB war unter den gegebenen Umständen nicht möglich. Allerdings konnte mit diesem Verfahren eindeutig die Identität und eine Bindung des Liganden nachgewiesen werden.

Die Kombination beider analytischer Verfahren belegte, dass ApoE3 kovalent an das Trägersystem gebunden wurde. Die erhaltenen ApoE3-HSA-NP hatten eine durchschnittliche Größe von  $219,4 \pm 19,2$  nm ( $n = 10$ ) und ein Zetapotential von  $-42,3 \pm 1,2$  mV ( $n = 5$ ). Bei Verwendung der so erhaltenen Nanopartikel zu Tierversuchen betrug der ApoE3-Gehalt  $113,5 \pm 35,9$  µg/ml.

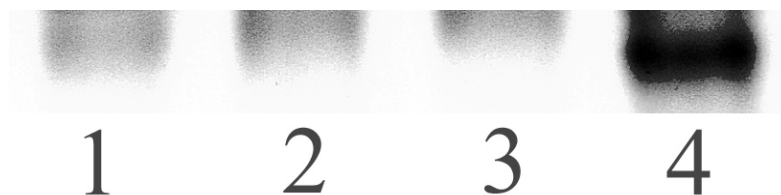


Abbildung 12 Western-Blot der Überstände der Nanopartikel nach ApoE3-Konjugation (1-3) und einer ApoE3-Lösung (4), Konzentration maximal 20 µg/ml ApoE3

#### 4.2.2 Bindung von ApoE3 über das NeutrAvidin-Biotin-System

Das NeutrAvidin-Biotin-System ist ein sehr starker Komplex mit einer Komplexbildungskonstante von  $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$  (Hiller et al., 1987). NAV hat ein Molekulargewicht von 60 kDa, einen isoelektrischen Punkt von 6,0 und besteht aus vier Untereinheiten. Jede Untereinheit ist in der Lage ein Molekül Biotin zu binden. Der gebildete Komplex weist über einen weiten pH-Bereich eine hohe Stabilität auf, die auch kurzzeitiges Erhitzen nicht verringert (Wei and Wright, 1964). Für die Bindung von ApoE3 über dieses System musste zunächst ApoE3 wie in Punkt 3.2.3.5 beschrieben biotinyliert werden. Eine Überprüfung der Biotinylierung erfolgte nicht. Da dies ausführlich in der Dissertation von Frau Michaelis behandelt wurde (Michaelis, 2005).

Die Bindung des thiolierten NAV an die noch vorhandene aktive Maleinimid-Struktur des Crosslinkers erfolgte analog der kovalenten Bindung des thiolierten ApoE3. Zur Quantifizierung der Bindung des NAV wurden die Überstände bei einer Wellenlänge von 280 nm direkt vermessen und durch Vergleich mit Kontroll-Lösungen (Tabelle 3) die Bindungseffizienz bestimmt. NAV wurde mit durchschnittlich  $54,8 \pm 10,2\%$  ( $n = 3$ ) an die aktivierten HSA-NP gebunden. Die entstandenen NAV-PEG-NP hatten eine Größe von  $234,1 \pm 13,2 \text{ nm}$  ( $n = 3$ ).

Die Bindung des biotinylierten ApoE3 erfolgte wie unter Punkt 3.2.3.6 beschrieben. Die Feststellung der Identität und die Quantifizierung der Bindungseffizienz des ApoE3 wurden ebenfalls mittels Western-Blot und Micro-BCA-Assay durchgeführt. Hierbei betrug die Beladung von ApoE3 über das NeutrAvidin/Biotin System  $2,30 \times 10^{-2} \pm 0,26 \times 10^{-2} \text{ mol ApoE3 pro mol HSA}$ , dies entspricht  $12,11 \pm 1,36 \mu\text{g ApoE3 pro mg NP}$ . Die resultierenden ApoE3-NAV-NP (Abbildung 13) waren  $220,4 \pm 15,1 \text{ nm}$  ( $n = 3$ ) groß und hatten ein Zetapotential von  $37,2 \pm 2,9 \text{ mV}$  ( $n = 3$ ). Die etwas geringere Größe im Vergleich zu den NAV-PEG-NP kommt durch die Desaggregation von Agglomeraten durch wiederholtes Redispergieren der

Probe im Ultraschallbad zustande. Im Tierversuch betrug die ApoE3-Konzentration dieser Partikel  $121,1 \pm 13,6 \mu\text{g/ml}$ .

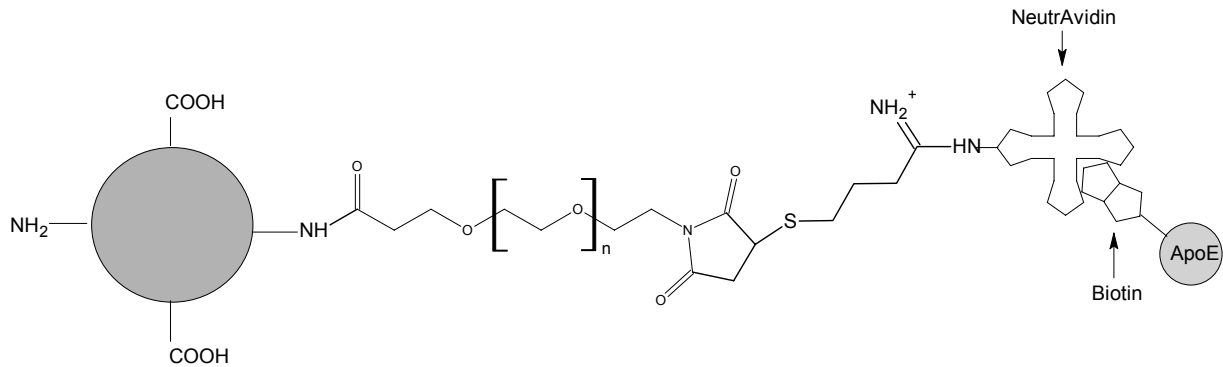


Abbildung 13 Struktur der ApoE3-modifizierten HSA-NP mit Bindung des ApoE3 über das NeutrAvidin-Biotin-System

### 4.3 Loperamid-beladene Nanopartikel

Loperamid ist ein synthetisches Opioid, das bei der Behandlung von Diarrhöe Anwendung findet. Durch seine agonistische Wirkung an Opiat-Rezeptoren kommt es zu einer Tonussteigerung der glatten Muskulatur des Darms und somit zur Hemmung von peristaltischen Wellen. Die durchschnittliche Verweilzeit im Darm wird verlängert, was zu einer gesteigerten Wasser- und Elektrolyt-Aufnahme führt. Die orale Bioverfügbarkeit des Loperamids ist nur sehr gering (0,3%), da es einem ausgeprägten „First Pass Effekt“ unterliegt. Unter Verwendung von üblichen Dosen, aber auch bei stark erhöhten klinischen Dosen, treten keine Opiat-typischen zentralen Effekte, wie z.B. Atemdepression oder schmerzstillende Wirkung auf. Daraus lässt sich schließen, dass Loperamid selbst in hohen Dosen kaum in der Lage ist die BHS zu überwinden. Nur bei Kindern unter zwei Jahren, bei denen die BHS noch nicht vollständig ausgebildet ist, wurden diese Opiat typischen Wirkungen beobachtet (Bhutta and Tahir, 1990). Ein Grund für die Undurchlässigkeit der BHS für Loperamid ist, dass der Arzneistoff ein Substrat für das Pgp darstellt. In „Pgp-Knockout“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Dosen von Loperamid, die ohne Effekt auf Wildtyp-Mäuse sind, bei den

„Knockout“-Mäusen zum Tod führten (Schinkel et al., 1996). Auch eine Hemmung des Pgp durch die vorherige Gabe des Pgp-Inhibitors Chinidin zeigte einen deutlichen atemdepressiven Effekt an menschlichen Probanden (Sadeque et al., 2000).

Diese Eigenschaften machen Loperamid zu einem geeigneten Modellarzneistoff für das ApoE3-modifizierte Trägersystem zur Überwindung der BHS. Wenn das Trägersystem in der Lage ist Loperamid in das ZNS zu transportieren, müsste an den Versuchstieren ein analgetischer Effekt messbar sein. Ein einfacher Test um eine schmerzstillende Wirkung zu messen, ist der bereits unter Punkt 3.8.1.1 beschriebene Tail-Flick-Test.

#### 4.3.1 Beladungsbestimmung von Loperamid

Um den Transport von Loperamid über die BHS zu gewährleisten, musste der Arzneistoff zunächst an das Trägersystem gebunden werden. Eine Einbindung des Arzneistoffs in die Partikel war aufgrund der hohen Affinität zu dem Desolvatationsmittel Ethanol, das zur Herstellung der HSA-NP eingesetzt wird, nicht möglich (Michaelis, 2005). Somit erfolgte die Beladung nach Herstellung der fertigen Nanopartikel adsorptiv an die Oberfläche (Punkt 3.3.3). Zur Beladungsbestimmung wurde der ungebundene Anteil des Arzneistoffs nach der HPLC-Methode von Chen et al. (Chen et al., 2000) bestimmt. Unter den gewählten analytischen Bedingungen hatte Loperamid eine Retentionszeit von 18 min und war bis zu einer unteren Konzentration von 1,0 µg/ml quantifizierbar.

##### 4.3.1.1 Beladung unmodifizierter Nanopartikel mit Loperamid

Die adsorptive Beladung wurde zunächst an unmodifizierten HSA-NP durchgeführt. Da die Adsorptionsrate von Substanzen stark von der zur Verfügung stehenden Oberfläche abhängt, wurde die Menge an Loperamid immer auf eine konstante Menge Nanopartikel (20,0 mg) bezogen. Es

wurden Nanopartikelzubereitungen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an Loperamid hergestellt. Die Ergebnisse der Beladung sind in Tabelle 11 zu sehen.

Tabelle 11 Adsorptive Beladung von HSA-NP mit Loperamid, (n = 9, ± S.D.)

	<i>Loperamid mg/20mg NP</i>	<i>Beladungseffizienz %</i>	<i>absolute Beladung µg/mg NP</i>	<i>Konzentration Loperamid mg/ml</i>
1	3,3	45,6 ± 5,3	75,3 ± 8,7	0,75 ± 0,09
2	6,6	25,1 ± 4,5	82,9 ± 14,9	0,83 ± 0,15
3	7,0	22,2 ± 5,2	77,6 ± 18,1	0,77 ± 0,18

Die absolute Beladung der HSA-NP ist unabhängig von der zur Beladung eingesetzten Menge an Loperamid und befindet sich im Bereich von 75 bis 85 µg/mg Nanopartikel. Die Menge von 3,3 mg Loperamid pro 20 mg Nanopartikel ist anscheinend ausreichend um ein Adsorptionsgleichgewicht und eine vollständige Beladung der Oberfläche zu erreichen.

#### 4.3.1.2 Beladung modifizierter Nanopartikel mit Loperamid

Die Beladung oberflächenmodifizierter Nanopartikel erfolgte analog der Beladung unmodifizierter HSA-NP. Da diese Zubereitungen zur Verwendung im Tier bestimmt waren, wurde eine einheitliche Konzentration von 0,7 mg/ml Loperamid angestrebt. Dies entspricht bei einer Dosis von 7,0 mg/kg Körpergewicht einer Injektion von 200,0 µl intravenös in die Schwanzvene bei einer 20,0 g schweren Maus. Die Beladung aller oberflächenmodifizierter Zubereitungen mit 7,0 mg Loperamid pro 20 mg Nanopartikel ergab eine durchschnittliche Beladungseffizienz von 21,3 ± 5,3%, was einer Konzentration von 0,75 ± 0,17 mg/ml entspricht. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Ergebnis unmodifizierter Nanopartikel und führt zu dem Schluss, dass die Modifikation der

Oberfläche der HSA-NP keinen Einfluss auf die Adsorption des Arzneistoffs Loperamid hat.

#### 4.3.2 Tail-Flick-Test mit Loperamid-beladenen Nanopartikeln

Die mit dem Arzneistoff Loperamid beladenen Nanopartikel wurden im Tail-Flick-Test gemäß Punkt 3.8.1.1 getestet. Für die hier untersuchten Zubereitungen wurde ausschließlich ApoE3 einer einzigen Charge aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Tikva Vogel (Abteilung Neurobiologie, Weizmann Institut der Wissenschaften, Rehovoth, Israel) verwendet. Alle Proben wurden i.v. in die Schwanzvene der Versuchsmäuse injiziert und die Schmerzempfindlichkeit der Tiere nach unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Mit Hilfe der Formel 1 wurde für jede Nanopartikelzubereitung und jeden Zeitpunkt der %-MPE berechnet und graphisch dargestellt.

#### 4.3.3 Versuchsreihe A

Die Versuchsreihe A umfasste die in Tabelle 12 aufgeführten Proben. Die Ergebnisse des Tail-Flick-Tests sind in Abbildung 14 dargestellt.

Tabelle 12 Zubereitungen Tail-Flick-Test Versuchsreihe A

1	ApoE3-PEG5000-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
2	ApoE3-PEG3400-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
3	ApoE3-NAV-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
4	HSA-NP + ApoE3-Lösung	Loperamid 7,0 mg/kg
5	HSA-NP	Loperamid 7,0 mg/kg
6	Lopermid-Lösung	Loperamid 7,0 mg/kg
7	ApoE3-PEG5000-NP	ohne Arzneistoff

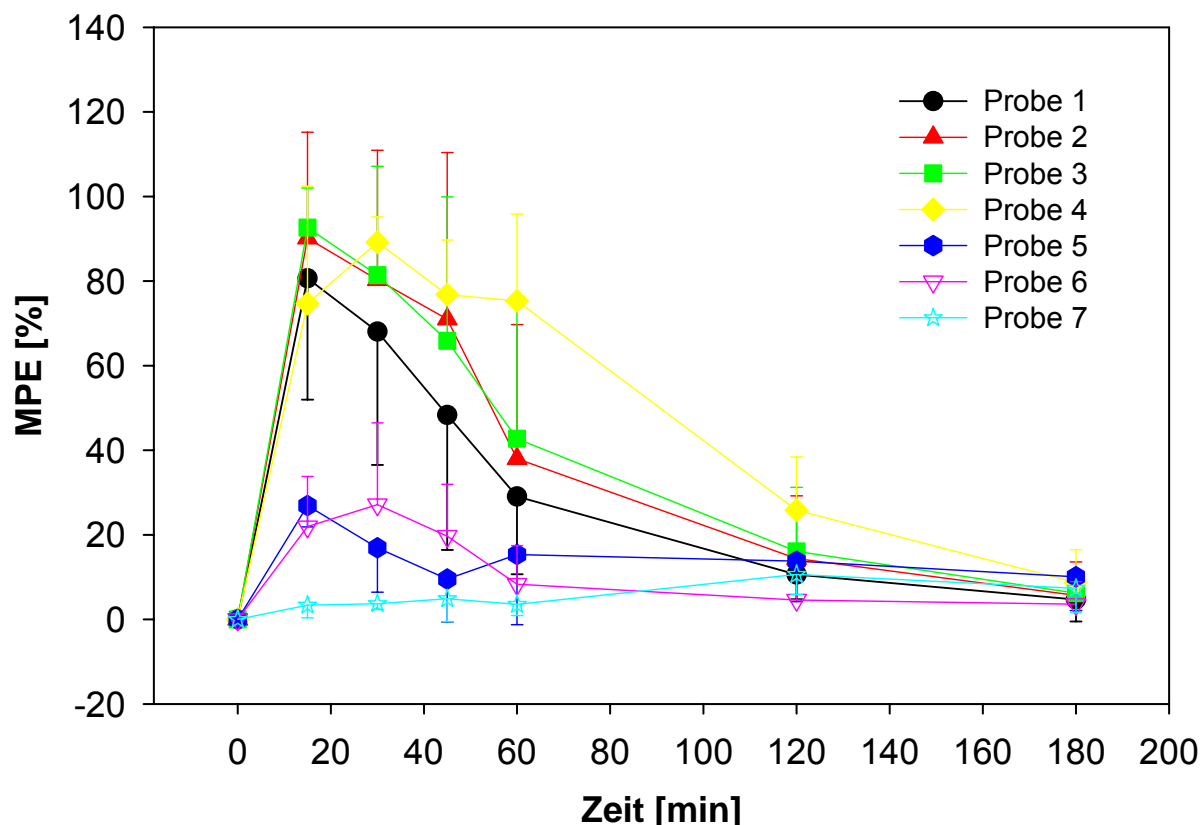


Abbildung 14 Tail-Flick-Test Versuchsreihe A: Probe 1: ApoE3-PEG5000-NP mit Loperamid 0,7 mg/kg, Probe 2: ApoE3-PEG3400-NP mit Loperamid 0,7 mg/kg, Probe 3: ApoE3-NAV-NP mit Loperamid 0,7 mg/kg, Probe 4: HSA-NP + ApoE3-Lsg mit Loperamid 0,7 mg/kg, Probe 5: HSA-NP mit Loperamid 0,7 mg/kg, Probe 6: Lopermid-Lsg mit Loperamid 0,7 mg/kg, Probe 7: ApoE3-PEG5000-NP ohne Arzneistoff, Messung der Schmerzempfindlichkeit mittels Tail-Flick-Test 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min nach Injektion, ( $n \geq 10$ ,  $\pm$  S.D.)

Der Tail-Flick-Test mit den Zubereitungen der Versuchsreihe A zeigte deutlich, dass alle Zubereitungen, die ApoE3 und den Arzneistoff Loperamid enthielten (Probe 1 bis 4), eine deutlich gesteigerte Reaktionszeit und somit einen analgetischen Effekt im Tiermodell hervorriefen. Hierbei war bereits direkt nach Injektion ein verändertes Verhalten der Tiere sichtbar. Die Tiere waren leicht sediert, weniger neugierig und von der Körperhaltung als „kugelig“ zu bezeichnen. Bei einigen Versuchstieren war der so genannte „Straub-Effekt“ erkennbar. Bei diesem Effekt kommt es zum senkrechten Aufstellen des Schwanzes von Nagern, wie Mäusen oder Ratten, unter Opiat-Einfluss (Holten, 1957).



Einen typischen Verlauf der analgetischen Wirkung zeigten Probe 2 und 3. Die %-MPE-Werte liegen bei beiden Versuchsgruppen nach 15 min bei über 90% und fallen nach 45 min nur geringfügig auf  $\geq 65\%$  ab. Erst nach 120 min ist kein Effekt ( $\text{\%-MPE} \leq 20\%$ ) bei den Versuchstieren mehr zu sehen. Ein ähnlicher Kurvenverlauf mit geringfügig niedrigeren %-MPE-Werten ist bei Probe 1 sichtbar. Auch hier ist nach 120 min kein Effekt bei den Versuchstieren mehr vorhanden.

Um zu untersuchen, ob die Art der Bindung des ApoE3 und die Länge des verwendeten Crosslinkers einen Einfluss auf den Transport von Loperamid über die BHS hat, wurden die Proben 1 bis 3 getestet. In Probe 1 wurde die kovalente Bindung des ApoE3 über einen NHS-PEG-MAL Crosslinker mit einem Molekulargewicht von 5000 Da, bei Probe 2 mit einem Molekulargewicht von 3400 Da durchgeführt. Der Vergleich zeigte geringfügig höhere %-MPE-Werte nach 15, 30, 45 und 60 min für Probe 2. Die Auswertung der Messwerte mittels t-Test zeigte allerdings, dass die Werte der beiden Proben nicht signifikant voneinander unterschieden werden können ( $p = 0,664$ ). Auch der Vergleich mit Probe 3, bei der die Bindung des ApoE3 über das NeutrAvidin/Biotin-System erfolgte, zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den ApoE3-PEG-NP ( $p \geq 0,634$ ). Folglich ist keine Differenzierung zwischen der direkten Bindung des Liganden an den Crosslinker und der Bindung über das NeutrAvidin/Biotin-System unter den gewählten Versuchsbedingungen möglich. Auch das Molekulargewicht der Crosslinker und damit der Abstand des ApoE3 zur Oberfläche der HSA-NP scheint keine Auswirkung auf die Wirksamkeit des Trägersystems zu haben. Ein Unterschied zwischen einem Molekulargewicht von 3400 Da, 5000 Da oder ein noch größerer Abstand über das NeutrAvidin/Biotin-System ( $5000 \text{ Da} + 60000 \text{ Da} = 65000 \text{ Da}$ ) war nicht erkennbar.

Ein überraschendes Ergebnis lieferte die Applikation von Loperamid-beladenen HSA-NP, die ungebundenes ApoE3 in der Zubereitung enthielten. Die ursprünglich als Kontrolle angedachte Probe 4 hatte einen %-MPE von 74% nach 15 min. Der antinociceptive Effekt

steigerte sich nach 30 min auf 89% und lag sogar nach 60 min immer noch bei 75%. Analog den Proben 1 bis 3 war der %-MPE nach 120 min auf ca. 20% gefallen. Dieses Resultat gibt Anlass zu Spekulationen. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich nach Zugabe des ApoE3 dieses in ausreichenden Mengen an die Oberfläche der Partikel adsorptiv anlagert, um ein aktives Drug-Targeting zu erreichen. Dies würde die Hypothese unterstützen, dass die Art der Bindung des Drug-Targeting-Liganden keine Auswirkung auf die Effizienz des Trägersystems hat. Eine weitere Möglichkeit ist, dass ApoE3 womöglich selbst einen Einfluss auf die BHS hat, was zu einer höheren Durchlässigkeit für die HSA-NP oder für den Arzneistoff führen könnte.

Alle weiteren Kontrollzubereitungen (Proben 5, 6, 7) erzielten das zu erwartende Ergebnis. Weder die Applikation einer Lösung des reinen Arzneistoffs (Probe 6) noch die von Loperamid-beladenen HSA-NP (Probe 5) zeigten einen Effekt im Tierversuch. Lediglich zu den Anfangszeitpunkten lagen die %-MPE-Werte leicht über 20%, nahmen in der nachfolgenden Messung aber wieder Werte unter 20% an. Ursache hierfür ist womöglich, dass die Messung der Reaktionszeit und Injektion der Zubereitungen beide am Schwanz der Maus erfolgten. Dies führt zu Irritationen in diesem Bereich und einer anfangs geringfügig erhöhten Schmerztoleranz. Folglich besteht keine signifikante Schmerzreduktion der Proben 5 und 6. Ein direkter analgetischer Effekt des Trägersystems ohne Arzneistoff konnte durch Injektion der Probe 7 ausgeschlossen werden.

Die Resultate der Versuchsreihe A zeigen, dass es mit ApoE3-modifizierten HSA-NP möglich ist den Arzneistoff Loperamid über die BHS zu transportieren. Hierbei spielt die Art der Bindung des ApoE3 an das Trägersystem nur eine untergeordnete Rolle in der Wirkung im Tail-Flick-Test. Die entsprechenden Kontrollzubereitungen zeigten keinen Effekt.

#### 4.3.4 Desorption von Loperamid

Eine immer wieder gestellt Frage in Zusammenhang mit der adsorptiven Beladung von Arzneistoffen, ist die Stabilität der Bindung während der Zirkulation des Trägersystems im Organismus. Aus diesem Grund wurden mit drei unterschiedlichen Mengen Loperamid-versetzte HSA-NP hergestellt und deren Beladung bestimmt (Punkt 4.3.1.1). Diese drei Nanopartikelspezies wurden in unterschiedlichen Medien (Wasser, 10% Serum, 90% Serum, 1% Tween 80) gemäß Punkt 3.3.5 für 15 und 120 min inkubiert (Tabelle 4) und der von der Oberfläche desorbierte Arzneistoffanteil in Prozent mittels HPLC bestimmt (Tabelle 14 und Tabelle 15).

Tabelle 13 Desorption von Loperamid: Inkubationsmedien der mit unterschiedlichen Mengen Loperamid versetzten HSA-NP

	<i>Bezeichnung</i>	<i>Inkubationsmedium</i>
<i>Loperamid NP 3,3 mg</i>	3,3/1	Wasser
	3,3/2	10% Serum
	3,3/3	90% Serum
	3,3/4	1% Tween 80
<i>Loperamid NP 6,6 mg</i>	6,6/1	Wasser
	6,6/2	10% Serum
	6,6/3	90% Serum
	6,6/4	1% Tween 80
<i>Loperamid NP 7,0 mg</i>	7,0/1	Wasser
	7,0/2	10% Serum
	7,0/3	90% Serum
	7,0/4	1% Tween 80

Tabelle 14 Desorption von Loperamid: Inkubationszeit 15 min (n = 3, ± S.D.)

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beladung vorher µg/mg NP</i>	<i>Beladung nachher µg/mg NP</i>	<i>desorbierter Anteil %</i>
3,3/1	74,3 ± 5,6	50,5 ± 1,9	32,1 ± 2,5
3,3/2	74,3 ± 5,6	37,8 ± 2,8	49,1 ± 3,8
3,3/3	74,3 ± 5,6	-2,5 ± 0,2	103,3 ± 0,3
3,3/4	74,3 ± 5,6	10,16 ± 3,3	86,3 ± 4,4
6,6/1	86,1 ± 17,2	53,7 ± 1,6	37,6 ± 1,8
6,6/2	86,1 ± 17,2	44,6 ± 0,9	48,2 ± 1,0
6,6/3	86,1 ± 17,2	-3,1 ± 1,7	103,5 ± 2,0
6,6/4	86,1 ± 17,2	13,8 ± 0,8	83,9 ± 0,9
7,0/1	108,8 ± 12,0	72,6 ± 1,3	33,3 ± 1,2
7,0/2	108,8 ± 12,0	66,9 ± 1,2	38,5 ± 1,1
7,0/3	108,8 ± 12,0	18,7 ± 5,0	82,8 ± 4,5
7,0/4	108,8 ± 12,0	35,32 ± 1,6	67,5 ± 1,4

Tabelle 15 Desorption von Loperamid: Inkubationszeit 120 min (n = 3, ± S.D.)

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beladung vorher µg/mg NP</i>	<i>Beladung nachher µg/mg NP</i>	<i>desorbiertes Anteil %</i>
3,3/1	66,9 ± 4,9	57,8 ± 0,5	17,7 ± 0,7
3,3/2	66,9 ± 4,9	39,2 ± 0,3	44,2 ± 0,4
3,3/3	66,9 ± 4,9	8,9 ± 7,2	87,2 ± 10,2
3,3/4	66,9 ± 4,9	19,8 ± 0,1	71,8 ± 0,1
6,6/1	64,3 ± 12,2	43,0 ± 1,1	33,0 ± 1,7
6,6/2	64,3 ± 12,2	26,8 ± 0,5	58,2 ± 0,7
6,6/3	64,3 ± 12,2	-2,8 ± 1,5	104,4 ± 2,4
6,6/4	64,3 ± 12,2	2,3 ± 0,8	96,4 ± 1,2
7,0/1	71,8 ± 7,1	46,9 ± 0,8	34,6 ± 1,1
7,0/2	71,8 ± 7,1	32,4 ± 0,5	54,9 ± 0,6
7,0/3	71,8 ± 7,1	-0,9 ± 2,4	101,2 ± 3,3
7,0/4	71,8 ± 7,1	5,6 ± 0,6	92,2 ± 0,86

In den Tabellen sind die absoluten Beladungen der für diesen Versuch eingesetzten Nanopartikel vor und nach der Inkubation, sowie die prozentuale Desorption des Arzneistoffs aufgelistet. Bei allen Proben war eine Desorption von Loperamid von der Partikeloberfläche zu beobachten. Der desorbierte Anteil war stark von dem verwendeten Inkubationsmedium abhängig. In Wasser erreichte die Desorption nach 15 min sowie nach 120 min Werte um die 30%. Drückt man diesen Wert als Konzentration des Arzneistoffs in dem Lösungsmittel aus, erhält man die theoretische Löslichkeit von Loperamid in Wasser (20 bis 30 µg/ml) (Rücker and Egerer, 2006). Höhere Desorptionswerte wurden bei der Inkubation mit Serum erreicht. Hier wurde der zuvor an die HSA-NP gebundene Anteil an Loperamid im Fall von 10% Serum um bis zu 49% nach 15 min und 58% nach 120 min reduziert. Eine nahezu vollständige Ablösung des Arzneistoffs war bei der Inkubation der Partikel mit 90%

Serum zu beobachten. Im Falle der Proben 3,3/3 15 min, 6,6/3 15 min, 6,6/3 120 min und 7,0/3 120 min betrug die Desorption 100%. Dies spricht für eine höhere Affinität von Loperamid zu den Serum-Bestandteilen als zu der Oberfläche des Trägersystems. Eine ebenfalls fast vollständige Desorption wurde bei der Inkubation mit 1% Tween 80 beobachtet. Dieser Effekt ist durch die lösungsvermittelnden Eigenschaften des Emulgators zu erklären. Loperamid kann durch Tween 80 in Mizellen solubilisiert werden, was dazu führt, dass das Adsorptionsgleichgewicht auf die Seite des freien Loperamids verschoben wird. Die Desorptionswerte lagen nach 120 min nur bei den Proben 6,6/4 und 7,0/4 geringfügig höher als nach 15 min, wohingegen die Werte bei 3,3/4 etwas geringer ausfielen. Eine Zeitabhängigkeit der Desorption von Loperamid war in den untersuchten Zeiträumen nicht zu sehen, was dafür spricht, dass die Desorption schon nach 15 min weitgehend abgeschlossen war. Eine kürzere Inkubationszeit war aus technischen Gründen nicht durchführbar.

### 4.3.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Desorption von Loperamid von der Nanopartikeloberfläche zeigten, dass die adsorptive Bindung des Arzneistoffs nicht sehr stabil ist. Besonders in der Gegenwart von Plasmaproteinen fand eine Umverteilung von Loperamid von der Partikeloberfläche an die Blutbestandteile statt. Dieses In-vitro-Resultat führte zu dem Schluss, dass auch in vivo der Arzneistoff nach i.v. Applikation von dem Trägersystem desorbiert wird. Dennoch war im Tail-Flick-Test ein Opioid- bzw. Loperamid-Effekt zu verzeichnen (Punkt 4.3.2). In den folgenden In-vivo-Versuchsreihen sollte nun untersucht werden, ob auch eine getrennte und zeitversetzte Applikation von Loperamid und ApoE3-NP oder einer ApoE3-Lösung einen analgetischen Effekt im Tiermodell zeigt.

#### 4.3.6 Tail-Flick-Test: Getrennte und zeitversetzte Applikation von ApoE3-NP oder ApoE3-Lösung und Loperamid

##### 4.3.6.1 Versuchsreihe B

In dieser Versuchsreihe sollte abgeklärt werden, ob eine getrennte und zeitversetzte Verabreichung von Loperamid und ApoE3-NP oder ApoE3-Lösung den Transport des Arzneistoffs über die BHS ermöglicht und wie groß der Zeitabstand zwischen Injektion der ApoE3-haltigen Zubereitung und Injektion einer Loperamid-Lösung maximal sein kann. Hierzu wurden zwei Versuchsgruppen angelegt:

Gruppe 1: Erste Injektion: ApoE3-NP

Zweite Injektion: nach 1/4 h, 1/2 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h  
Loperamid (7,0 mg/kg).

Gruppe 2: Erste Injektion: ApoE3-Lösung

Zweite Injektion: nach 1/4 h, 1/2 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h  
Loperamid (7,0 mg/kg).

Die Resultate des Tail-Flick-Tests beider Versuchsgruppen sind in Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt.

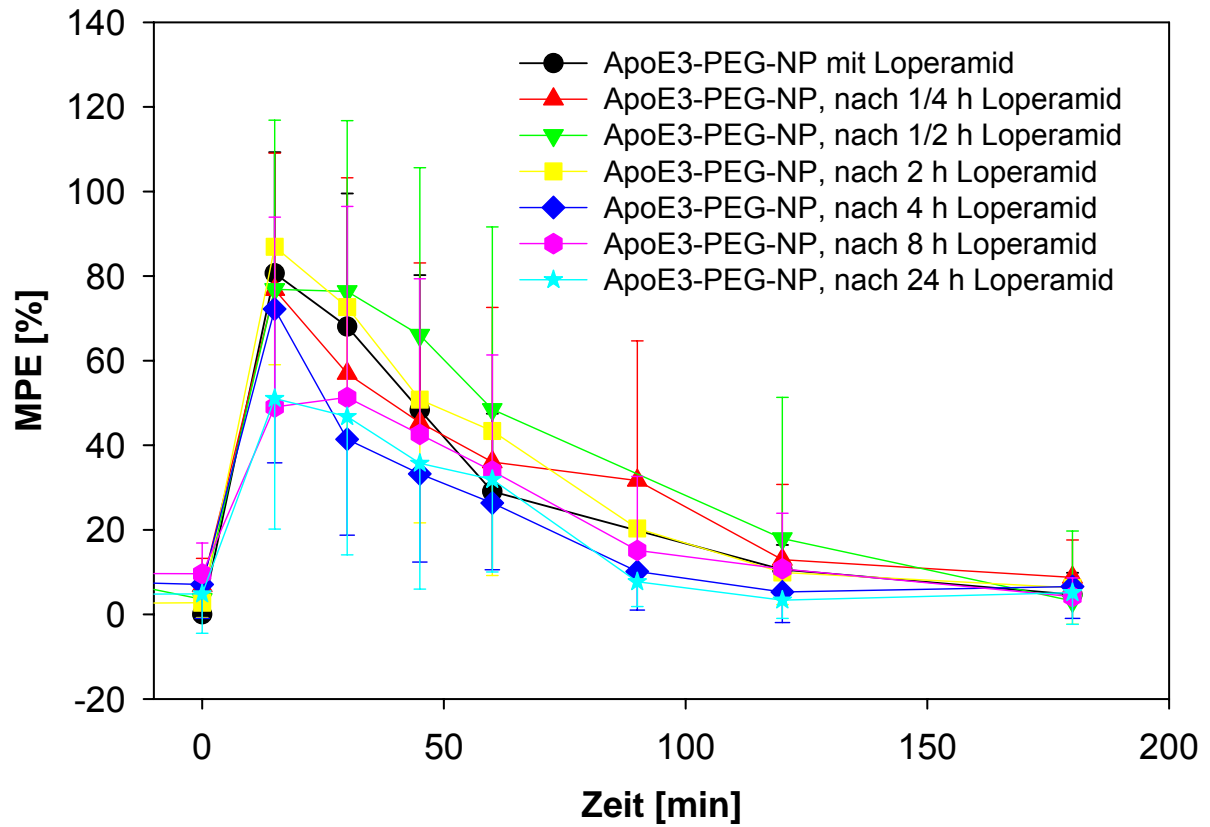


Abbildung 15 Tail-Flick-Test Versuchsreihe B, Gruppe 1: Erste Injektion: ApoE3-NP zweite Injektion: nach 1/4 h, 1/2 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h Loperamid (7,0 mg/kg), Messung der Schmerzempfindlichkeit mittels Tail-Flick-Test 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 min nach zweiter Injektion (n = 10, ± S.D.)



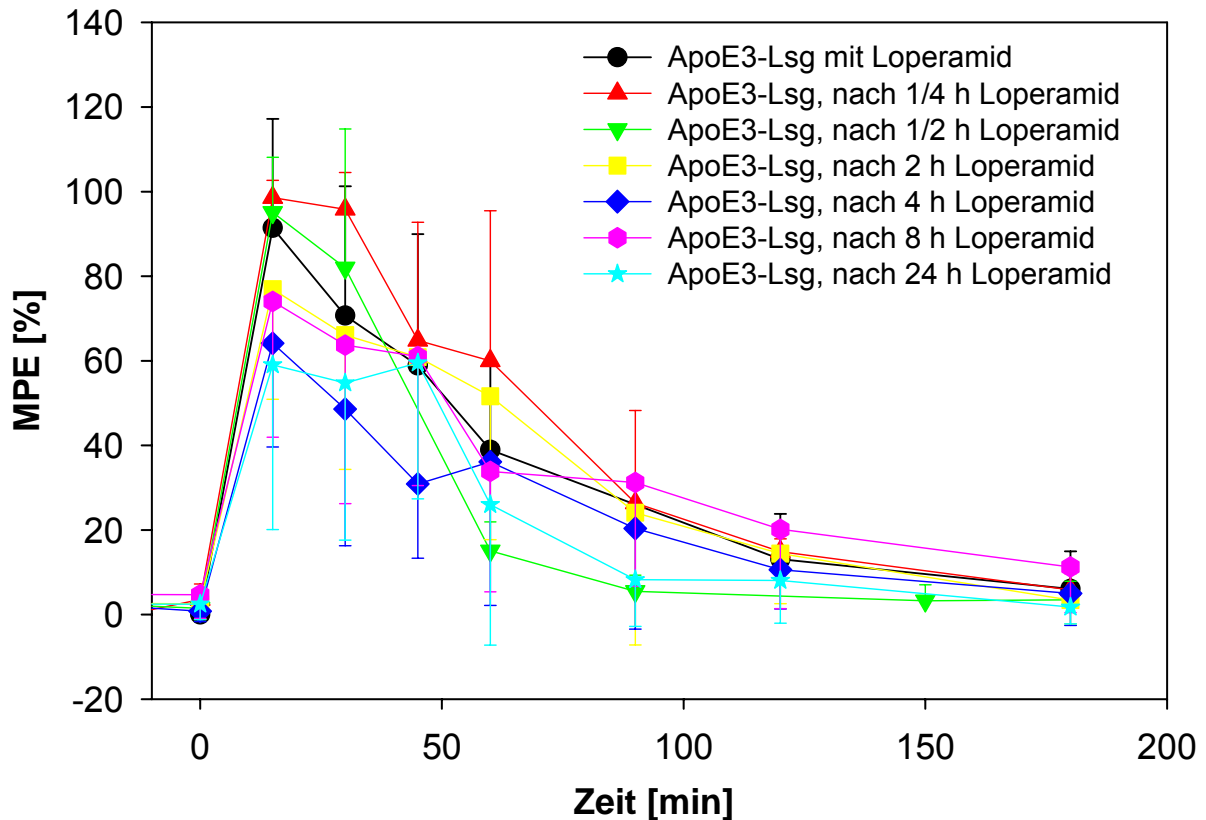


Abbildung 16 Tail-Flick-Test Versuchsreihe B Gruppe 2: Erste Injektion: ApoE3-Lösung  
 zweite Injektion: nach 1/4 h, 1/2 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h Loperamid  
 (7,0 mg/kg), Messung der Schmerzempfindlichkeit mittels Tail-Flick-Test  
 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 min nach zweiter Injektion  
 (n = 10, ± S.D.)

Die getrennte und zeitversetzte Applikation von ApoE3-NP und einer Loperamid-Lösung zeigte im Tail-Flick-Test einen deutlichen Effekt. Als positive Kontrolle wurden erneut ApoE3-NP mit adsorptiv gebundenem Loperamid verwendet. Ein Zeitversatz der Injektion der Nanopartikel zum Arzneistoff von 1/4 h, 1/2 h und 2 h ergaben ähnliche Verläufe mit %-MPE-Werten von  $\geq 75\%$  nach 15 min und einem Abfall auf 40 bis 50% nach 60 min. Wie in Versuchsreihe A hatte sich die Schmerzempfindlichkeit der Tiere nach 120 min mit Werten um die 10% wieder vollständig normalisiert. Gleiche Anfangswerte lieferte auch die zeitlich versetzte Injektion nach 4 h mit schmerzstillenden Effekten von 72% nach 15 min. Der Kurvenverlauf nahm allerdings, im Vergleich zu den Untersuchungen mit kürzeren Injektionsabständen, schneller ab. Die Injektion mit einem noch größerem Zeitabstand (8 h, 24 h) lieferte

%-MPE-Werte um die 50% nach 15 min mit einem Abfall auf  $\leq 33\%$  nach 60 min. Hier war bereits nach 90 min kein Effekt ( $\text{\%-MPE} \leq 15\%$ ) mehr zu sehen.

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Gruppe 2. Hierbei wurde auf die Nanopartikel verzichtet und freies ApoE3 zusammen mit Loperamid oder zeitlich versetzt Loperamid injiziert. Die direkte Gabe von freiem ApoE3 mit Arzneistoff als auch kurze Injektionsabstände von 1/4 h und 1/2 h ergaben %-MPE-Werte von 90 bis 98% zum Zeitpunkt 15 min mit einem vergleichbaren Kurvenverlauf. Der Trend zu geringfügig höheren %-MPE-Werten war bei einem Zeitversatz der Injektion des Arzneistoffs von 1/4 h zu sehen (95% nach 30 min, 60% nach 60 min). Im Vergleich hierzu fiel der antinociceptive Effekt bei einem Spritzabstand von 1/2 h bereits nach 60 min auf unter 20% ab. Die Versuchsgruppen mit höheren ApoE3-Loperamid-Zeitabständen (4 h, 8 h, 24 h) zeigten eine geringere analgetische Wirkung von 60 bis 74% zum Zeitpunkt 15 min und hielten sich bei der Zweitinjektion nach 8 h und 24 h bis zu einer Zeit von 60 min auf einem Plateau von 60%. Bei allen Zubereitungen war nach 120 min keine schmerzstillende Wirkung mehr erkennbar.

Die Untersuchungen der beiden Gruppen der Versuchsreihe B zeigte, dass eine getrennte und zeitversetzte Applikation des Modellarzneistoffs Loperamid zu ApoE3-NP oder ApoE3-Lösung eine analgetische Wirkung im Tiermodell erzielte. Bei beiden Gruppen war zu sehen, dass mit steigendem Injektionsabstand der ApoE3-haltigen Zubereitungen zum Arzneistoff der Anfangseffekt geringer ausfiel. Dennoch war nach 24 h Zeitversatz immer noch ein %-MPE von 50 bis 60% zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass es nicht unbedingt notwendig ist den Liganden oder den Arzneistoff an das Trägersystem zu binden bzw. dass gar kein Trägersystem für das Erzielen eines analgetischen Effektes im Tail-Flick-Test notwendig ist. Diese Versuchsreihe bestätigt die Annahme aus Punkt 4.3.5, dass Loperamid nach Injektion in den Organismus nicht mehr oder nur in geringen Mengen an das Trägersystem gebunden vorliegt. Dennoch bleibt die Frage offen, auf welche Weise

ApoE3-modifizierte Nanopartikel oder freies ApoE3 in der Lage sind, den Arzneistoff BHS-gängig zu machen. Eine Möglichkeit ist, dass Loperamid sich in genügend großen Mengen an die zirkulierenden ApoE3-PEG-NP oder das freie ApoE3 anlagert und somit eine rezeptorvermittelte Transzytose an der BHS stattfindet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das ApoE3 in den hier eingesetzten 1,5-fach höheren physiologischen Konzentrationen (Kostner and März, 2001) durch die Bindung an Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie an der BHS (Punkt 2.2.2.3) eine modulierende Wirkung auf diese Barriere haben könnte. Solche Wirkungen könnten durch Auslösen einer Signaltransduktionskaskade in den verantwortlichen Zellen in verschiedenen Effekten auf die BHS resultieren. Diskutiert werden kann in diesem Zusammenhang eine Öffnung der „Tight Junctions“ des Gehirnepithels (Punkt 2.1.2.2) oder eine Hemmung des für die Ausschleusung von Loperamid verantwortlichen aktiven Transporters Pgp (Punkt 2.1.2.4). Eine Modulation der BHS durch ApoE3 könnte zum Beispiel durch die Astrozyten erfolgen. Sie besitzen zahlreiche Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie wie den ApoER2 und sind an der Aufrechterhaltung der Integrität der BHS beteiligt (Ransom and Sontheimer, 1995; Gee and Keller, 2005). Beide Hypothesen würden zu einer Anreicherung des Opioids im Gehirn und somit zu dem typischen analgetischen Effekt führen.

Der Vergleich beider Gruppen zeigt, dass die Injektion einer ApoE3-Lösung anstelle von ApoE3-NP vor der Injektion des Arzneistoffs zu nicht signifikant höheren schmerzstillenden Effekten führte. Diese Effekte scheinen aber im Gegensatz zu der Injektion von ApoE3-PEG-NP schneller abzuflachen. Erklärt werden kann dies durch eine wahrscheinlich längere Zirkulationszeit der ApoE3-PEG-NP („Stealth Effekt“ siehe Punkt 2.2.1) im Vergleich zu reinem ApoE3. Dennoch sind nach 24 h noch genügend ApoE3-Moleküle bzw. ApoE3-PEG-NP im Blutstrom vorhanden um eine Überwindung der BHS zu gewährleisten.

#### 4.3.6.2 Versuchsreihe C

Mit dem Opiod-Rezeptor-Agonisten Loperamid konnte in den vorangegangenen Versuchsreihen gezeigt werden, dass der Arzneistoff in Kombination mit ApoE3 einen analgetisches Effekt im ZNS bewirkt. Um abzuklären, dass dieser Effekt über die Opioid-Rezeptoren vermittelt wird, wurde den Versuchstieren vor Injektion einer ApoE3-Lösung mit Loperamid der Opioid-Rezeptor-Antagonist Naloxon i.p. gespritzt. Tabelle 16 zeigt die getesteten Zubereitungen. Die Ergebnisse des durchgeführten Tail-Flick-Tests sind in Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 16 Zubereitungen Tail-Flick-Test Versuchsreihe C, Applikation einer Naloxon-Lösung vor Injektion von ApoE3-Lösung mit Loperamid 7,0 mg/kg

Probe 1	ApoE3-Lsg mit Loperamid 7,0 mg/kg	Positivkontrolle
Probe 2	Naloxon-Lösung 0,1 mg/kg i.p.	nach 10 min ApoE3-Lösung + Loperamid 7,0 mg/kg
Probe 3	Naloxon-Lösung 0,5 mg/kg i.p.	nach 30 min ApoE3-Lösung + Loperamid 7,0 mg/kg
Probe 4	Naloxon-Lösung 0,5 mg/kg i.p.	Negativkontrolle

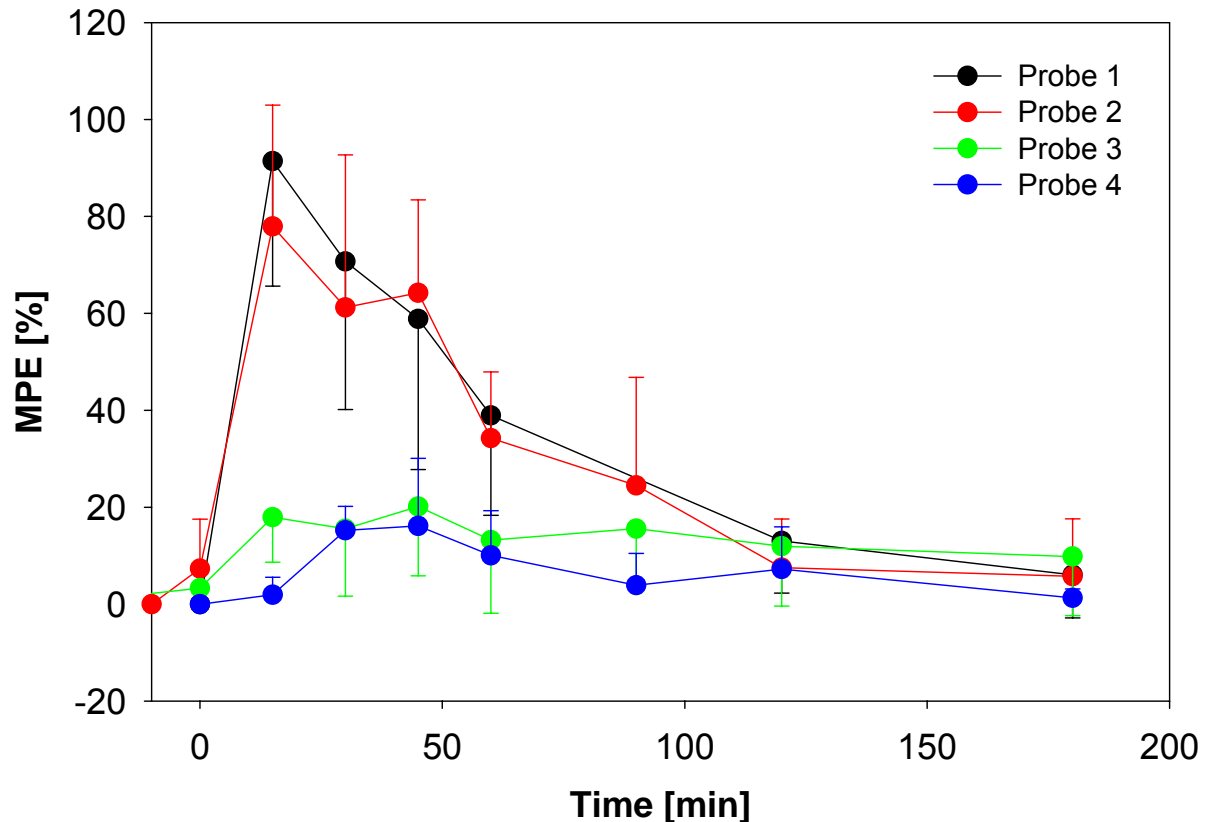


Abbildung 17 Tail-Flick-Test Versuchsreihe C: Applikation einer Naloxon-Lösung vor Injektion einer ApoE3-Lösung mit Loperamid (7,0 mg/kg), Probe 1: ApoE3-Lsg mit Loperamid (Positivkontrolle), Probe 2: Naloxon-Lsg 0,1 mg/kg i.p., nach 10 min ApoE3-Lsg mit Loperamid, Probe 3: Naloxon-Lsg 0,5 mg/kg i.p., nach 30 min ApoE3-Lsg mit Loperamid, Probe 4: Naloxon-Lsg 0,5 mg/kg i.p. (Negativkontrolle), Messung der Schmerzempfindlichkeit mittels Tail-Flick-Test 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 min nach zweiter Injektion (n = 10, ± S.D.)

Die i.v. Verabreichung der Positivkontrolle (Probe 1) lieferte die gewünschte schmerzstillende Wirkung, was sich in hohen %-MPE-Werten bis zu 60 min nach Injektion zeigte. Eine Applikation von 0,1 mg/kg Naloxon 10 min vor i.v. Injektion der Vollzubereitung senkte den analgetischen Effekt des Loperamids nicht signifikant, was sich in %-MPE-Werten von bis zu 77% nach 15 min äußerte. Gründe hierfür können der hohe First-Pass-Effekt und ein zu kurzes Zeitintervall für die Aufnahme von Naloxon nach i.p. Gabe gewesen sein (Kreutzmann and Langner, 2006). Bestätigt wurde diese Annahme durch Erhöhung der Dosis auf 0,5 mg/kg und Vergrößerung des Spritzabstandes auf 30 min. Nach

dieser Vorbehandlung der Versuchstiere erzielte eine Zubereitung von ApoE3 und Loperamid keinen antinociceptiven Effekt im Tail-Flick-Test mehr ( $\% \text{-MPE} \leq 20\%$ ). Auch die alleinige Gabe des Opioid-Antagonisten hatte keine Wirkung auf das Schmerzempfinden der Tiere.

Diese Versuchsreihe bestätigt die zentral-analgetische Wirkung von Loperamid in Kombination mit dem Apolipoprotein ApoE3. Die Wirkung wird durch Bindung an die Opioid-Rezeptoren im ZNS ausgelöst und ist vollständig durch Naloxon antagonisierbar.

#### **4.4 Doxorubicin-beladene Nanopartikel**

Die Bindung von antineoplastischen Arzneistoffen an kolloidale Drug-Delivery-Systeme wie z.B. Nanopartikel ist ein viel versprechender Fortschritt, um die Wirksamkeit von Zytostatika zu steigern und Nebenwirkungen zu minimieren. Das in dieser Arbeit verwendete Zytostatikum Doxorubicin wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten an verschiedene nanopartikuläre Trägersysteme aus unterschiedlichen Materialien gebunden, wie z.B. PBCA (Gulyaev et al., 1999; Steiniger et al., 2004), PIHCA (Cuvier et al., 1992), PLGA (Yoo et al., 1999) und Gelatine (Leo et al., 1997; Leo et al., 1999). Im Vergleich zu einer herkömmlich verwendeten Doxorubicin-Lösung zeigen solche Partikelsysteme mehrere Vorteile: So ist mit diesen nanopartikulären Formulierungen in einem Größenbereich von 100 bis 500 nm ein passives Tumor-Targeting durch den EPR-Effekt wie schon unter Punkt 2.2.1 beschrieben möglich (Maeda et al., 2000). Des Weiteren waren einige dieser mit Doxorubicin beladenen kolloidalen Trägersysteme in der Lage die Resistenz von Krebszellen zu überwinden. Im Fall von Barraud et al. konnten zum Beispiel Doxorubicin-beladene PIHCA-NP den  $IC_{50}$ -Wert des Zytostatikums bei der untersuchten HepaRG Zelllinie im Vergleich zu einer Lösung um den Faktor 4,5 senken (Barraud et al., 2005). Außerdem war es mit PBCA-NP, die mit dem Tensid Tween 80 überzogen waren, möglich, den Arzneistoff in das Gehirn von Tumor-tragenden Ratten einzuschleusen (Ambruosi et al., 2006) und eine Remission des Tumors bei mehr als 20%

der behandelten Tiere im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle zu erzielen (Steiniger et al., 2004).

Ziel dieser Arbeit war es nun die Vorteile von Nanopartikeln aus HSA (wie z.B. geringe Antigenität, Bioabbaubarkeit, einfache Herstellung) mit dem Zytostatikum Doxorubicin zu kombinieren und unter Verwendung des Drug-Targeting-Liganden ApoE3 eine Anreicherung des Arzneistoffs im Gehirn zu erreichen. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe unterschiedlicher Strategien beladene HSA-NP entwickelt und charakterisiert, um mit dem schon unter Punkt 2.2.2.1 beschriebenen Gehirn-Targeting-Prinzip eine chemotherapeutische Anwendung für die Behandlung von Glioblastom-tragenden Ratten zu erhalten.

#### 4.4.1 Adsorption von Doxorubicin an HSA

Doxorubicin ist ein schon lange eingesetztes, gut charakterisiertes Zytostatikum mit einer Plasmaproteinbindung von 79 bis 85% (Beck et al., 1982). Um eine spätere optimale Beladung der HSA-NP mit dem Arzneistoff zu gewährleisten, wurde zunächst die Adsorption von Doxorubicin an freies HSA untersucht und die maximal mögliche Bindung des Zytostatikums an das Protein bestimmt.

##### 4.4.1.1 Vorversuche

Wie schon unter Punkt 3.4.3.1 erwähnt, war es notwendig eine geeignete Methode zu finden um freies Doxorubicin von an HSA gebundenem Doxorubicin abzutrennen. Hierfür wurden spezielle Zentrifugenfilter mit einem Größenausschluss von 30 kDa verwendet, die im ersten Schritt auf Parameter wie unspezifische Adsorption des Arzneistoffs an die Filter und ihr Rückhaltevermögen für das Protein getestet werden mussten. Die Zentrifugation von verschiedenen Konzentrationen von Doxorubicin ergab, dass das Zytostatikum in allen Konzentrationsbereichen zu mindestens  $99,4 \pm 6,2\%$  im Ultrafiltrat enthalten war (Abbildung 18). Eine

unspezifische Adsorption des Arzneistoffs an die Filtermembran konnte somit ausgeschlossen werden. Der Nachweis des Proteins HSA im Ultrafiltrat mittels BCA-Assay verlief negativ und lag somit unterhalb der Nachweisgrenze ( $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ ). Der Filter erfüllte daher alle Anforderungen und konnte für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden.

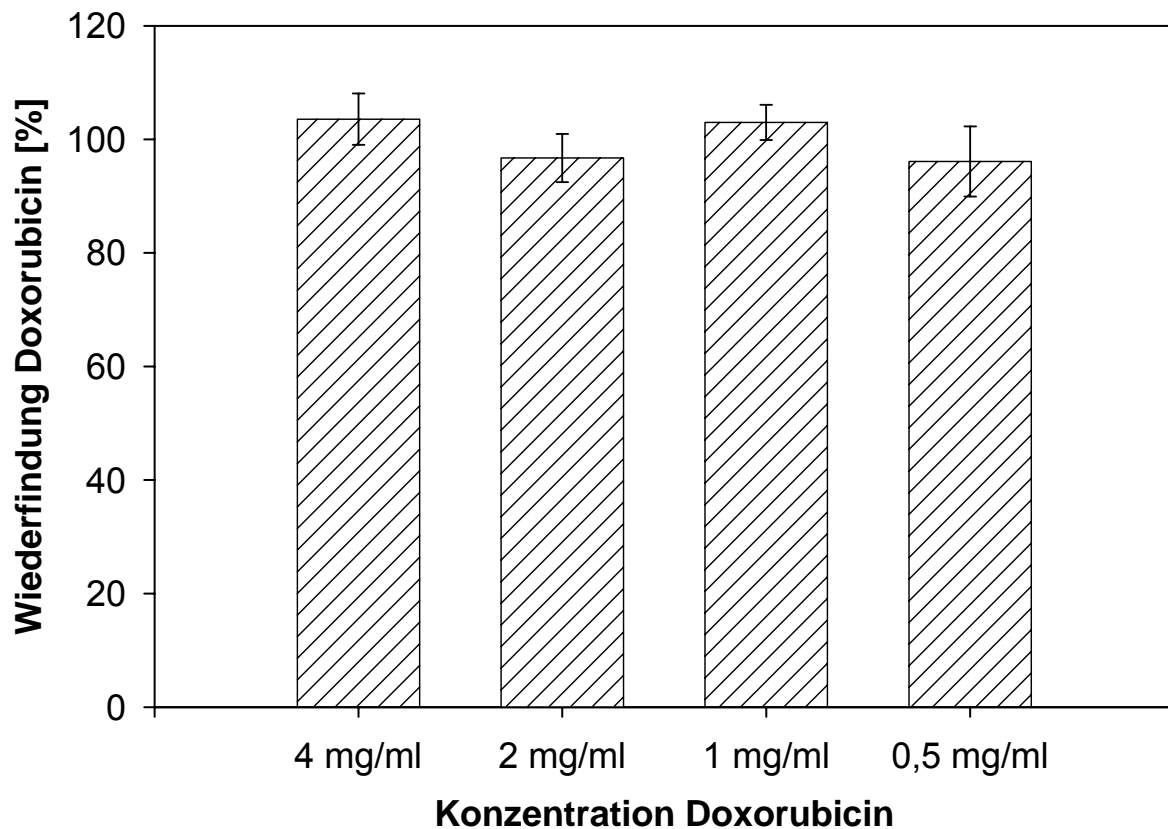


Abbildung 18 Wiederfindung von Doxorubicin im Ultrafiltrat der Amicon Ultrafree-MC Zentrifugenfilter (Größenausschluss 30 kDa) (n = 3,  $\pm$  S.D.)

#### 4.4.1.2 Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA

Die Inkubation von 0,25 bis 4,0 mg/ml Doxorubicin pro 20 mg/ml HSA für 2 h und die anschließende Abtrennung des nicht adsorbierten Anteils ergab, dass in dem Konzentrationsbereich von 0,25 bis 1,0 mg/ml mehr als 95% des Arzneistoffs an Albumin gebunden vorlag, wohingegen die Adsorption bei höheren Doxorubicin-Konzentrationen auf 75% abfiel (Abbildung 19). Basierend auf diesen Daten wurde eine Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an gelöstes HSA kalkuliert



(Abbildung 20) und an die Adsorptionsmodelle von Langmuir und Freundlich angepasst. Die beste Anpassung wurde durch Auftragen des Logarithmus der adsorbierten Menge Doxorubicin pro Masse HSA ( $\log D_{\text{Dxr}}/\text{HSA}$ ) gegen den Logarithmus der freien Doxorubicin-Konzentration ( $\log C_{\text{Dxr}}$ ) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98 erhalten (Abbildung 21). Dies legt den Schluss nahe, dass die Adsorption von Doxorubicin an HSA einer Anlagerung nach dem Modell von Freundlich entspricht (Freundlich, 1907). Die Anpassung an das Modell von Langmuir resultierte lediglich in einer Korrelation von 0,83.

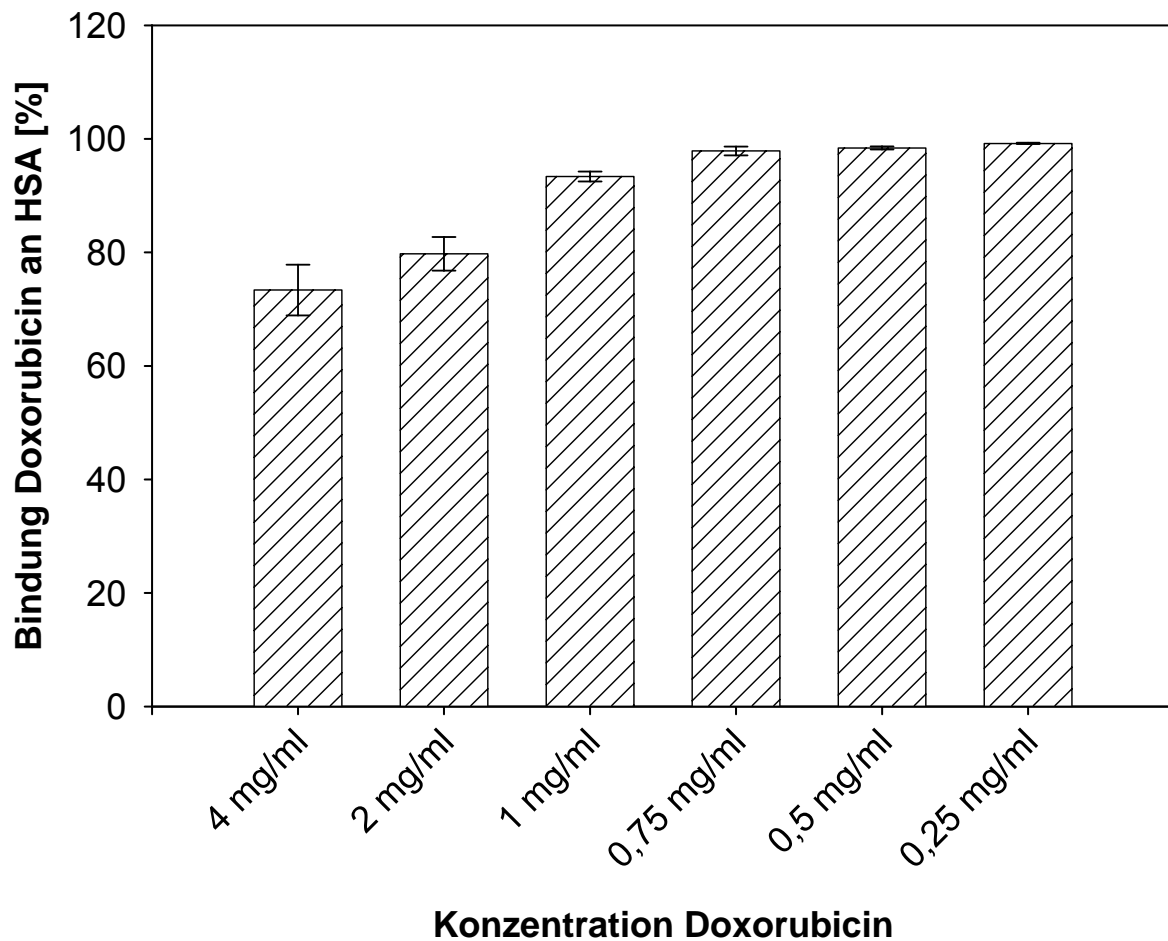


Abbildung 19 Prozentuale Bindung von Doxorubicin (0,25 – 4,0 mg/ml) an 20,0 mg/ml HSA ( $n = 3, \pm \text{S.D.}$ )

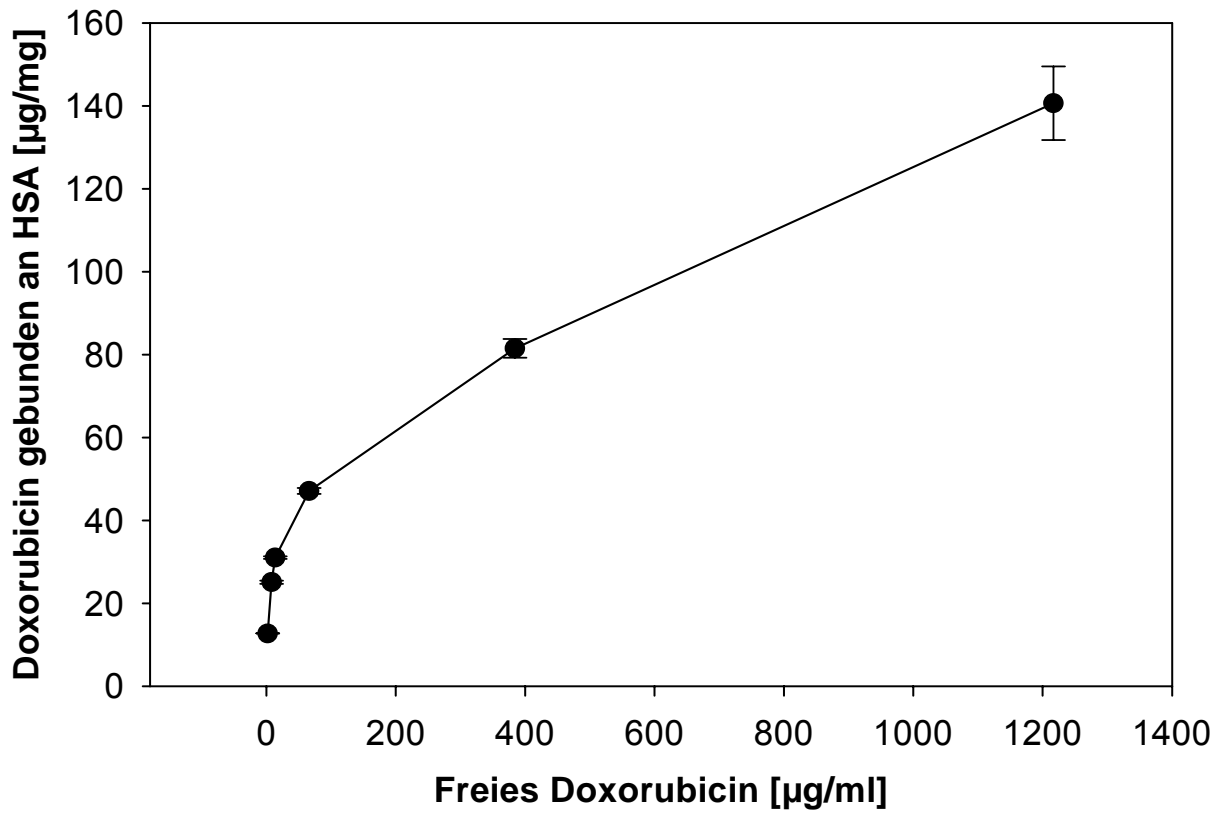


Abbildung 20 Adsorptionsisotherme von Doxorubicin an HSA (n = 3, ± S.D.)

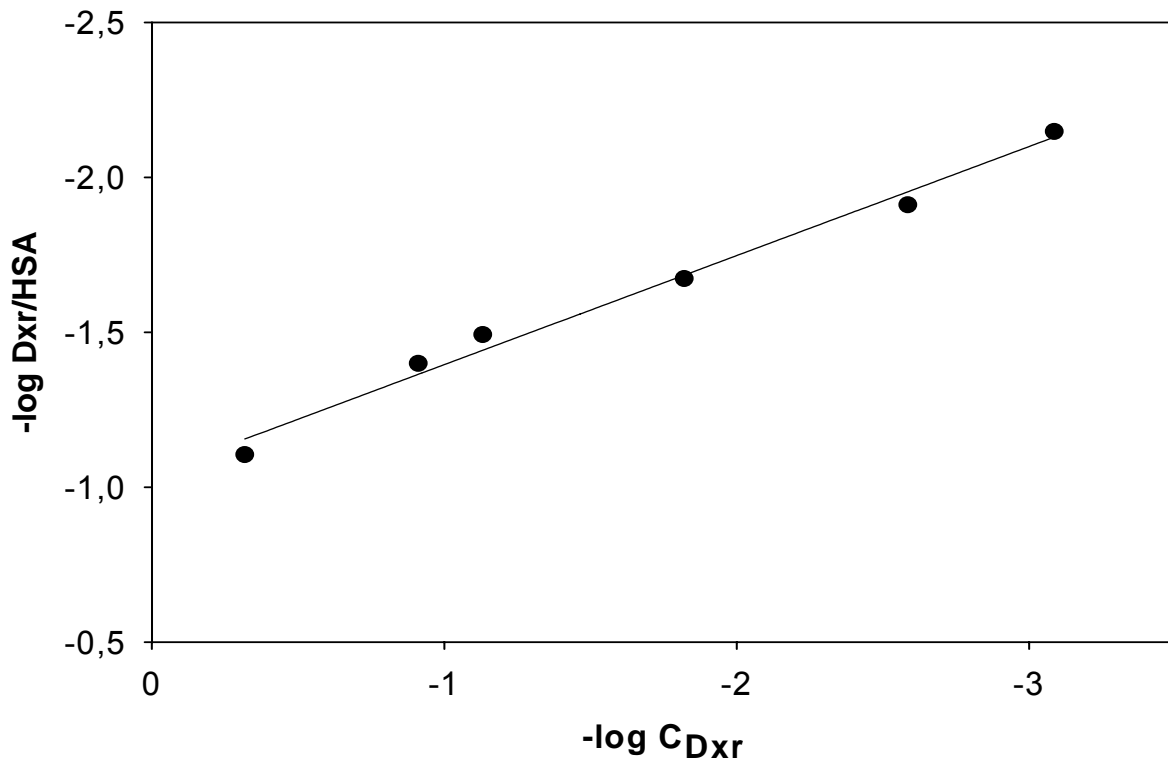


Abbildung 21 Lineare Anpassung der Messwerte aus Abbildung 20 an das Adsorptionsmodell von Freundlich

#### 4.4.2 Beladung der Nanopartikel

Die Beladung der Nanopartikel mit Arzneistoffen kann nach unterschiedlichen Strategien erfolgen:

1. Die direkte kovalente Bindung des Arzneistoffs an die Oberfläche der Partikel oder an das für die Partikel verwendete Polymer vor der Herstellung (Eatock et al., 1999)
2. Die Adsorption des Arzneistoffs an zuvor hergestellte Nanopartikel
3. Die Einbindung des Arzneistoffs in die Matrix des Trägersystems während der Herstellung

Die erste der drei Möglichkeiten führt zu einer vollständigen Veränderung des Arzneistoffs mit neuen physikochemischen Eigenschaften und neuem pharmakologischen Wirkprofil (Duncan, 2003). Dies war in dieser Arbeit nicht erwünscht, da lediglich ein neuer Anwendungsbereich für ein altbewährtes Zytostatikum gefunden werden sollte. Die Adsorption an das Trägersystem, wie es bereits in Punkt 4.3.1 für Loperamid durchgeführt wurde, birgt immer die Gefahr der Desorption oder Umverteilung des Arzneistoffs im biologischen System. Die bereits beschriebene Desorptionsstudie mit Loperamid bestätigt diese Befürchtungen (Punkt 4.3.4). Die aussichtsreichste Methode ist daher die Einbindung von Doxorubicin in die Partikelmatrix. Vorteil dieser Strategie ist, dass die pharmakologisch wirksame Substanz im Inneren der Matrix vor einem Abbau während der Lagerung oder einer schnellen Inaktivierung nach Injektion in den Organismus geschützt ist.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Doxorubicin sowohl adsorptiv an zuvor hergestellte Nanopartikel gebunden als auch während der Herstellung mittels Desolvationsmethode (Weber et al., 2000; Langer et al., 2003) in die Partikelmatrix eingebettet. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der so erhaltenen Doxorubicin-beladenen HSA-NP beschrieben.

### 4.4.2.1 Adsorption von Doxorubicin an die Oberfläche der Nanopartikel

Um die Adsorption von Doxorubicin an zuvor hergestellte Nanopartikel zu untersuchen, wurde eine konstante Menge HSA-NP mit unterschiedlichen Mengen Doxorubicin inkubiert. Wie Abbildung 22 zeigt, adsorbierte bei geringen Konzentrationen von 0,25 bis 0,0625 mg/ml Doxorubicin zu mehr als  $97,4 \pm 2,0\%$  an die Oberfläche der Nanopartikel. Dies entspricht einer Adsorption von  $12,4 \pm 0,1 \mu\text{g}$  bis  $48,7 \pm 1,0 \mu\text{g}$  Doxorubicin pro mg HSA-NP. Die Beladung nahm mit höheren Konzentrationen des Arzneistoffs stetig ab, bis sie  $69,0 \pm 6,8\%$  ( $138,0 \pm 9,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) für 1,0 mg/ml Doxorubicin erreichte. Die Anpassung dieser Daten resultierte in einer Freundlich-Isotherme mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9 (Langmuir;  $r = 0,61$ ). Die so beladenen Nanopartikel zeigten im Vergleich zu unbeladenen Nanopartikeln keine Veränderung der Größe. Das Zetapotential war mit einem Wert von  $-31,9 \pm 2,8 \text{ mV}$  geringfügig positiver als das von leeren HSA-NP ( $-48,0 \pm 2,6 \text{ mV}$ ). Dies spricht für eine leichte Abschirmung der Oberflächenladung durch den adsorptiv gebundenen Arzneistoff. Die bei den anschließenden Aufreinigungsschritten anfallenden zweiten und dritten Überstände zeigten, dass weniger als 2% des adsorbierten Doxorubicins bei jedem Waschschrift verloren ging. Auch die Untersuchung der Überstände nach 14tägiger Lagerung ergab keine deutliche Desorption des Zytostatikums von der Partikeloberfläche.

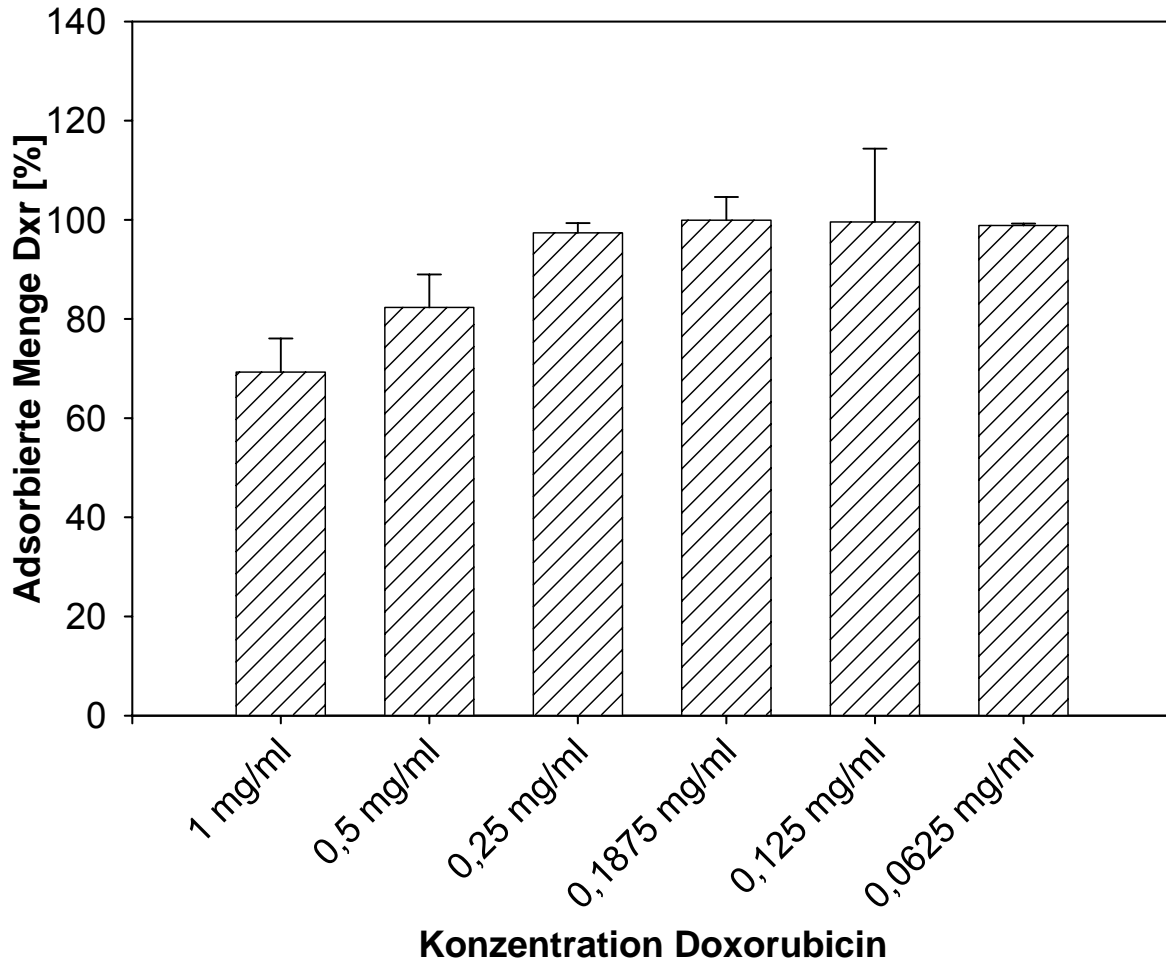


Abbildung 22 Prozentuale Adsorption von Doxorubicin an 5 mg/ml HSA-NP (n = 3, ± S.D.)

#### 4.4.2.2 Einbindung von Doxorubicin in die Partikelmatrix

Die Einbindung von Doxorubicin in die Partikelmatrix hat den Vorteil, dass der Arzneistoff im Inneren des Trägersystems vor äußeren Einflüssen geschützt vorliegt. Basierend auf den Ergebnissen der Adsorption von Doxorubicin an gelöstes HSA (Punkt 4.4.1.2) wurde der Arzneistoff zunächst für 2 h mit dem gelösten Protein inkubiert, dann die Nanopartikel mittels Desolvationsmethode hergestellt und anschließend mit unterschiedlichen Mengen Glutaraldehyd quervernetzt. Die Herstellung der so beladenen Nanopartikel erfolgte bei zwei unterschiedlichen pH-Werten mit vier verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen. Unter den gewählten Herstellungsbedingungen lag die prozentuale Einbindung des Doxorubicins

bei bis zu  $96,5 \pm 0,5\%$  beim Einsatz von  $0,5 \text{ mg/ml}$  Doxorubicin und nahm auf  $54,6 \pm 0,3\%$  bei  $4,0 \text{ mg/ml}$  ab. Die Herstellung der Partikel bei einem pH-Wert von  $6,5$  führte durchschnittlich zu einer  $7\%$  höheren Beladung als die Herstellung bei  $\text{pH } 8,2$  (Abbildung 23). Ein Grund hierfür kann die Konformationsänderung des HSA-Moleküls bei verschiedenen pH-Werten sein. Im neutralen pH-Bereich liegt das Protein in der N-Konformation vor, wechselt aber bei höheren pH-Werten zur B-Konformation (Carter and Ho, 1994). Es könnte daher sein, dass die B-Konformation eine etwas geringe Affinität zu Doxorubicin hat als die N-Konformation. Allerdings wurde diese Beobachtung bei hoher Doxorubicin-Konzentration ( $4,0 \text{ mg/ml}$ ) umgekehrt, was auf konzentrationsabhängige Arzneistoffeffekte, wie sie für einige Arzneistoffmoleküle bereits beobachtet wurden (Neault and Tajmir-Riahi, 1998; Purcell et al., 2000), hindeutet.

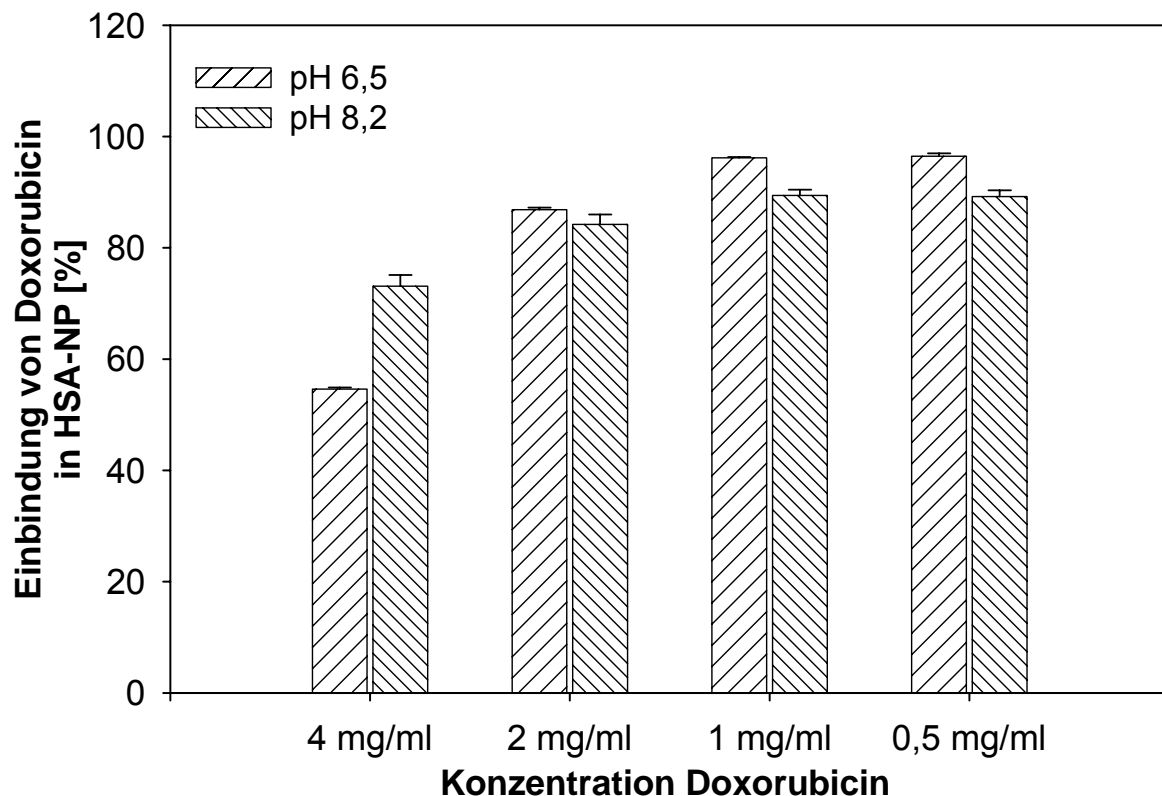


Abbildung 23 Prozentuale Einbindung von Doxorubicin in die Matrix von HSA-NP in Abhängigkeit von Arzneistoffkonzentration und pH-Wert ( $n = 3, \pm \text{S.D.}$ )

Der pH-Wert und die Doxorubicin-Konzentration beeinflussten nicht nur die prozentuale Beladung der Nanopartikel, sondern hatten auch einen Einfluss auf Größe und Polydispersität der Formulierungen (Abbildung 24). Monodisperse Partikel (Polydispersität  $\leq 0,1$ ) ergab die Herstellung mit niedrigen Doxorubicin-Konzentrationen von 0,5 und 1,0 mg/ml bei pH 6,5. Diese Dxr-NP hatten eine Größe von  $300 \pm 10$  nm. Die Partikelgröße nahm mit zunehmender Zytostatika-Konzentration und pH-Wert zu und erreichte für 4,0 mg/ml Doxorubicin Werte im Mikrometerbereich mit einer multimodalen Größenverteilung.

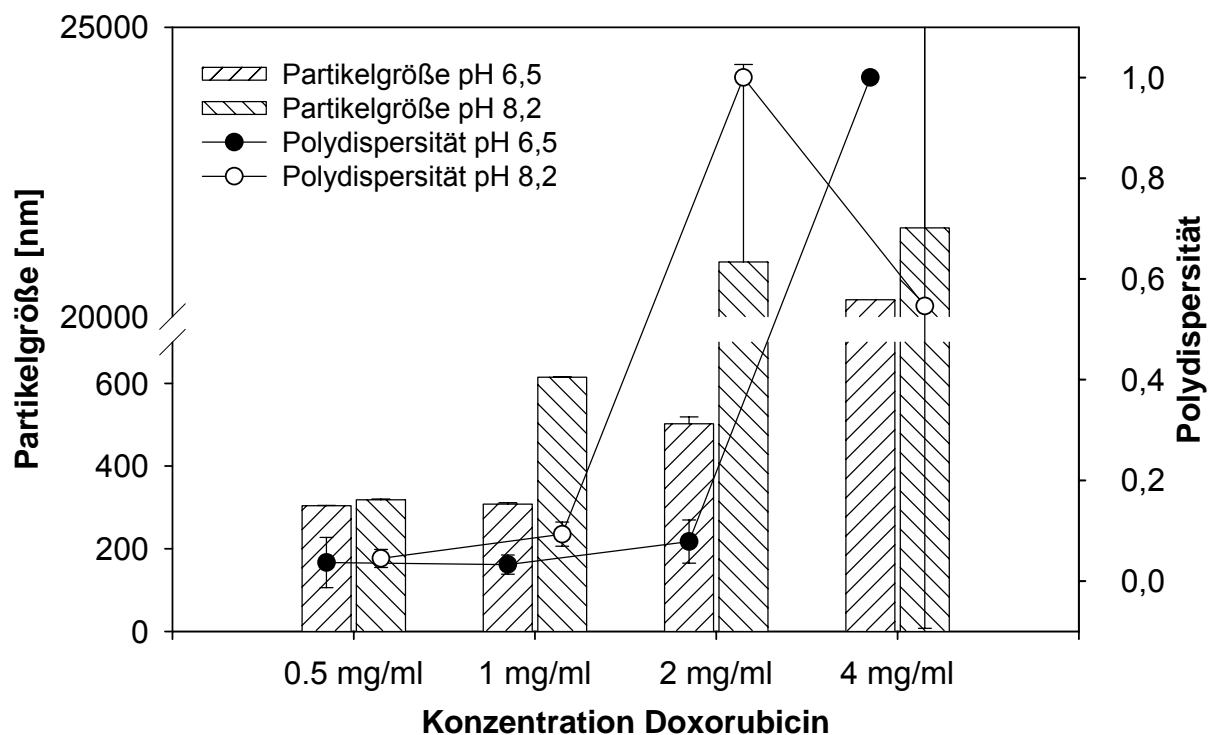


Abbildung 24 Einbindung von Doxorubicin in die Matrix von HSA-NP: Einfluss von Doxorubicin-Konzentration und pH-Wert auf die Partikelgröße und Polydispersität der erhaltenen Nanopartikel (n = 3,  $\pm$  S.D.)

Die in Abbildung 24 gezeigten Daten verdeutlichen, dass die Doxorubicin-Konzentration den Desolvationsprozess während der Nanopartikelherstellung stark beeinflusst. Das hier eingesetzte Doxorubicinhydrochlorid dissoziiert in wässriger Lösung in die positiv geladene Anthracyclin-Struktur und das negativ geladene Chlorid-Ion. Ionische Verbindungen wie Salze zeigten bereits in vorangegangenen

Experimenten einen Einfluss auf die Partikelbildung (Langer et al., 2003). Aufgrund der Abschirmung der Oberfläche der HSA-Moleküle durch die in der Lösung enthaltenen Ionen und eine daraus resultierende verringerte Abstoßung der HSA-Moleküle bei der Desolvatation nimmt die Partikelgröße zu. In den weiteren Experimenten wurden daher, um bei maximaler Einbindung möglichst kleine Nanopartikel zu erreichen, Dxr-NP mit 0,5 und 1,0 mg/ml Doxorubicin in Kombination mit 20 mg/ml HSA bei einem pH-Wert von 6,5 hergestellt.

Ein weiterer wichtiger Parameter in der Nanopartikelherstellung ist die Verwendung unterschiedlicher Mengen an Glutaraldehyd zur Stabilisierung. In Abbildung 25 ist die prozentuale und absolute Einbindung von Doxorubicin (1,0 mg/ml), in Abhängigkeit von der verwendeten Glutaraldehyd-Menge 50, 75, 100 und 200% bezogen auf die vorhandenen freien  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins im HSA-Molekül, dargestellt. Die höchste Einbindung von  $96,3 \pm 1,2\%$ , was einer absoluten Einbindung von  $48,2 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$  entspricht, wurde mit 200% quervernetzten Nanopartikeln erzielt. Im Fall von 50% Glutaraldehyd lag die Beladung nur bei  $67,6 \pm 1,8\%$  ( $34,0 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Dies bestätigt die Hypothese, dass höhere Konzentrationen an Quervernetzer zu einer kompakteren Nanopartikelmatrix mit kleineren Poren führen. Alle so hergestellten Dxr-NP hatten eine Größe von  $404 \pm 14 \text{ nm}$  und ein Zetapotential von  $-56,1 \pm 1,4 \text{ mV}$  (Abbildung 26). Eine weitere Erklärung für den Einfluss der Glutaraldehyd-Konzentration auf die prozentuale Einbindung des Arzneistoffs könnte die kovalente Bindung von Doxorubicin an das Matrixprotein über den Glutaraldehyd sein. Bereits in der Arbeit von Leo et al. wurde gezeigt, dass bei der Herstellung von Doxorubicin-beladenen Gelatine-Nanopartikeln bis zu 70% des Arzneistoffs kovalent über den Glutaraldehyd gebunden wurden (Leo et al., 1997). Ganz auszuschließen ist dies nicht für die hier hergestellten Dxr-NP, allerdings fällt bei näherer Betrachtung auf, dass in der Arbeit von Leo et al. ein um den Faktor 10000 ungünstigeres Verhältnis von Amino-Gruppen des Proteins zu den Amino-Gruppen des Doxorubicins besteht und ein Überschuss von Glutaraldehyd von bis zu 11000% eingesetzt wurde.



Deshalb kann für das hier entwickelte System die kovalente Bindung des Zytostatikums an das Matrixprotein über Glutaraldehyd weitgehend ausgeschlossen werden.

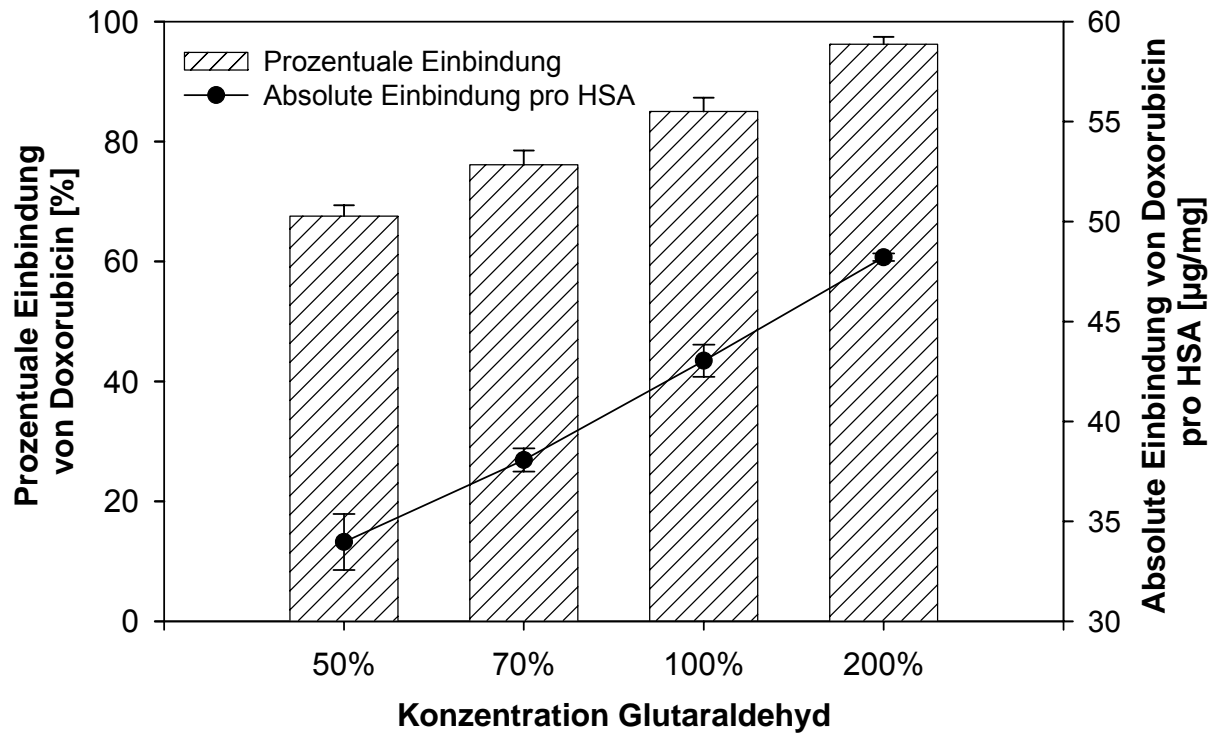


Abbildung 25 Einbindung von Doxorubicin in die Matrix von HSA-NP: Prozentuale und absolute Einbindung von Doxorubicin in Anhängigkeit der verwendeten Glutaraldehyd-Menge zur Nanopartikelstabilisierung (n = 6, ± S.D.)

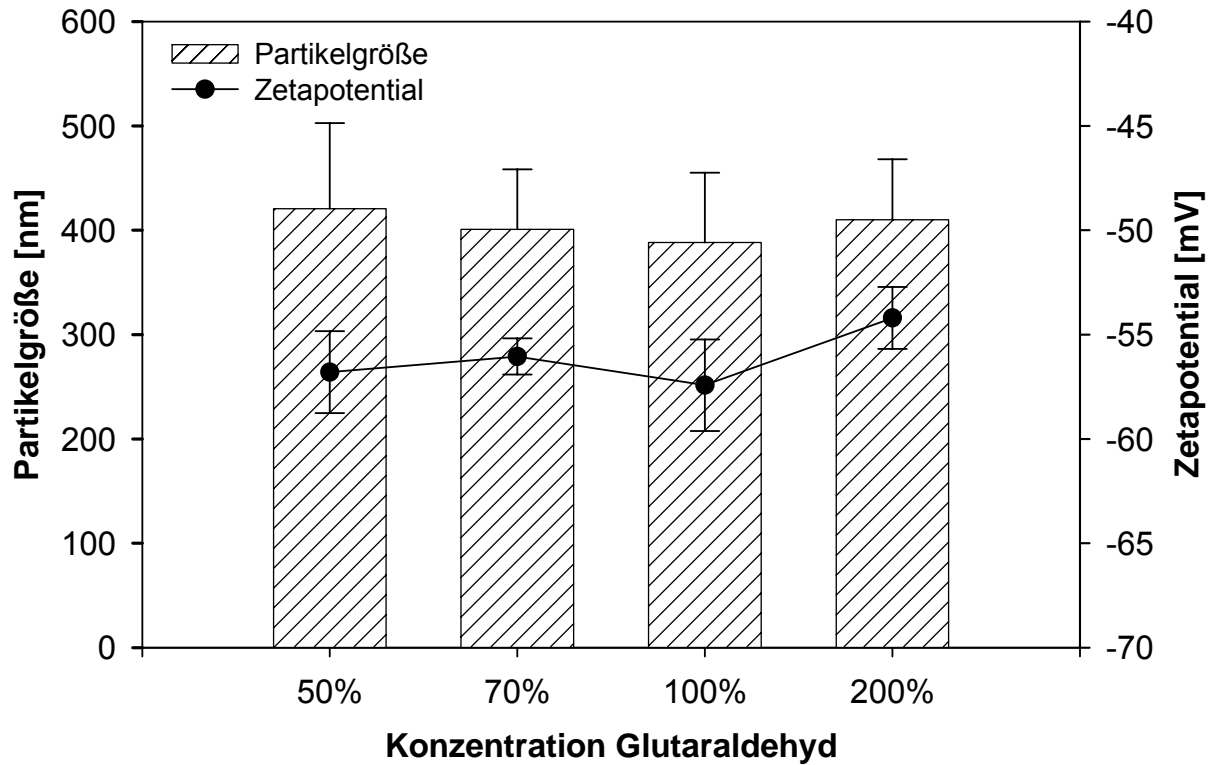


Abbildung 26 Einbindung von Doxorubicin in die Matrix von HSA-NP: Einfluss der verwendeten Glutaraldehyd-Menge zur Nanopartikelstabilisierung auf die Partikelgröße und das Zetapotential der erhaltenen Dxr-NP (n = 6, ± S.D.)

#### 4.4.2.2.1 Freisetzung von Nanopartikeln mit eingebundenem Doxorubicin

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden wie stabil das Zytostatikum Doxorubicin in die Matrix der Nanopartikel eingebunden ist. Hierfür wurden Dxr-NP mit 1,0 mg Doxorubicin pro 20,0 mg HSA mit einer Quervernetzung von 100% hergestellt und die Freisetzung des Arzneistoffs in 0,9% NaCl-Lösung nach verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Dxr-NP hatten eine absolute Beladung von 44,2 µg/mg und eine Größe von 433 nm. In Abbildung 27 sind die prozentuale Freisetzung und die Abnahme der absoluten Beladung der Nanopartikel aufgetragen.

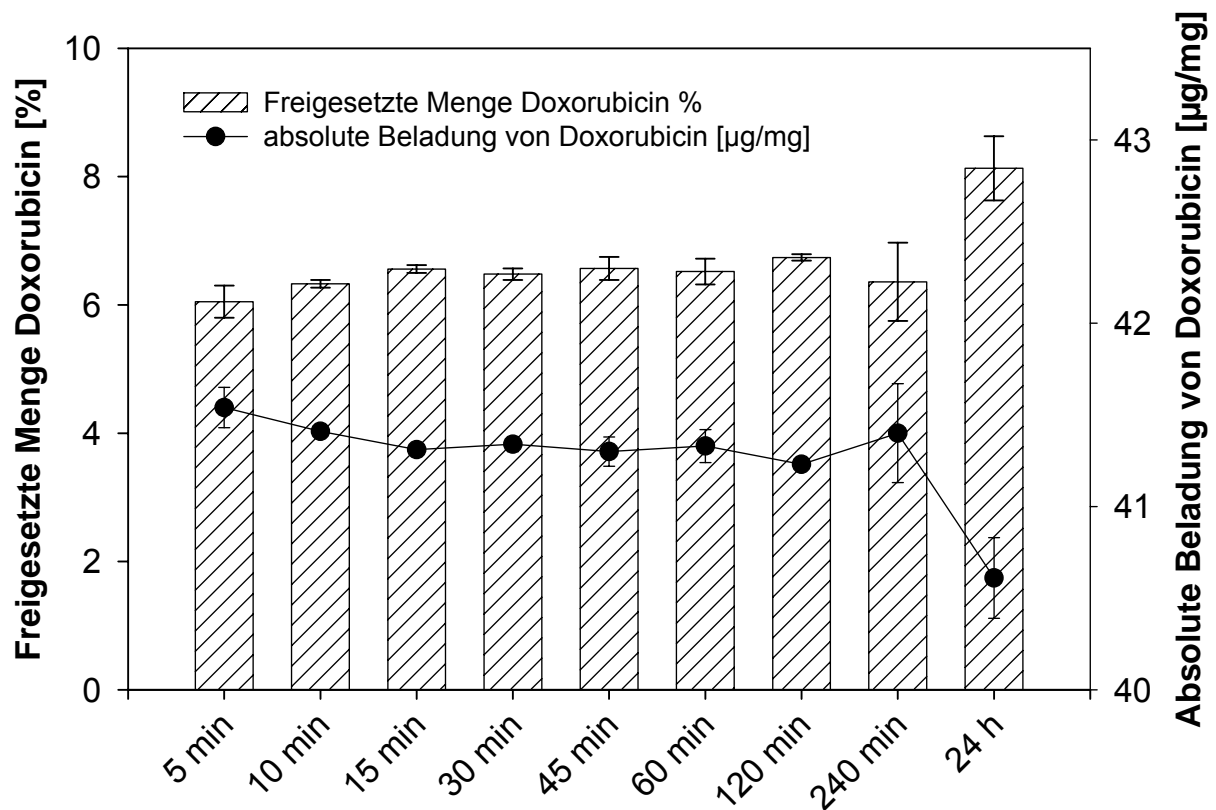


Abbildung 27 Einbindung von Doxorubicin in die Matrix von HSA-NP: Prozentuale Freisetzung und Abnahme der absoluten Beladung der Nanopartikel mit eingebundenem Doxorubicin (1,0 mg Dxr pro 20,0 mg HSA, 100% Glutaraldehyd) (n = 3,  $\pm$  S.D.)

Die Freisetzung der Dxr-NP betrug nach Inkubation für 5 min  $6,05 \pm 0,25\%$  was in einer Beladung von  $41,5 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{mg}$  resultierte. Während der ersten 240 min war keine Erhöhung der freigesetzten Menge an Doxorubicin und damit eine Abnahme der Beladung zu beobachten. Erst die Analyse der Überstände nach Inkubation für 24 h zeigte eine leicht erhöhte Freisetzung von  $8,1 \pm 0,5\%$  bzw. eine Abnahme der absoluten Beladung auf  $40,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Auch die Untersuchung von Dxr-NP nach Lagerung für 3 Wochen zeigte keine höhere Freisetzung.

Die Ergebnisse in Abbildung 27 machen deutlich, dass der Arzneistoff Doxorubicin sehr stabil in die Partikelmatrix eingebunden ist. Selbst nach Inkubationszeiten von 24 h wird weniger als  $4,0 \mu\text{g}$  Zytostatikum pro mg Nanopartikel freigesetzt. Einerseits ist dies positiv für die Lagerstabilität der Formulierungen zu bewerten, da der Arzneistoff über einen längeren

Zeitraum in Wasser oder isotonischer Kochsalzlösung nicht das Trägersystem verlässt. Kritisch zu sehen sind diese Ergebnisse allerdings in Bezug auf die Freisetzung des Arzneistoffs im biologischen System. Eine zu hohe und feste Einbindung von Doxorubicin kann zu einer unzureichenden Freisetzung am Wirkort und folglich zu einem Ausbleiben des therapeutischen Erfolgs führen.

### 4.4.2.2.2 Langzeitstabilität von Doxorubicin-inkorporierten HSA-NP

Wässrige Nanopartikeldispersionen mit eingebundenem Doxorubicin wurden bis zu 1,5 Jahren bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um die Stabilität dieses Zytostatika-Trägersystems in Bezug auf Größe und Polydispersität unter den gewählten Bedingungen zu untersuchen.

Nach einer Woche Lagerung zeigten die Partikel ein rotes einheitliches Sediment, welches leicht durch kurzes Schütteln redispergiert werden konnte. Während einem Zeitintervall von 21 Tagen verringerte sich die Partikelgröße von anfänglich 422 nm auf 374 nm mit monomodaler Größenverteilung, nahm aber mit zunehmender Lagerzeit wieder auf 447 nm mit einer leicht erhöhten Polydispersität von 0,2 nach 6 Monaten zu. Erst ab einer Lagerdauer von mehr als einem Jahr waren die Partikel nur noch schwer durch Schütteln zu redispergieren und hatten eine Größe von 555 nm nach genau einem Jahr bis hin zu fast 1,0 µm nach 1,5 Jahren mit multimodaler Verteilung. Daraus folgt, dass eine Langzeitlagerung von Dxr-NP unter den gewählten Bedingungen nicht möglich ist. Ein Ansatz dies zu verbessern ist eine Gefriertrocknung des Trägersystems mit geeigneten Kryoprotektoren.

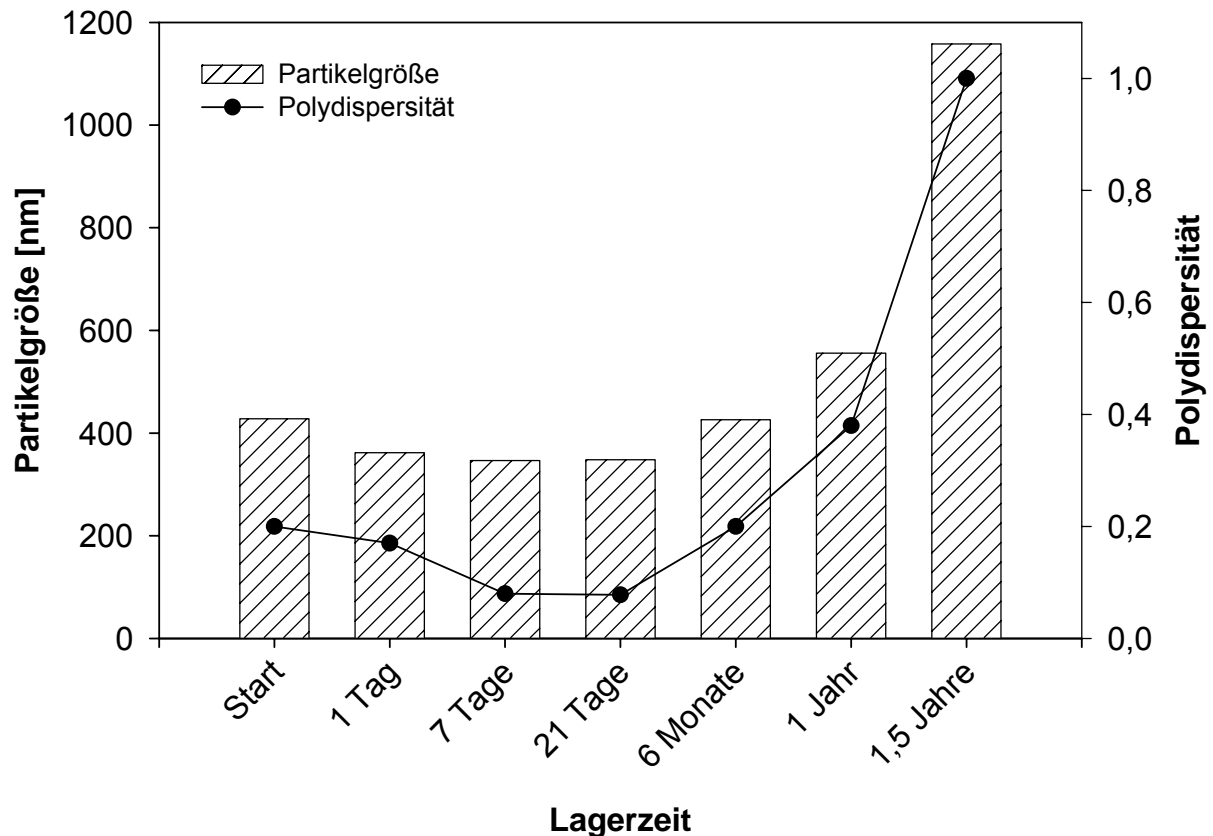


Abbildung 28 Einbindung von Doxorubicin in die Matrix von HSA-NP: Einfluss der Lagerzeit auf die Größe und Polydispersität der Dxr-NP

#### 4.4.3 In-vitro-Testung der Dxr-NP mittels Zell-Viabilitäts-Assay

Wie schon unter Punkt 3.6.1 beschrieben, sollte in diesem Versuch getestet werden, welchen Effekt verschiedene Doxorubicin-Formulierungen auf die Viabilität zweier Neuroblastom-Zelllinien (UKF-NB3, IMR-32) haben bzw. ob das an die Nanopartikel gebundene Zytostatikum noch seine volle antiproliferative Wirkung hat. Hierzu wurden Nanopartikel mit adsorptiv gebundenem Doxorubicin (Formulierungen A und B) ebenso wie Nanopartikel mit in die Matrix eingebundenem Arzneistoff (Formulierungen C und D) und eine Doxorubicin-Lösung in der Zellkultur getestet. Für die adsorptive Bindung wurden 5,0 mg/ml HSA-NP mit 0,125 mg/ml (Formulierung A) bzw. 0,250 mg/ml (Formulierung B) Doxorubicin inkubiert, was zu einer Beladung der hier verwendeten Zubereitungen von  $24,6 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$  und  $49,7 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$  führte. Für die Einbindung des

Zytostatikums in die Partikelmatrix wurden 20,0 mg/ml HSA mit 0,5 mg/ml (Formulierung C) bzw. 1,0 mg/ml Doxorubicin (Formulierung D) kombiniert und mit der Desolvationsmethode Nanopartikel hergestellt. Zur Stabilisierung wurden Glutaraldehyd-Mengen, die einer Quervernetzung von 50% bis 200% entsprechen, verwendet. Hier lag die absolute Einbindung für die Formulierung C zwischen  $17,1 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  und  $24,3 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  und für die Formulierung D zwischen  $33,5 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$  und  $48,4 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Die erhaltenen Partikel wurden vor Inkubation in Zellkultur mit dem Zellkulturmedium auf zuvor festgelegte Konzentrationen verdünnt.

Die verschiedenen Formulierungen wurden in der Zellkultur an zwei unterschiedlichen Neuroblastom-Zelllinien untersucht. Hierfür wurde, wie unter Punkt 3.7.2 beschrieben, ein Zell-Viabilitäts-Assay verwendet, bei dem der zu den Zellen hinzugegebene gelbe Farbstoff MTT durch mitochondriale Reduktasen lebender Zellen in das violette Formazan umgewandelt wird. Je stärker die violette Färbung, desto mehr lebende Zellen sind vorhanden und desto weniger hemmt die untersuchte Formulierung die Viabilität der Zellen. In den folgenden Punkten ist der Einfluss der verschiedenen Formulierungen auf die jeweilige Zelllinie dargestellt. Als vergleichbarer Parameter wurde für jede Zubereitung und jede Zelllinie der  $\text{IC}_{50}$ -Wert in ng/ml rechnerisch ermittelt.

### 4.4.3.1 UKF-NB3-Zelllinie

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Versuche mit UKF-NB3-Zellen dargestellt. Nanopartikel mit einer höheren Beladung an Doxorubicin (Formulierung D) zeigten einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1,96 \pm 0,94 \text{ ng}/\text{ml}$  bis  $2,65 \pm 1,55 \text{ ng}/\text{ml}$  für den eingebundenen Arzneistoff. Bei den Proben mit adsorptiv gebundenem Doxorubicin (Formulierungen A, B) betragen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte  $1,58 \pm 0,66 \text{ ng}/\text{ml}$  bis  $2,28 \pm 0,02 \text{ ng}/\text{ml}$ . Im Vergleich hierzu zeigte eine Doxorubicin-Vergleichslösung einen höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $5,22 \pm 2,66 \text{ ng}/\text{ml}$ . Des Weiteren war der Trend zu erkennen, dass mit steigenden Konzentrationen des Quervernetzers die  $\text{IC}_{50}$ -Werte ebenfalls

leicht anstiegen. Für die Zubereitungen der Formulierung C, die mit einer geringeren Menge Doxorubicin beladen wurden, ist deutlich zu sehen, dass die  $IC_{50}$ -Werte mit 50% ( $IC_{50} = 2,94 \pm 1,38$  ng/ml) bis hin zu mit 200% Glutaraldehyd quervernetzten Nanopartikeln ( $IC_{50} = 4,65 \pm 3,37$  ng/ml) zunahm. Folglich nimmt die intrazelluläre Freisetzung des Arzneistoffs mit zunehmender Menge Glutaraldehyd ab. Daher scheint eine schwächere Stabilisierung der Partikel im Hinblick auf die Wirksamkeit in Zellkultur vorteilhaft zu sein. Beim näheren Betrachten der Beladung der Dxr-NP konnte festgestellt werden, dass generell eine höhere Beladung der Nanopartikel mit Doxorubicin zu niedrigeren  $IC_{50}$ -Werten führte. Eine einfache Erklärung hierfür ist, dass mehr Zytostatikum pro Trägereinheit in die Zielzelle eingeschleust wird.

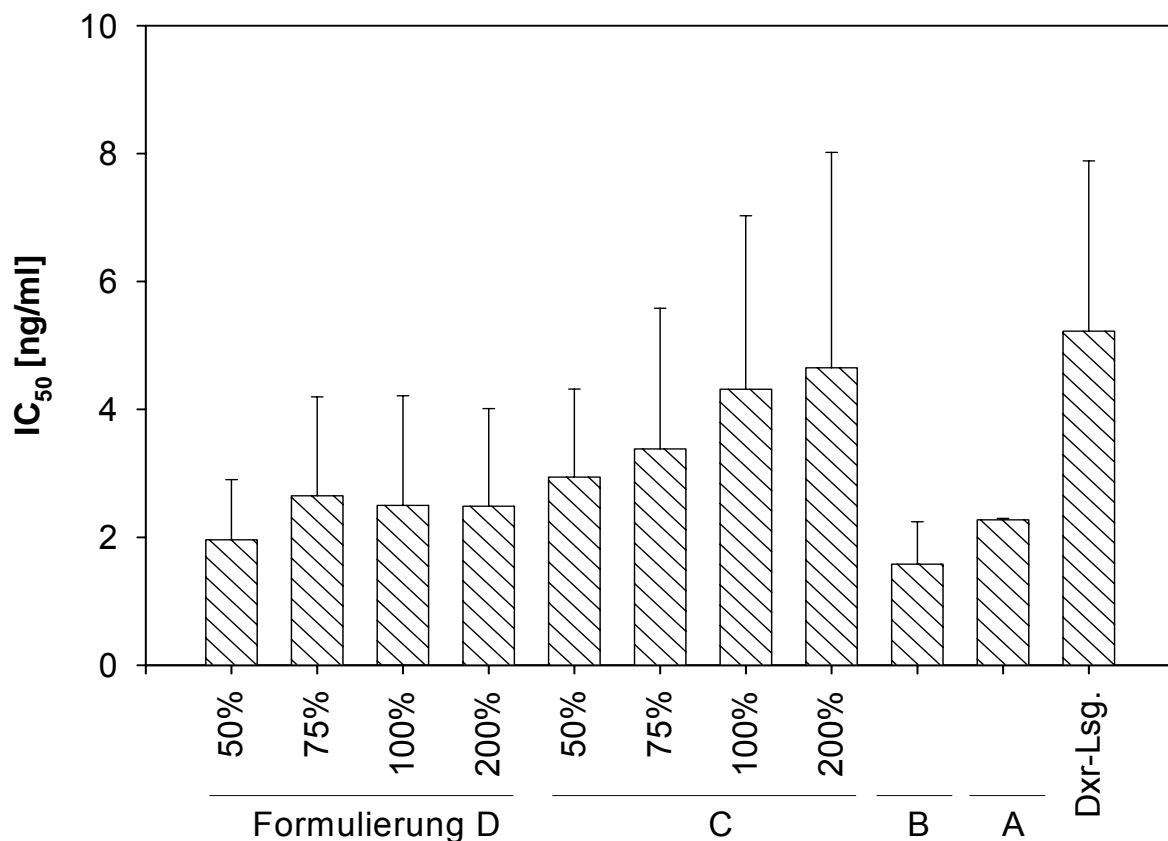


Abbildung 29 Einfluss von verschiedenen Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln im Vergleich zu einer Doxorubicin-Lösung (Dxr-Lsg.) auf die Zellviabilität ( $IC_{50}$  in ng/ml) von UKF-NB3-Zellen: Nanopartikel mit adsorptiv gebundenem Doxorubicin (Formulierungen A, B) und Nanopartikel mit eingebundenem Doxorubicin (Formulierungen C, D) stabilisiert mit Glutaraldehyd von 50% bis 200% ( $n = 3$ ,  $\pm$  S.D.)

### 4.4.3.2 IMR-32-Zelllinie

Etwas unterschiedliche Resultate lieferte die Testung der Zubereitungen in der IMR-32-Zelllinie (Abbildung 30). Zwar hatten auch hier alle nanopartikulären Zubereitungen einen signifikant niedrigeren ( $p \leq 0,001$ )  $IC_{50}$ -Wert ( $IC_{50} = 2,11 \pm 0,83$  ng/ml bis  $4,42 \pm 2,23$  ng/ml) verglichen mit der reinen Lösung des Zytostatikums ( $IC_{50} = 8,78 \pm 1,25$  ng/ml). Wie bereits bei den UKF-NB3-Zellen beobachtet, zeigten die Partikel mit einer höheren Doxorubicin-Beladung eine durchschnittlich ausgeprägtere Hemmung der Zellviabilität. Die Beobachtung, dass eine stärkere Quervernetzung der Dxr-NP mit Glutaraldehyd in UKF-NB3-Zellen zu höheren  $IC_{50}$ -Werten führte, konnte jedoch in den Experiment mit IMR-32-Zellen nicht bestätigt werden. Der genaue Grund hierfür bleibt unklar. Eine unterschiedliche endozytotische Aktivität und ein unterschiedlich schneller Abbau der Nanopartikel in der jeweiligen Zelllinie könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein.



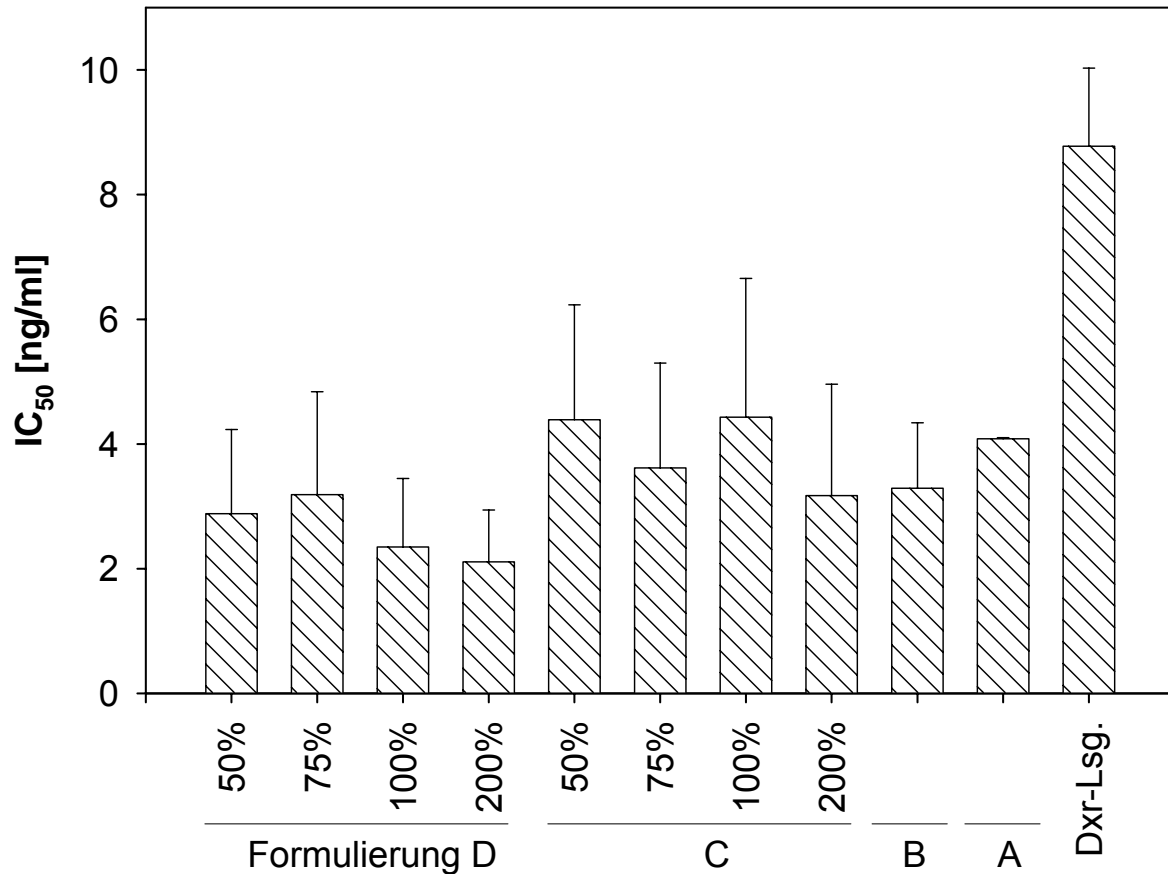


Abbildung 30 Einfluss von verschiedenen Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln im Vergleich zu einer Doxorubicin-Lösung (Dxr-Lsg) auf die Zellviabilität (IC<sub>50</sub> in ng/ml) von IMR-32-Zellen: Nanopartikel mit adsorptiv gebundenem Doxorubicin (Formulierungen A, B) und Nanopartikel mit eingebundenem Doxorubicin (Formulierungen C, D) stabilisiert mit Glutaraldehyd von 50% bis 200% (n = 3, ± S.D.)

#### 4.4.3.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse des Einflusses der Doxorubicin-beladenen Nanopartikel auf die Viabilität der Zelllinien UKF-NB3 und IMR-32 wurden im vorangegangenen Teil gezeigt. Alle nanopartikulären Zubereitungen zeigten eine starke Hemmung der Zellviabilität bei niedrigen Doxorubicin-Konzentrationen. Das Doxorubicin behielt in den getesteten Formulierungen seine volle antineoplastische Aktivität und hatte im Vergleich zu einer Arzneistofflösung sogar eine durchschnittlich gesteigerte zytotoxische Wirkung. Innerhalb der Dxr-NP scheint eine

höhere Beladung wirkungsvoller zu sein als eine niedrigere Beladung, da mehr Arzneistoff pro Trägereinheit in die Zellen eingeschleust wird. Die Tendenz, dass niedriger quervernetzte Partikel stärker wirksam waren, konnte nur in einer der beiden Zelllinien beobachtet werden.

Somit kann eine Abschwächung der antineoplastischen Wirkung von Doxorubicin durch Bindung an das hier verwendete Trägersystem ausgeschlossen werden und diese Zubereitungen in vivo eingesetzt werden.

#### 4.4.4 In-vivo-Testung der Dxr-NP

In den vorangegangenen Versuchen wurde zum einen das ApoE3-modifizierte Trägersystem beladen mit Loperamid untersucht und gezeigt, dass es mit diesen oberflächenmodifizierten Nanopartikeln möglich ist, die BHS zu überwinden (Punkt 4.3.2). Zum anderen wurden Doxorubicin-beladene Nanopartikel aus HSA entwickelt, charakterisiert und in vitro auf ihren antiproliferativen Effekt auf verschiedene Neuroblastom-Zelllinien untersucht (Punkt 4.4.3). Ziel war es nun die Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen miteinander zu kombinieren, indem das hier entwickelte Gehirn-Targeting-Prinzip auf mit Zytostatika-beladene HSA-NP übertragen und auf seine Effektivität bei der Behandlung von Gehirntumoren untersucht wurde.

Ein weiterer interessanter Punkt ist, ob die hier entwickelten Dxr-NP einen pharmakologischen und toxikologischen Vorteil gegenüber einer herkömmlichen Behandlung mit Doxorubicin haben. Hierbei war von besonderem Interesse, ob die bei einer herkömmlichen Doxorubicin-Behandlung auftretenden Nebenwirkungen wie z.B. Gewichtsverlust, Blutbildveränderung und vor allem Kardiotoxizität durch Kopplung des Arzneistoffs an HSA-NP verringert werden können. Als Vorbild dient das auf dem amerikanischen Markt erhältliche Präparat Abraxane™. Hier ist das Zytostatikum Paclitaxel erfolgreich mit Nanopartikeln aus HSA kombiniert worden. Resultat war ein verbessertes

pharmakologisches und toxikologisches Profil des Arzneistoffs und das Verzichten auf die übliche Prämedikation mit Glukokortikoiden bei der Behandlung mit handelsüblichen Cremophor EL-haltigen Paclitaxel-Zubereitungen (Damascelli et al., 2001; Ibrahim et al., 2002). Ob dieses verbesserte Profil auch für die hier entwickelten Dxr-NP zutrifft, wurde in einer toxikologischen Studie untersucht.

#### 4.4.4.1 Behandlung von Gehirntumor-tragende Ratten

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Doxorubicin-beladene PBCA-NP, die mit dem Emulgator Tween 80 überzogen waren, für die Behandlung von Gehirntumoren an Ratten eingesetzt (Steiniger et al., 2004). Das Ergebnis war eine bis zu 20% verlängerte mittlere Überlebenszeit der behandelten Gruppe im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. Grund für das erfolgreiche Gehirn-Targeting war die unspezifische Anlagerung von Apolipoproteinen aus dem Serum der Versuchstiere an die zuvor überzogenen PBCA-NP (Lück, 1997; Lück et al., 1997).

Die durchgeführten Tierversuche an Glioblastom-tragenden Ratten sollten eine therapeutische Anwendung der hier entwickelten Dxr-NP in Kombination mit der direkten Bindung von ApoE3 an das Trägersystem belegen. Zu diesem Zweck wurde Ratten ein Tumor intrakranial implantiert und anschließend eine Chemotherapie mit verschiedenen Doxorubicin-Zubereitungen durchgeführt. Die Verabreichung der Proben erfolgte i.v. in die Schwanzvene mit einer Dosierung von 1,5 mg/kg an den Tagen 2, 5 und 8 nach Tumorimplantation.

##### 4.4.4.1.1 Versuchsreihe 1: Dxr-NP mit inkorporiertem Doxorubicin

In dieser Versuchsreihe wurden nur Nanopartikel verwendet, die den Arzneistoff Doxorubicin eingebettet in die Partikelmatrix enthielten. In Tabelle 17 sind die eingesetzten Zubereitungen mit ihren jeweiligen

Eigenschaften aufgelistet. Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer auf die klinischen Symptome Apathie und Gewichtsverlust hin beobachtet. Bei einem Gewichtsverlust von  $\geq 20\%$  oder Paralyse wurden die Tiere eingeschläfert. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Behandlung der Tumor-tragenden Versuchstiere als Kaplan-Meier-Plot dargestellt.

Tabelle 17 Eigenschaften der an Gehirntumor-tragenden Ratten eingesetzten Zubereitungen der Versuchreihe 1

		<i>Konzentration absolute Doxorubicin (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</i>	<i>absolute Beladung (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</i>	<i>Partikelgröße (nm)</i>
1	Dxr-NP	711,2	46,5	428
2	ApoE3-Dxr-NP	720,2	43,9	462
3	PEG-Dxr-NP	1028,1	46,7	474
4	Dxr-NP + 1% Tween 80	763,2	46,9	434
5	Dxr-Lösung	1000		

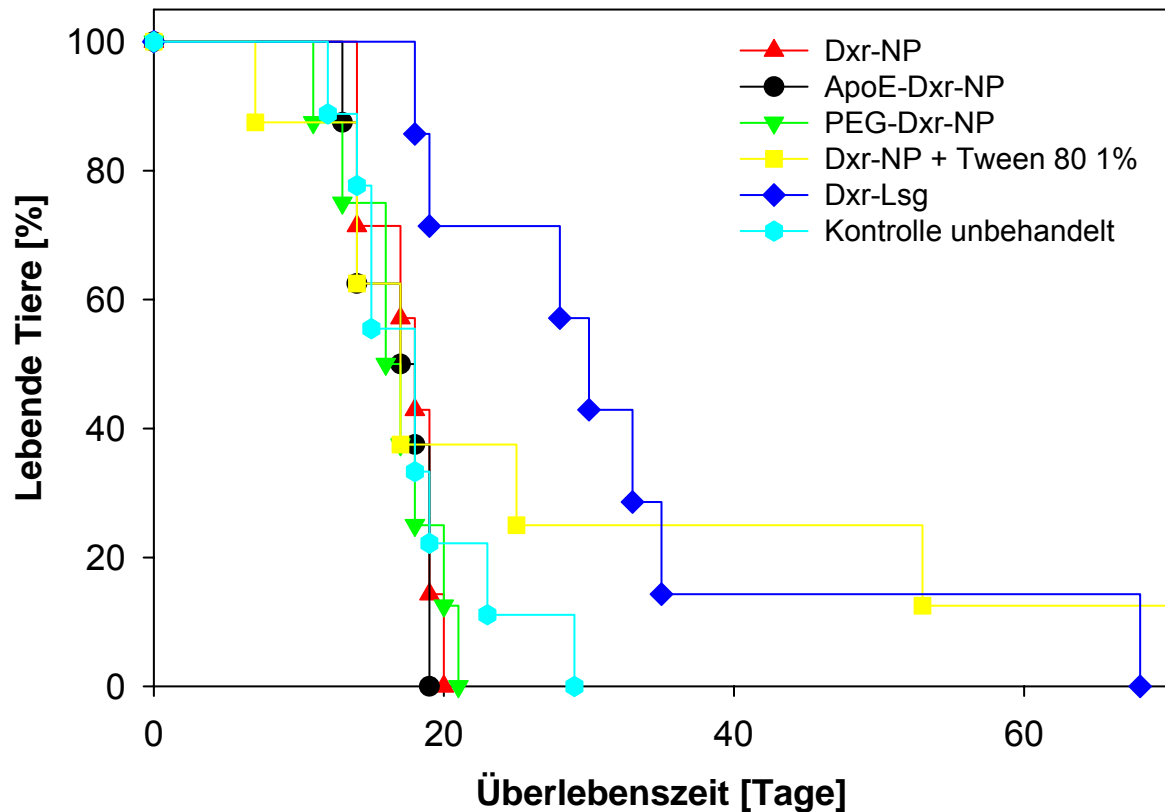


Abbildung 31 Kaplan-Meier-Plot der Versuchsreihe 1: Vergleich von Dxr-NP mit inkorporiertem Arzneistoff mit einer Doxorubicin-Lösung und einer unbehandelten Kontrolle

Sowohl die Betrachtung des Kaplan-Meier-Plots als auch die Berechnung der mittleren Überlebenszeiten lieferten ein negatives Ergebnis. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist kein positiver Effekt der nanopartikulären Zubereitungen auf die Überlebenszeit der Tiere zu sehen. So lagen die mittleren Überlebenszeiten der Dxr-NP-Formulierungen mit 15,5 Tagen für ApoE3-Dxr-NP, 17,0 Tage für Dxr-NP und 16,5 Tage für PEG-Dxr-NP alle unterhalb des Werts von 18,0 Tagen der Kontrollgruppe. Keine dieser vier Gruppen wies einen Langzeitüberlebenden (Überlebenszeit  $\geq 180$  Tage = „Long Time Survivor“) oder eine Remission des Tumors auf. Ein geringer Erfolg war bei der Behandlung mit Tween 80-überzogenen Dxr-NP zu sehen. Hier betrug die mittlere Überlebenszeit 21,0 Tage und die Versuchsgruppe beinhaltete einen Langzeitüberlebenden sowie ein Tier mit einer Überlebenszeit von 53,0 Tagen. Die statistische Auswertung ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied der Behandlung mit Dxr-NP mit

Tween 80-Überzug im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,531$ ). Die höchste mittlere Überlebenszeit von 33,0 Tagen hatte die mit einer Doxorubicin-Lösung behandelte Versuchsgruppe, die jedoch keinen Langzeitüberlebenden hervorbrachte. Die maximale Überlebenszeit eines Tieres betrug 68,0 Tage, jedoch konnte bei diesem Tier nach der Autopsie keine Anzeichen eines Tumors entdeckt werden. Daher bleibt hier die Frage offen, ob es zu einer eher unwahrscheinlichen vollständigen Remission des Tumors kam oder das eingepflanzte Glioblastom nicht angewachsen war. Die Elimination dieses Messwertes aus der Berechnung ergab eine mittlere Überlebenszeit von 27,0 Tagen für die Doxorubicin-Lösung behandelte Versuchsgruppe, wodurch sich diese signifikant von der unbehandelten Kontrolle unterscheidet ( $p = 0,036$ ).

#### 4.4.4.1.2 Versuchsreihe 2: Dxr-NP mit adsorptiv gebundenem Doxorubicin

Ein weiterer Tierversuch mit Tumor-tragenden Ratten wurde mit Dxr-NP durchgeführt, die den Arzneistoff adsorptiv an die Oberfläche gebunden trugen, um den möglichen Einfluss der Arzneistoffbindung auf die antitumorale Effektivität zu untersuchen. Die physikochemischen Eigenschaften der getesteten Formulierungen sind in Tabelle 18 aufgelistet. Die Ergebnisse der antitumoralen Behandlung sind in Abbildung 31 als Kaplan-Meier-Plot dargestellt.

Tabelle 18 Eigenschaften der an Gehirntumor-tragenden Ratten eingesetzten Zubereitungen der Versuchsreihe 2

		<i>Konzentration absolute Doxorubicin (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>absolute Beladung (<math>\mu\text{g/mg}</math>)</i>	<i>Partikelgröße (nm)</i>
1	Dxr-NP	527,4	47,1	203
2	ApoE3-Dxr-NP	528,1	47,8	208
3	PEG-Dxr-NP	427,2	38,4	210
4	Dxr-NP + 1% Tween 80	527,4	47,1	203
5	Dxr-Lösung	1000		

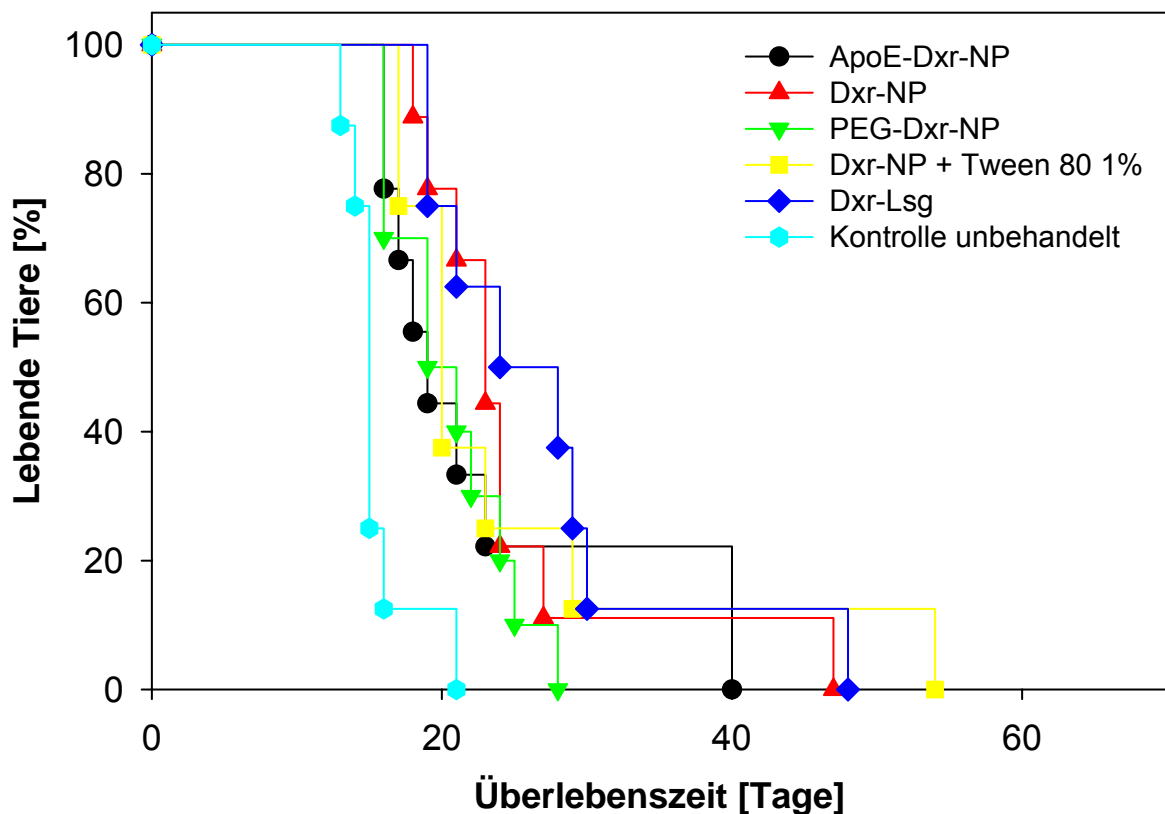


Abbildung 32 Kaplan-Meier-Plot der Versuchsreihe 2: Vergleich von Dxr-NP mit adsorptiv gebundenem Arzneistoff mit einer Doxorubicin-Lösung und einer unbehandelten Kontrolle

Die Versuchsreihe 2 verlief ebenfalls ohne einen deutlich erkennbaren therapeutischen Vorteil des ApoE3 Gehirn-Targeting-Prinzips. Im Vergleich

zur Kontrollgruppe (mittlere Überlebenszeit 15,5 Tage) hatten alle Zubereitungen eine gesteigerte Überlebenszeit von über 20,0 Tagen. Die mittleren Überlebenszeiten betragen für ApoE3-Dxr-NP 21,0 Tage (Maximalwert 40,0 Tage), für PEG-Dxr-NP 20,5 Tage (Maximalwert 28,0 Tage) und für Dxr-NP ohne Modifikation 25,0 Tage (Maximalwert 48,0 Tage). Wiederum den höchsten Wert lieferte eine reine Lösung des Zytostatikums mit 27,0 Tagen gefolgt von Tween 80-überzogenen Nanopartikeln mit 25,0 Tagen und einer maximalen Überlebenszeit von 54,0 Tagen. Die statistische Auswertung (t-Test) der Messwerte resultierte in keinem signifikanten Unterschied der Formulierungen ApoE3-Dxr-NP, Dxr-NP und Dxr-NP + 1% Tween 80 zur Kontrollgruppe ( $p \geq 0,062$ ). Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand bei den Gruppen PEG-Dxr-NP und Doxorubicin-Lösung ( $p \leq 0,018$ ).

### 4.4.4.1.3 Schlussfolgerung

Die Versuche der Kombination des ApoE3-modifizierten Trägersystems mit den Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln und deren Einsatz zur Behandlung von Gehirntumoren blieb ohne therapeutischen Erfolg im Vergleich zu einer Doxorubicin-Lösung. Die Testung von Zubereitungen mit in die Matrix der Partikel eingebundenem Arzneistoff (Versuchsreihe 1) zeigte, dass all diese Zubereitungen eine schlechtere antitumorale Wirkung hatten als eine vergleichbare Lösung des Zytostatikums. Lediglich mit Tween 80 überzogene Dxr-NP konnten einen geringen Effekt erzielen. Eine mögliche Ursache für den ausbleibenden therapeutischen Erfolg ist die schon in Punkt 4.4.2.2.1 untersuchte geringe Freisetzung des Doxorubicins aus der Partikelmatrix. Hier wurden nach 24 h Inkubation der Dxr-NP in 0,9% NaCl nur 8% des enthaltenen Arzneistoffs freigesetzt. Diese geringe Freisetzung könnte zur Folge haben, dass die Konzentration des Zytostatikums am Wirkort in vivo zu gering ist, um die Tumorzellen zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der In-vitro-Studie mit Neuroblastomzellen. Hier reichte die therapeutische Konzentration des Doxorubicins aus, um das Wachstum der Zellen zu



hemmen. Der Abbau der Partikel im biologischen System spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung des Arzneistoffs. Wie auch in der Zellkultur gezeigt werden konnte, nahm die antineoplastische Wirkung mit steigender Quervernetzung der Partikel ab. Gleiches könnte auch Ursache für die geringe In-vivo-Wirkung sein, sodass die hier verwendeten 100% quervernetzten Nanopartikel nicht in ausreichendem Umfang im Gehirn der Versuchstiere abgebaut werden und somit die Konzentration von Doxorubicin unterhalb der minimalen therapeutischen Dosis lag. Ein Beleg für den langsamen Abbau von hoch quervernetzten HSA-NP konnte von Wartlick et al. erbracht werden. So waren hier selbst 24 h nach Aufnahme der Partikel durch unterschiedliche Krebszelllinien immer noch HSA-NP im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) in den Zellen zu sehen (Wartlick et al., 2004b). Auch der direkte Abbau von HSA-NP durch verschiedene Enzyme wie Trypsin, Proteinase K, Pepsin, Protease und Cathepsin B wurde untersucht. Ein deutlicher Abbau war nur bei 40% quervernetzten HSA-NP erkennbar, wohingegen HSA-NP mit 100% Glutaraldehyd stabilisiert nur in sehr geringem Umfang nach 24 h abgebaut wurden (Langer et al., 2007).

So wurde in der Versuchsreihe 2 die Beladungsstrategie der Nanopartikel auf eine adsorptive Beladung hin variiert. Die chemotherapeutische Behandlung der Versuchstiere mit diesen Formulierungen brachte im Vergleich zur Versuchsreihe 1 einen leichten Anstieg der mittleren Überlebenszeiten. Allerdings war dieser Anstieg nur teilweise signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe und zeigte keinen Vorteil gegenüber einer Doxorubicin-Lösung. Das die Lösung des Zytostatikums in beiden Versuchsreihen am effektivsten war, kann auf eine Beeinträchtigung der BHS durch den Tumor hinweisen. Allerdings findet die Zerstörung der BHS nur unmittelbar innerhalb des Tumors und nicht in der äußeren Region statt. Dementsprechend wurden therapeutische Arzneistoffkonzentrationen bisher nur in nekrotischem Tumorgewebe gefunden, während in peripheren Bereichen des Tumors kein oder nur ein sehr geringer Teil des Arzneistoffs nachweisbar war (Donelli et al., 1992). Dies ist auch der Grund weshalb keine vollständige Remission des Tumors

durch die Behandlung mit Doxorubicin-Lösung eintrat. Generell bleibt fraglich in welchem Ausmaß die hier getesteten Nanopartikel das Gehirn erreichen bzw. in welchen Konzentrationen sie letztendlich den Tumor erreichen. Eventuell können zwar durch das hier verwendete Gehirn-Targeting-Prinzip die Dxr-NP die BHS überwinden, ob dies aber gleichbedeutend mit einer Anreicherung im Tumorgewebe ist, bleibt fraglich. Unter Umständen wäre für einen therapeutischen Erfolg ein zusätzliches Tumor-Targeting unerlässlich. So wurde von Kirpotin et al. gezeigt, dass sich Liposomen, die den HER2- Antikörper Trastuzumab an der Oberfläche trugen, ebenso wie nicht Antikörper tragende Liposomen im Tumorgewebe in vivo anreicherten. Allerdings zeigten beide Liposomen Spezies eine unterschiedliche Mikroverteilung. Die den Tumor-Targeting-Liganden tragenden Liposomen zeigten eine deutlich stärkere Assoziierung zu den Tumorzellen, wohingegen die Liposomen ohne Drug-Targeting-Liganden eine eher diffuse Verteilung zeigten (Kirpotin et al., 2006). Des Weiteren hat das Gehirn einen Anteil von 1 – 2% am Körpervolumen. Wenn nur 1% bis 2% der injizierten Nanopartikel das Gehirn erreichen, kann je nach Arzneistoff die dadurch eingeschleuste Menge nicht ausreichend sein, um einen pharmakologischen Effekt zu erzielen. Besonders bei der Behandlung von komplexen Krankheiten wie Gehirntumoren, die unter Umständen mit einer strukturellen Veränderung des Gehirns und der BHS einhergehen, kann dies die Ursache für einen ausbleibenden therapeutischen Erfolg sein. Nichts desto trotz konnten bisher beachtliche Erfolge mit Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln zur Therapie von Glioblastom-tragenden Ratten erzielt werden und der Arzneistoff im Gehirn und Tumorgewebe nachgewiesen werden (Gulyaev et al., 1999; Gelperina et al., 2002; Steiniger et al., 2004; Ambruosi et al., 2006).

#### 4.4.4.2 Subchronische toxikologische Studie mit Dxr-NP

Um das Nebenwirkungsprofil von Doxorubicin zu verbessern wurden in der Vergangenheit verschiedene Strategien verfolgt. So wurden nahezu 2000

analoge Verbindungen synthetisiert und untersucht, jedoch wurden davon nur wenige bisher in klinischen Studien verwendet. Analoga der zweiten Generation wie Epirubicin oder Idarubicin hatten zwar eine geringere Kardiotoxizität als der ursprüngliche Arzneistoff, konnten diese aber nicht vollständig ausschließen (Anderlini et al., 1995; Ryberg et al., 1998).

Des Weiteren konnte im Jahre 2002 von Danesi et al. gezeigt werden, dass die durch Doxorubicin induzierte Kardiotoxizität in direkter Korrelation zum maximalen Herz- und Plasmaspiegel und nicht zur Gesamtplasma-AUC steht (Danesi et al., 2002). Folglich führte eine langsame Infusion des Arzneistoffs über mehrere Stunden zu einer deutlich geringeren Kardiomyopathie als eine Bolus-Injektion (Cusack et al., 1993). Daraufhin wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht das pharmakokinetische Profil von Doxorubicin zu verbessern. Eine dieser Möglichkeiten ist die Verpackung in ein Drug-Delivery-System um die Anreicherung im Tumorgewebe zu verbessern und die maximalen Plasmaspiegel in gesundem Gewebe zu verringern. Dies wurde bisher erfolgreich mit liposomalen Zubereitungen mit Doxorubicin erzielt (Safra et al., 2000; Batist et al., 2001).

Obwohl diese liposomalen Formulierungen mit Doxorubicin bereits auf dem Markt erhältlich sind und in der Klinik Verwendung finden, stellen Nanopartikel eine viel versprechende Alternative dar. So konnte zum Beispiel mit Doxorubicin-beladenen PBCA-NP die Multidrug-Resistence von Tumorzellen überwunden werden (Cuvier et al., 1992). Die toxikologische Untersuchung dieser Formulierung ergab keinen Anstieg der akuten Toxizität (Gelperina et al., 2002) und führte sogar zu einer Verminderung der Konzentration des Zytostatikums im Herzgewebe (Gulyaev et al., 1999).

In der hier durchgeführten Studie sollte ebenfalls untersucht werden, ob die in dieser Doktorarbeit entwickelten Dxr-NP aus HSA ebenfalls ein verbessertes pharmakologisches und toxikologisches Profil haben wie es bereits für Paclitaxel-beladene HSA-NP gezeigt wurde (Gradishar et al., 2005).

## 4.4.4.2.1 Gewicht, Hämatologie, Elektrokardiographie

## 4.4.4.2.1.1 Gewicht

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Toxizität einer Zubereitung ist das Körpergewicht der Versuchstiere. Die Veränderung des Körpergewichts der behandelten Ratten wurde als mittlere relative Zunahme des Körpergewichts in Prozent zum Gewicht vor Behandlung bestimmt. Nach 15 Tagen war die Zunahme des Körpergewichts bei allen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Dieser Effekt war am ausgeprägtesten bei den Tieren, die eine Doxorubicin-Lösung mit 1% (m/V) Tween 80 erhielten und betrug nur 11% im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit 37% Körpergewichtszunahme (Tabelle 19). Die Versuchsgruppen, die Dxr-NP mit und ohne Tween 80 erhielten, zeigten eine Zunahme des Körpergewichts von 34% (ohne Tween 80) und 29% (mit Tween 80). Die Körpergewichtszunahmen lagen folglich etwas niedriger als bei der Kontrollgruppe aber dennoch höher als bei den Tieren, die mit reiner Doxorubicin-Lösung behandelt wurden (28%). Die Bestimmung des Körpergewichts nach 30 Tagen (Tabelle 19) zeigte, dass die nanopartikulären Zubereitungen keinen negativen Effekt auf das mittlere Körpergewicht hatten. Die Gruppe mit Dxr-NP zeigte sogar einen Anstieg von 85%, der größer als der der Kontrollgruppe mit 50% war. Die geringste Zunahme zeigten die Doxorubicin-Lösungen mit 34% bzw. 41%.

Tabelle 19 Zunahme des Körpergewichts in % 15 und 30 Tage nach Behandlung der Versuchsgruppen

<i>Gruppen</i>	<i>Zunahme Körpergewicht 15 Tage [%]</i>	<i>Zunahme Körpergewicht 30 Tage [%]</i>
Kontrolle	37,43 ± 1,40	50,82 ± 2,57
Dxr-Lösung	28,35 ± 1,30	34,59 ± 1,79
Dxr-Lösung + 1% (m/V) Tween 80	11,71 ± 1,18	41,63 ± 1,93
Dxr-NP	34,00 ± 2,90	57,10 ± 4,10
Dxr-NP + 1% (m/V) Tween 80	29,00 ± 3,10	85,50 ± 6,20

#### 4.4.4.2.1.2 Hämatologie

Der Einfluss der Doxorubicin-haltigen Zubereitungen auf hämatologische Parameter wurde in klinischen Bluttests 3, 5, 7, 14 und 30 Tage nach Applikation ermittelt. Alle Zubereitungen zeigten eine leichte Abnahme der Leukozytenzahl drei Tage nach Behandlung, die sich aber nach fünf Tagen wieder normalisierte. Eine richtige Leukopenie (Leukozytenzahl  $\leq 6 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht beobachtet (Abbildung 33). Eine leichte Verminderung der Erythrozytenzahl war von Tag drei nach Tag sieben nur bei den mit Doxorubicin-Lösung behandelten Versuchsgruppen zu sehen. In den Gruppen mit HSA-basierten Formulierungen blieb die Erythrozytentzahl die gesamte Zeit über vergleichbar mit der der Kontrollgruppe (Abbildung 34).

Generell ist zu sagen, dass während der Beobachtungsphase bei den Tieren keine klinisch relevanten hämatologischen Effekte zu sehen waren. Alle Blutbildfluktuationen blieben im physiologischen Bereich.

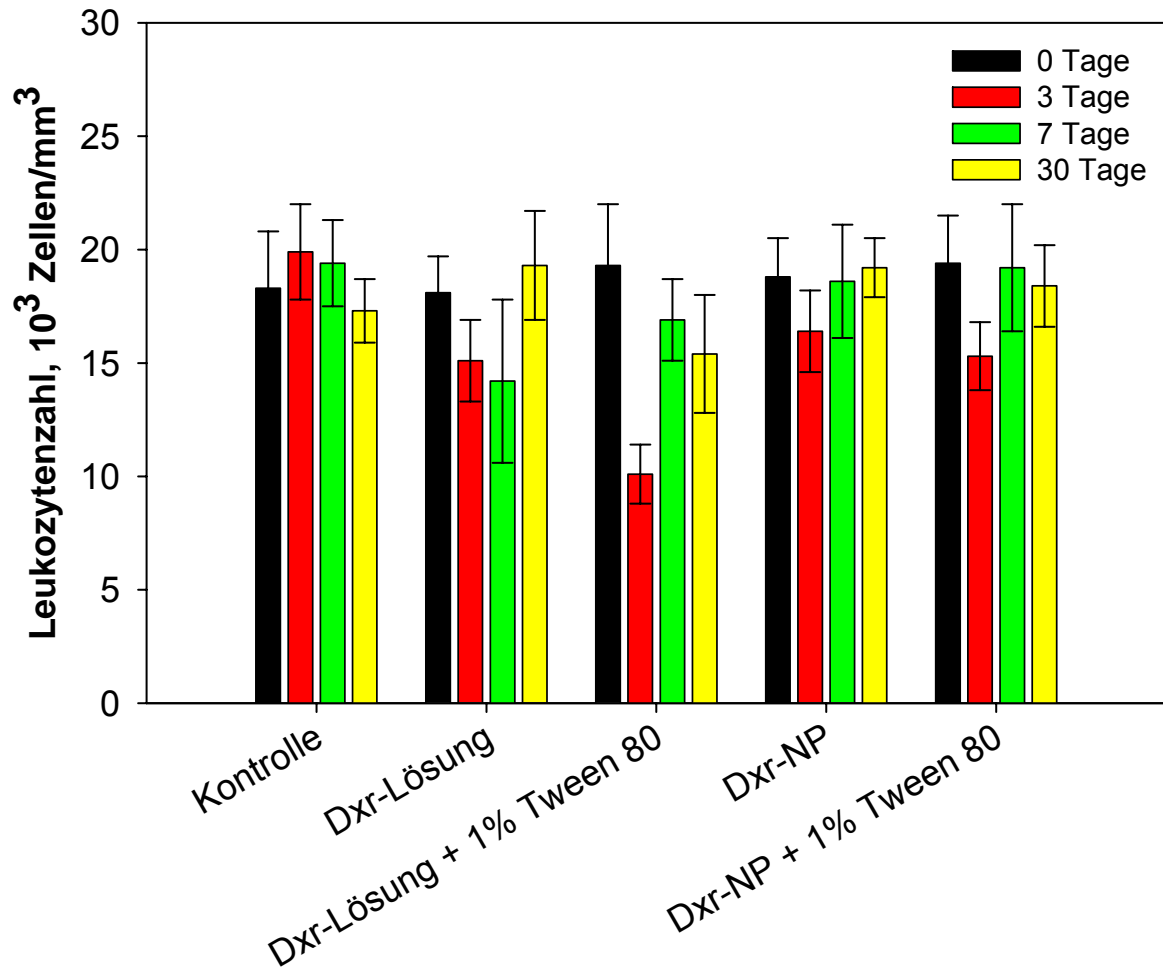


Abbildung 33 Einfluss der Doxorubicin-Formulierungen auf die Leukozytenzahl 0, 3, 7, 30 Tage nach Behandlung (n = 12, ± S.D.)

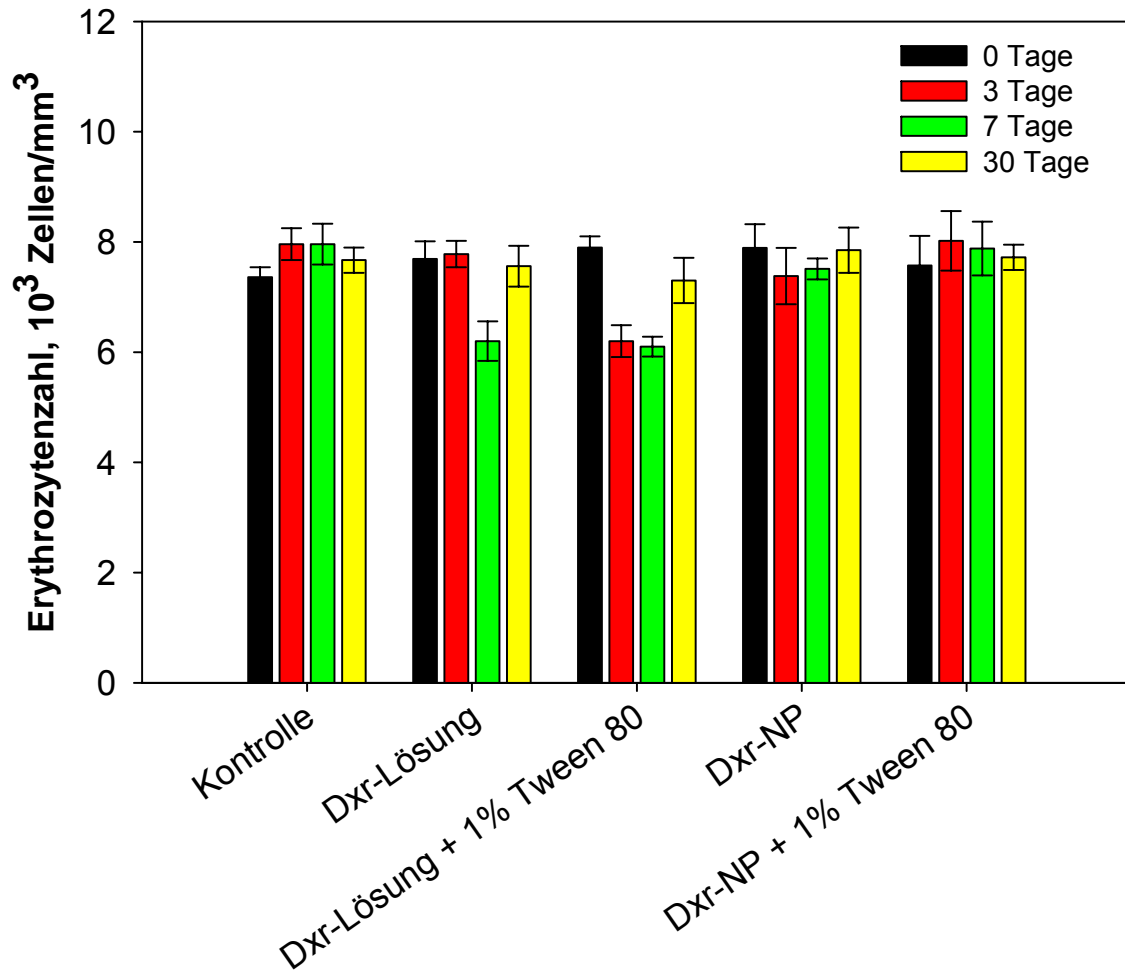


Abbildung 34 Einfluss der Doxorubicin-Formulierungen auf die Erythrozytenzahl 0, 3, 7, 30 Tage nach Behandlung (n = 12, ± S.D.)

#### 4.4.4.2.1.3 Elektrokardiographie

Die Daten der Elektrokardiographie an den Tagen 15 und 30 nach Behandlung sind in Tabelle 20 dargestellt. Am Tag 15 wurde eine leichte Erhöhung des QT-Intervalls bei der mit reiner Doxorubicin-Lösung behandelten Gruppe gemessen. Diese Erhöhung verstärkte sich am Tag 30 und ging mit einer Tachykardie einher. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch eine Erhöhung des QT-Intervalls der mit Doxorubicin-Lösung + Tween 80 behandelten Ratten ermittelt werden. Die übrigen Formulierungen verursachten bei den Versuchstieren weder eine Veränderung der QT-Zeit noch Tachykardie.

Tabelle 20 Elektrokardiographische Untersuchung der Versuchstiere nach Behandlung mit den Doxorubicin-Formulierungen (n = 12, ± S.D.)

<i>EKG Parameter</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Dxr- Lösung</i>	<i>Dxr- Lösung + 1% Tween 80</i>	<i>Dxr-NP</i>	<i>Dxr-NP + 1% Tween 80</i>
<b>15 Tage nach Behandlung</b>					
R-R [ms]	163±11	152±14	149±13	151,1±9	147±26
QT [ms]	71±4	67±1	67±8	65±7	63±7
QT [%]	43,8±0,9	46,2±1,2	45,1±0,8	43,2±0,6	42,8±0,5
Puls [bpm]	368±28,7	396±41	403±26	396±24	407±31
<b>30 Tage nach Behandlung</b>					
R-R [ms]	153±14	117±8	126±18	144±9	142±27
QT [ms]	65±9	62±7	62±8	66±6	65±8
QT [%]	42,5±3,8	52,8±0,6	49,8±1,4	45,9±1,4	46,1±1,3
Puls [bpm]	395±35,5	512±57,6	476±23,7	418±32,1	423±17,9

#### 4.4.4.2.2 Organ/Körpergewicht-Index

Der Einfluss der Arzneistoffbehandlung auf das relative Gewicht der inneren Organe (Gewichts-Index = GI, Organgewicht relativ zum Körpergewicht) wurde bestimmt und ist in Tabelle 21 dargestellt.

Der Lungen-GI unterschied sich in keiner der Versuchsgruppen vom Wert der Kontrollgruppe. Lediglich nach 30 Tagen zeigte die mit Doxorubicin-Lösung + 1% Tween 80 behandelte Gruppe einen erhöhten Lungen-GI.

Der Nieren-GI blieb bei allen Gruppen während der gesamten Versuchsdauer unverändert.

Bei der Bewertung der Leber ergab sich nur bei der mit Doxorubicin-Lösung behandelten Gruppe eine leichte Erniedrigung des



Indexes nach 15 Tagen. Nach 30 Tagen war bei keiner Versuchsgruppe mehr eine Differenz zur Kontrollgruppe zu sehen.

Leicht erniedrigte GI-Werte der Galle waren nach 15 Tagen bei den mit Dxr-NP und Dxr-NP + 1% Tween 80 behandelten Tieren zu erkennen. Dieser Effekt normalisierte sich aber nach 30 Tagen und lag dann wieder im Bereich der übrigen untersuchten Gruppen.

Gleiche Resultate wurden bei der Bewertung der Hoden-GI erzielt. Hier gab es bei keiner der Gruppen eine Veränderungen des Indexes.

Allerdings wurde nach 15 Tagen bei allen Formulierungen eine Gewichtsreduktion des Thymus im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Nach 30 Tagen war jedoch kein Unterschied mehr zu erkennen.

Der GI des Herzens blieb bei allen Tieren ohne Befund und zeigte keine Veränderungen.

Tabelle 21 Einfluss der Arzneistoffbehandlung nach 15 und 30 Tagen auf das Gewicht der inneren Organe relativ zum Körpergewicht in %  
(n = 12, ± S.D.)

<i>Gruppen</i>	<i>Herz</i>	<i>Lunge</i>	<i>Nieren</i>	<i>Leber</i>	<i>Galle</i>	<i>Hoden</i>	<i>Thymus</i>
<b>Organ-Gewichtsindex [%] 15 Tage nach Behandlung</b>							
Kontrolle	0,33±0,04	0,90±0,05	0,34±0,04	3,74±0,08	0,32±0,04	0,51±0,05	0,24±0,01
Dxr-Lösung	0,30±0,02	0,93±0,06	0,33±0,02	3,53±0,09	0,27±0,03	0,45±0,05	0,15±0,02
Dxr-Lösung + 1% (m/V) Tween 80	0,32±0,05	0,97±0,07	0,38±0,03	3,70±0,08	0,27±0,02	0,47±0,10	0,13±0,02
Dxr-NP	0,34±0,03	0,84±0,03	0,38±0,05	3,70±0,09	0,23±0,04	0,54±0,03	0,18±0,03
Dxr-NP + 1% (m/V) Tween 80	0,34±0,06	0,88±0,08	0,37±0,04	3,93±0,08	0,24±0,03	0,56±0,07	0,19±0,02
<b>Organ-Gewichtsindex [%] 30 Tage nach Behandlung</b>							
Kontrolle	0,32±0,02	0,74±0,04	0,33±0,02	3,49±0,12	0,22±0,03	0,49±0,06	0,17±0,04
Dxr-Lösung	0,32±1,79	0,32±0,03	0,34±0,015	3,55±0,08	0,25±0,012	0,31±0,05	0,20±0,03
Dxr-Lösung + 1% (m/V) Tween 80	0,31±0,05	0,94±0,03	0,32±0,03	3,53±0,08	0,23±0,01	0,30±0,04	0,22±0,03
Dxr-NP	0,32±0,02	0,72±0,02	0,36±0,04	3,47±0,07	0,25±0,03	0,49±0,05	0,13±0,05
Dxr-NP + 1% (m/V) Tween 80	0,32±0,03	0,67±0,04	0,33±0,03	3,52±0,09	0,26±0,05	0,46±0,04	0,13±0,04

#### 4.4.4.2.3 Histologie von Herz- und Hodengewebe

##### 4.4.4.2.3.1 Histologie des Herzgewebes

Die histologische Untersuchung des Rattenmyokards ergab bei den HSA-basierten Formulierungen während der ganzen Versuchsdauer keine pathologischen Veränderungen (Abbildung 37). Die Injektion mit Doxorubicin-Lösungen mit und ohne Tween 80 verursachte nach 15 Tagen leichte Veränderungen des Herzgewebes im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 35). Hierzu zählten einzelne kleine lymphoide Einschlüsse und Läsionen toxisch bedingter Kardiomyopathie mit ödematösen Myofibrillen. Dieser Befund verschlechterte sich nach 30 Tagen (Abbildung 36) und das Myokard zeigte deutliche ödematöse Läsionen und vakuolenartige Degenerationen der Myofibrillen mit lymphoiden Einschlüssen. Diese Ergebnisse sind typisch für eine Doxorubicin-bedingte Schädigung des Herzgewebes und wurden bereits von anderen Autoren beschrieben (Klugmann et al., 1984; Gebbia et al., 1985).

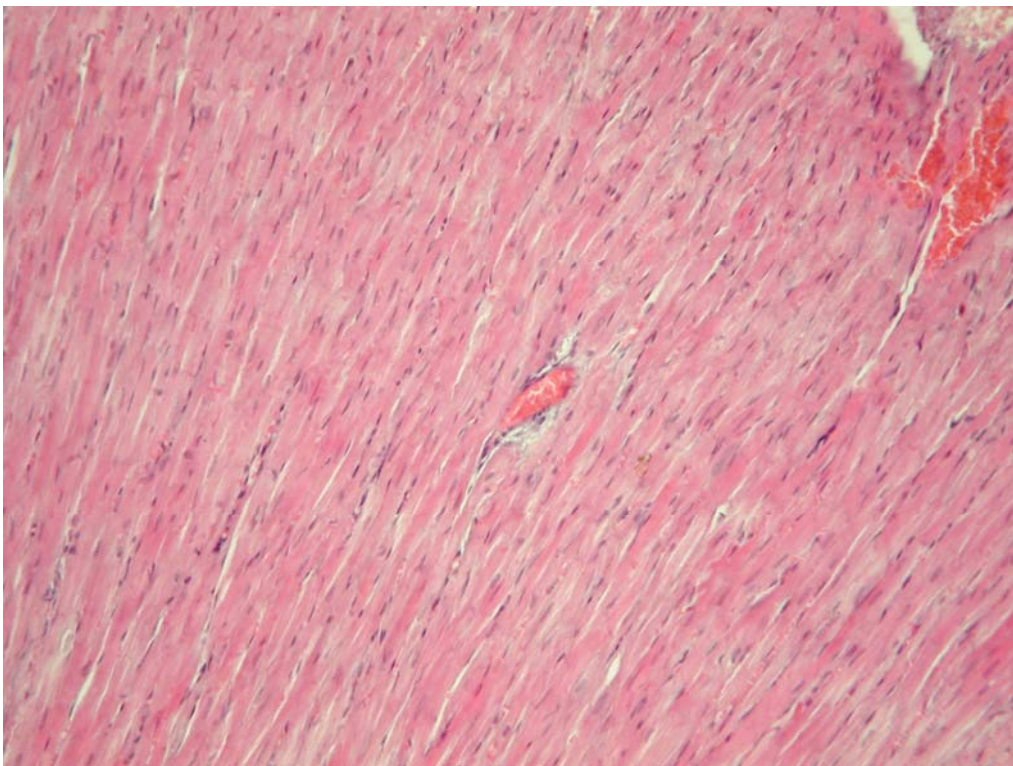


Abbildung 35 Rattenmyokard der Kontrollgruppe, Vergrößerung 20-fach

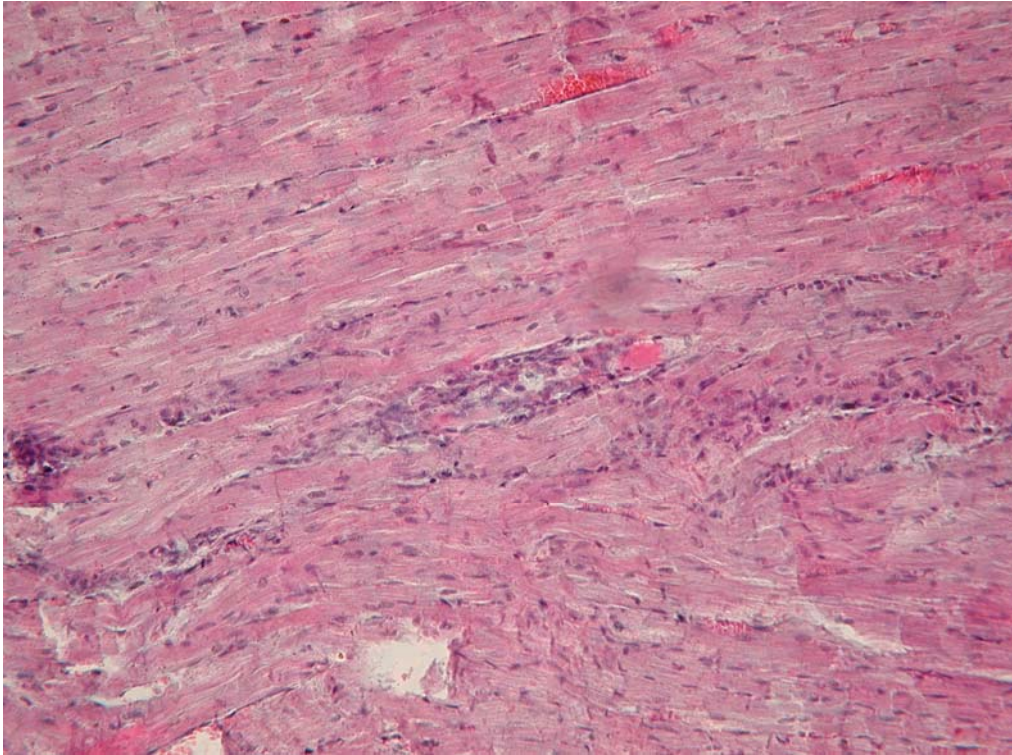


Abbildung 36 Rattenmyokard 30 Tage nach Behandlung mit Doxorubicin-Lösungen, Vergrößerung 20-fach

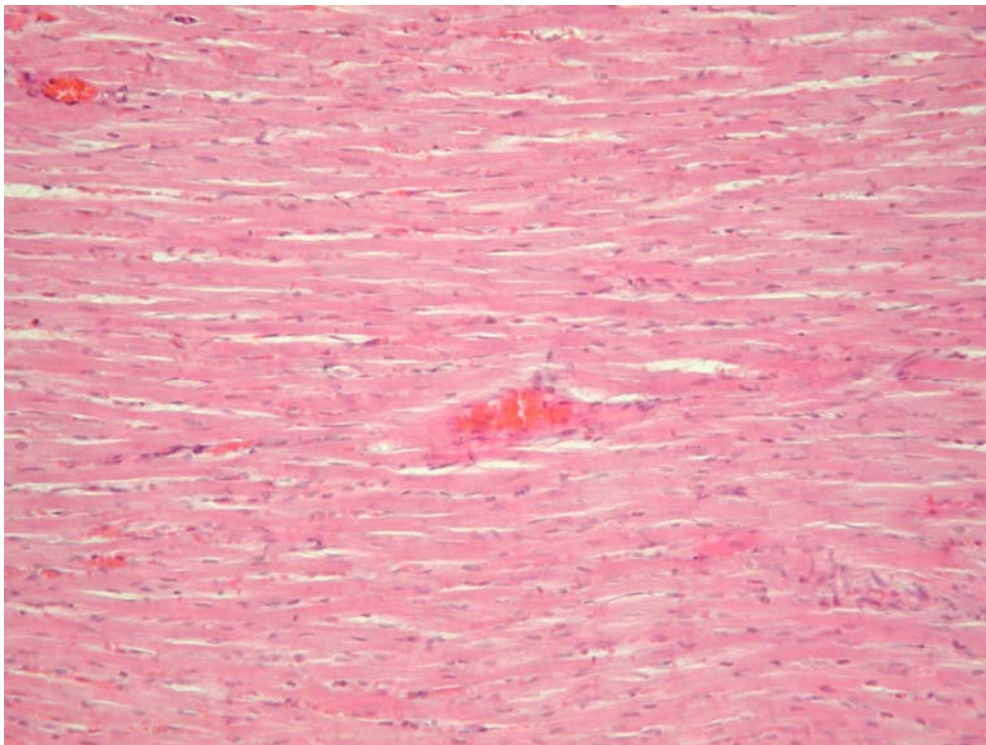


Abbildung 37 Rattenmyokard 30 Tage nach Behandlung mit Dxr-NP, Vergrößerung 20-fach



#### 4.4.4.2.3.2 Histologie des Hodengewebes

Die Untersuchung des Hodengewebes nach 15 Tagen ergab bei den mit Doxorubicin-Lösung behandelten Gruppen gut sichtbare Abnormalitäten, wie eine Desorganisation des spermatogenen Epithels und ein Zerfall des nuklearen Chromatins in einigen Tubuli (Abbildung 39). Nach 30 Tagen wurde der Einfluss der Lösungen noch deutlicher und das Hodengewebe zeigte eindeutige Degenerationen. Die meisten Tubuli wiesen tiefe Atrophien des Epithels auf und einige zeigten nekrotische Veränderungen (Abbildung 40). Der Effekt der Doxorubicin-beladenen HSA-NP auf das testikuläre Gewebe war nach 15 Tagen vergleichbar mit der Kontrollgruppe (Abbildung 38) und zeigte erst 30 Tage nach Behandlung leichte Atrophien des spermatogenen Epithels (Abbildung 41).

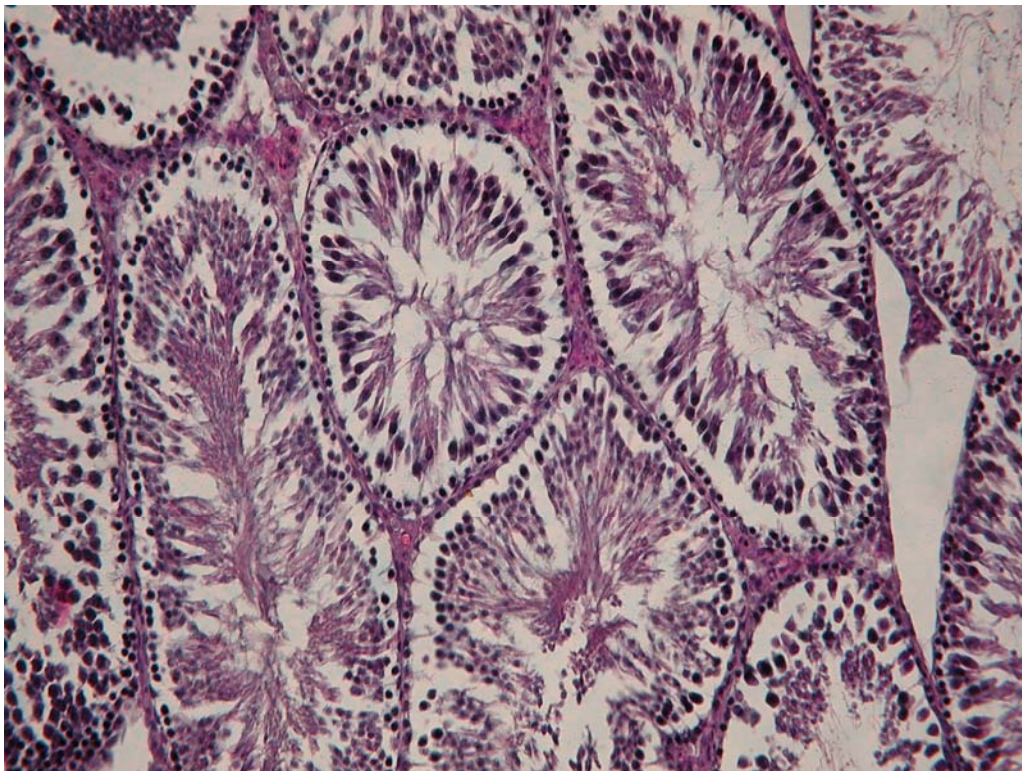


Abbildung 38 Hodengewebe der Kontrollgruppe, Vergrößerung 20-fach

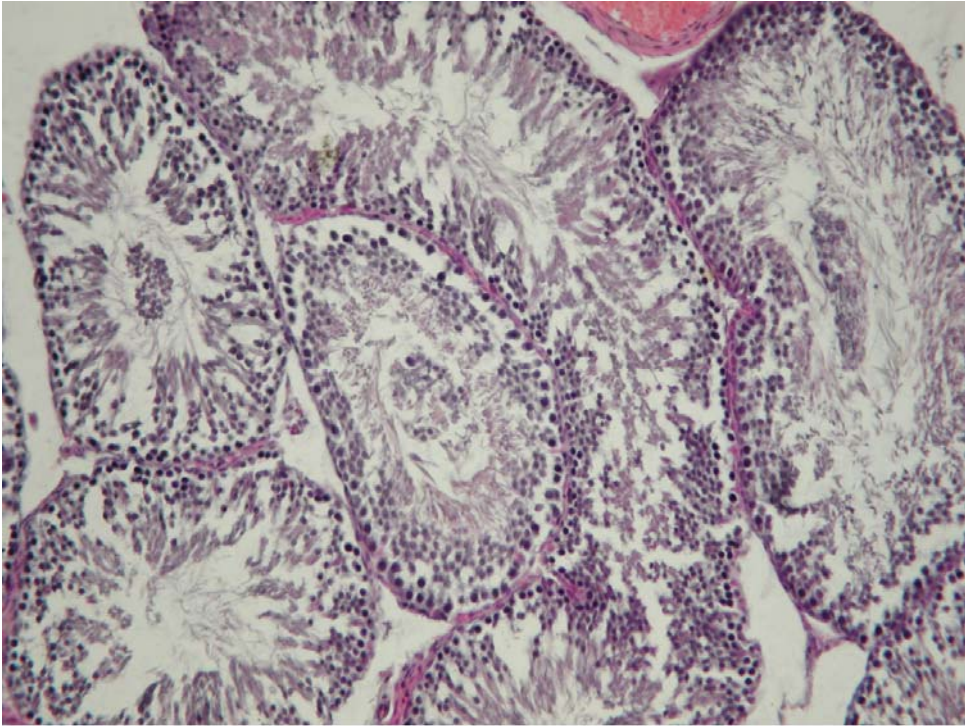


Abbildung 39 Hodengewebe 15 Tage nach Behandlung mit Doxorubicin-Lösung, Vergrößerung 20-fach

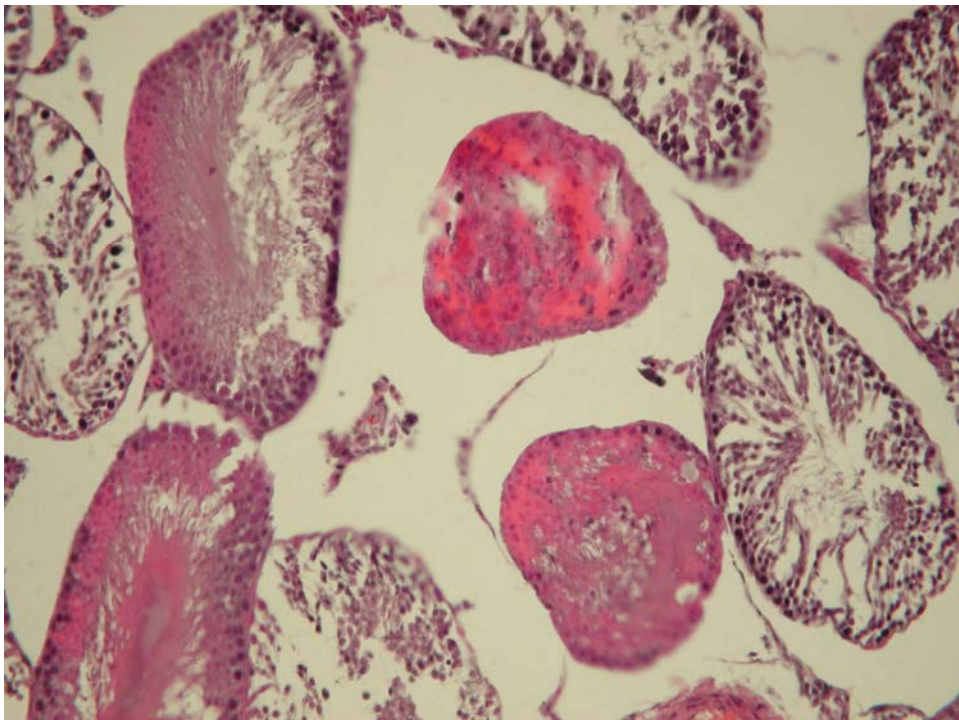


Abbildung 40 Hodengewebe 30 Tage nach Behandlung mit Doxorubicin-Lösung, Vergrößerung 20-fach



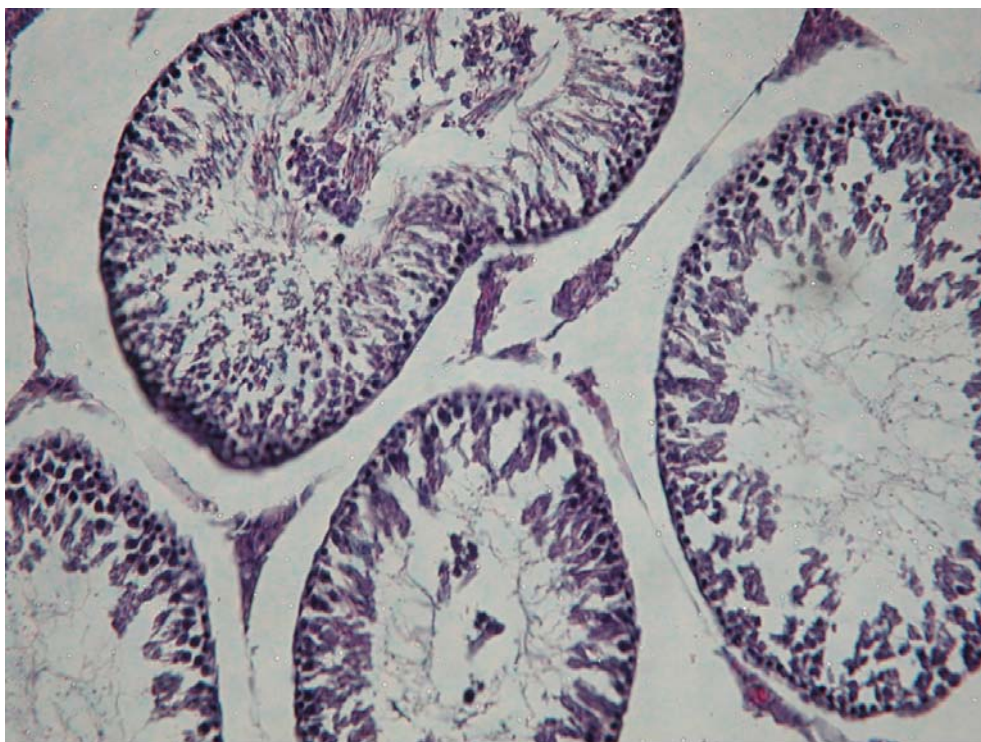


Abbildung 41 Hodengewebe 30 Tage nach Behandlung mit Dxr-NP, Vergrößerung 20-fach

#### 4.4.4.2.4 Schlussfolgerung

Die durchgeführte toxikologische Studie diente zum Vergleich der toxikologischen Profile der in dieser Arbeit entwickelten Doxorubicin-beladenen HSA-NP mit dem freien Arzneistoff. Die verschiedenen Formulierungen verursachten nur leichte Veränderungen in der mittleren Zunahme des Körpergewichts. Die hämatologischen Untersuchungen ergaben zwar bei allen Versuchsgruppen leichte Schwankungen, lagen aber insgesamt innerhalb des physiologischen Bereiches. Eine mögliche Erklärung für die geringe Toxizität ist die Aufteilung des Arzneistoffs in drei zeitversetzten Dosen. Die Bindung des Doxorubicins in die Matrix der HSA-NP reduzierte signifikant alle toxikologischen Erscheinungen im Vergleich zum freien Arzneistoff. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Formulierungen wurde besonders bei der histologischen Bewertung von Herz- und Hodengewebe sichtbar. Die nanopartikulären Zubereitungen zeigten eine signifikant geringere Kardiotoxizität, wohingegen die Lösungen des Arzneistoffs die für

Doxorubicin typischen pathologischen Veränderungen verursachten. Dieser histopathologische Befund wird durch die Ergebnisse der Elektrokardiographie unterstützt. Gleiches war bei der Begutachtung der Hoden der Fall. Hier bewirkten die Doxorubicin-Lösungen eindeutige Degenerationen bis hin zu Nekrosen, wohingegen die Dxr-NP erst nach 30 Tagen leichte Anzeichen einer Atrophie verursachten. Dieses Phänomen wurde bereits für liposomale und andere nanopartikuläre Formulierungen beobachtet (Couvreur et al., 1982a; Drummond et al., 1999) und scheint in Zusammenhang mit einer veränderten Körperverteilung des an das Trägersystem gebundenen Arzneistoffs zu stehen. Zudem zeigten die Dxr-NP mit inkorporiertem Doxorubicin, wie bereits unter Punkt 4.4.2.2.1 beschrieben, nur eine sehr geringe und langsame Freisetzung des Zytostatikums, was zu niedrigeren Spitzenplasmaspiegeln führte, was wiederum die Ursache für die geringere Toxizität sein könnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Bindung von Doxorubicin an HSA-NP zu einer verminderten hämatologischen, das Herz und die Hoden betreffenden Toxizität führte. Diese geringere Toxizität kann am Besten durch ein verändertes pharmakologisches und pharmakokinetisches Profil des in die Nanopartikel eingebundenen Arzneistoffs erklärt werden.



## 5 Zusammenfassung

Durch die physiologischen und morphologischen Besonderheiten der BHS wird das ZNS vom übrigen Organismus abgetrennt. Die BHS schützt das Gehirn vor dem Einfluss potentiell toxischer Substanzen im Blutstrom, ist dadurch aber auch gleichzeitig der limitierende Faktor bei der Therapie von Erkrankungen des ZNS. Die Entwicklung eines Drug-Delivery-Systems mit dem es möglich ist Arzneistoffe in das Gehirn einzuschleusen, stellt einen großen Fortschritt in der Behandlung zentraler Erkrankungen dar.

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Liganden-modifizierten Nanopartikeln auf Basis von HSA zur Überwindung der BHS. Als Drug-Targeting-Ligand wurde ApoE3 verwendet, welches sich schon in vorangegangenen Untersuchungen als potentieller Vektor zur Überwindung der BHS erwiesen hat. Zur Funktionsprüfung des Trägersystems wurde zunächst der Modellarzneistoff Loperamid, ein unter normalen Umständen nicht gehirngängiges Opioid, gebunden und der analgetische Effekt im Tiermodell untersucht. Die Entwicklung von Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln sollte das verwendete Drug-Targeting-Prinzip auf eine therapeutische Anwendung hin übertragen. Die neuartigen Zytostatika-beladenen Nanopartikel mussten entwickelt, charakterisiert und auf ihre Effektivität *in vitro* getestet werden. Daran schloss sich ein *In-vivo*-Versuch zur Behandlung von Gehirntumoren und eine toxikologische Studie in Ratten an.

### 5.1 Herstellung und Charakterisierung der ApoE3-modifizierten Nanopartikel

Zur routinemäßigen Herstellung des ApoE3-Trägersystems wurden Nanopartikel aus HSA mittels einer Desolvationsmethode hergestellt. Die so erhaltenen Partikel tragen auf ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen, die für proteinchemische Reaktionen zur Verfügung stehen. Über diese funktionellen Gruppen (Amino-Gruppen) war es möglich, unter Verwendung von bifunktionalen Crosslinkern, ApoE3 direkt kovalent an

das Trägersystem zu binden. Eine weitere Bindungsmöglichkeit von ApoE3 an die Nanopartikel bot das NAV-Biotin-System. Hier wurde im ersten Schritt NAV kovalent an die Partikel gebunden und anschließend biotinyliertes ApoE3 durch Komplexbindung an die Oberfläche der Nanopartikel gekoppelt. Die so erhaltenen ApoE3-modifizierten Nanopartikel lagen alle in einem Größenbereich von 200 bis 240 nm. Die direkte Bindung des Drug-Targeting-Liganden war mit beiden Systemen möglich und resultierte in einer Bindung von 8,0 bis 14,0 µg ApoE3 pro mg Nanopartikel.

### **5.2 Tail-Flick-Test Loperamid-beladener Nanopartikel**

Die hergestellten oberflächenmodifizierten Nanopartikel wurden im Tierversuch mit Hilfe des Tail-Flick-Tests auf ihr Gehirn-Targeting-Potential hin getestet. Hierfür wurden die Nanopartikel mit dem Modellarzneistoff Loperamid beladen und den Tieren verabreicht. In der Versuchsreihe A stellte sich heraus, dass alle nanopartikelären Zubereitungen, die ApoE3 an der Oberfläche trugen, in der Lage waren Loperamid in das ZNS der Versuchstiere zu transportieren und dort einen analgetischen Effekt zu erzeugen. Dabei spielte die Art der Bindung von ApoE3 oder das Molekulargewicht des verwendeten Crosslinkers keine Rolle bei der Wirksamkeit des Trägersystems. Alle getesteten Kontrollzubereitungen zeigten mit einer Ausnahme keinen Arzneistofftransport in das Gehirn. Überraschenderweise erzeugte die Kontrolle mit Loperamid-beladenen Nanopartikeln, die ApoE3 ungebunden in der Suspension enthielt einen deutlichen analgetischen Effekt.

Dieses unerwartete Ergebnis und Untersuchungen zur Desorption von Loperamid vom Trägersystem ließen darauf schließen, dass eine getrennte und zeitversetzte Applikation von Loperamid und ApoE3-NP oder einer ApoE3-Lösung einen analgetischen Effekt im Tiermodell erzeugen könnte.

Aus diesem Grund wurde in Versuchsreihe B ApoE3-NP bzw. eine ApoE3-Lösung getrennt und zeitversetzt zu einer Loperamid-Lösung

gespritzt. Diese getrennte Injektion erzeugte in beiden Fällen einen analgetischen Effekt im Tier, der aber bei zunehmendem Zeitabstand zwischen ApoE3-haltiger Zubereitung und Arzneistoff abflachte.

Die Frage, ob dieser schmerzstillende Effekt über die Bindung von Loperamid an Opioid-Rezeptoren im ZNS ausgelöst wird, konnte in Versuchsreihe C durch vorherige Injektion des Opioid-Antagonisten Naloxon bewiesen werden.

### **5.3 Doxorubicin-beladene Nanopartikel**

Die Versuche zur Beladung von HSA-NP mit Doxorubicin verliefen erfolgreich und resultierten in zwei Nanopartikelspezies. Zum einen wurden Nanopartikel mit adsorptiv gebundenem Doxorubicin hergestellt. Diese Partikel hatten eine Größe von 200 bis 240 nm mit einer maximalen Beladung von bis zu  $48,7 \pm 1,0 \mu\text{g}$  Doxorubicin pro mg Nanopartikel. Die Einbindung des Zytostatikums in die Partikelmatrix ergab Dxr-NP von 300 bis 400 nm. Die Beladung war hierbei stark abhängig von dem bei der Herstellung eingestellten pH-Wert, der verwendeten Arzneistoffmenge und dem Stabilisierungsgrad der Dxr-NP. Maximalwerte der Einbindung lagen bei  $48,2 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$  mit 200% quervernetzten Partikeln. Freisetzungsversuche mit diesen Dxr-NP zeigten, dass der Arzneistoff sehr stabil in die Matrix eingebunden ist und nach 24 h nur zu 8% freigesetzt wird. Die Aufbewahrung der Partikel in wässrigen Suspensionen für länger als ein Jahr war nicht möglich und zeigte deutliche Agglomerationen.

#### **5.3.1 In-vitro-Testung der Dxr-NP**

Bei In-vitro-Versuchen an Neuroblastomzellen sollte die Wirksamkeit des an die Nanopartikel gebundenen Doxorubicins überprüft werden. Es stellte sich heraus, dass alle nanopartikulären Zubereitungen eine starke antineoplastische Wirkung hatten. Diese zytotoxische Wirkung war sogar einer Lösung des reinen Arzneistoffs überlegen.

### 5.3.2 In-vivo-Testung der Dxr-NP

Die Kombination des ApoE3 Gehirn-Targeting-Prinzips mit Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln und deren Einsatz zur Behandlung von Gehirntumoren blieb ohne therapeutischen Erfolg. Weder Nanopartikel mit eingebundenem Zytostatikum noch Partikel mit adsorptiver Beladung zeigten eine signifikant bessere antitumorale Wirkung als eine Doxorubicin-Lösung. Lediglich bei mit Tween 80 überzogenen Partikeln konnte ein minimaler Erfolg verzeichnet werden. Mögliche Ursache für die ausbleibende Wirkung ist eine unzureichende Anreicherung der Dxr-NP im Gehirn oder eine unzureichende Anreicherung und Freisetzung des Arzneistoffs im Tumorgewebe.

Positivere Ergebnisse lieferte eine subchronische toxikologische Studie mit Dxr-NP. Die Zytostatika-beladenen Nanopartikel zeigten alle ein vorteilhaftes toxikologisches Profil im Vergleich zu einer Arzneistofflösung. Besonders die bei einer herkömmlichen Doxorubicin-Behandlung auftretenden Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität und Veränderungen des Blutbildes waren erheblich reduziert. Eine Erklärung hierfür ist ein verändertes pharmakologisches und pharmakokinetisches Profil von Doxorubicin in Kombination mit Nanopartikeln.

### 5.4 Fazit

Mit dem Drug-Targeting-Liganden ApoE3 ist es möglich die BHS von höheren Lebewesen zu überwinden. Hierbei ist eine direkte Bindung des Liganden an das Trägersystem nicht notwendig. Welchen Einfluss die Injektion von ApoE3-haltigen Zubereitungen auf die BHS der Versuchstiere hat, bleibt allerdings noch unklar. Diskutiert werden kann in diesem Zusammenhang die Bindung von ApoE3 an Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie und Auslösung einer Signaltransduktionskaskade in den Endothelzellen der BHS, was in einer Öffnung der Tight Junctions oder einer Hemmung von Pgp resultieren könnte. Auch die Bildung von Loperamid-ApoE3-Komplexen im Blut und deren rezeptorvermittelte

Transzytose bleibt weiterhin ein potentieller Transportmechanismus. Weitere Experimente zur Aufklärung des exakten Mechanismus bzw. des beteiligten Rezeptors sind daher notwendig.

Die Verwendung von Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln zur Therapie von Gehirntumoren scheint an der unzureichenden Freisetzung und/oder Konzentration der Dxr-NP im Tumor zu scheitern. Abhilfe könnte die Injektion von freiem ApoE3 in Kombination mit einer Doxorubicin-Lösung schaffen. Allerdings müsste dabei auf die toxikologischen Vorteile der Dxr-NP verzichtet werden. Denkbar wäre auch eine Kombination des hier verwendeten Gehirn-Targeting-Prinzips mit einem geeigneten Tumor-Targeting-Prinzip, um die Anreicherung der Dxr-NP im pathologischen Gewebe zu optimieren.

Des Weiteren ist eine Behandlung mit verringerten Nebenwirkungen von soliden Tumoren außerhalb des ZNS wie z.B. Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder malignes Melanom mit den hier entwickelten Dxr-NP möglich.

## 6 Literatur

Abbott, N. J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.*, 200, 629-638.

Allen, T. M., Hansen, C., 1991. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1068, 133-141.

Alyautdin, R. N., Gothier, D., Petrov, V. E., Kharkevich, D. A., Kreuter, J., 1995. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41, 44-48.

Alyautdin, R. N., Petrov, V. E., Langer, K., Berthold, A., Kharkevich, D. A., Kreuter, J., 1997. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.*, 14, 325-328.

Ambrosi, A., Khalansky, A. S., Yamamoto, H., Gelperina, S. E., Begley, D. J., Kreuter, J., 2006. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [<sup>14</sup>C]-poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. *J. Drug Target.*, 14, 97-105.

Anderlini, P., Benjamin, R. S., Wong, F. C., Kantarjian, H. M., Andreeff, M., Kornblau, S. M., O'Brien, S., Mackay, B., Ewer, M. S., Pierce, S. A., et al., 1995. Idarubicin cardiotoxicity: a retrospective study in acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J. Clin. Oncol.*, 13, 2827-2834.

Barraud, L., Merle, P., Soma, E., Lefrancois, L., Guerret, S., Chevallier, M., Dubernet, C., Couvreur, P., Trepo, C., Vitvitski, L., 2005. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *J. Hepatol.*, 42, 736-743.

Batist, G., Ramakrishnan, G., Rao, C. S., Chandrasekharan, A., Gutheil, J., Guthrie, T., Shah, P., Khojasteh, A., Nair, M. K., Hoelzer, K., Tkaczuk, K., Park, Y. C., Lee, L. W., 2001. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19, 1444-1454.

Beck, T., Ferger, D., Ferger, B., Fricke, U. 1982. Doxorubicin. Arzneistoff-Profile, Basisinformation über Arzneiliche Wirkstoffe, Govi-Verlag,

Begley, D. J., 2004a. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.*, 104, 29-45.

Begley, D. J. 2004b. Efflux mechanisms in the central nervous system: a powerful influence on drug distribution within the brain. *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease*, San Diego, Elsevier,

Bhutta, T. I., Tahir, K. I., 1990. Loperamide poisoning in children. *Lancet*, 335, 363.

Birrenbach, G., Speiser, P. P., 1976. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J. Pharm. Sci.*, 65, 1763-1766.

Bodor, N., Buchwald, P., 2003. Brain-targeted drug delivery: experiences to date. *Am. J. Drug. Targ.*, 1, 13-26.

Brightman, M. W., Reese, T. S., 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell. Biol.*, 40, 648-677.

Butt, A. M., Jones, H. C., Abbott, N. J., 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol.*, 429, 47-62.

Carter, D. C., Ho, J. X., 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, 45, 153-203.

Chen, H., Gaul, F., Guo, D., Maycock, A., 2000. Determination of loperamide in rat plasma and bovine serum albumin by LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22, 555-561.

Cinatl, J., Cinatl, J., Mainke, M., Weissflog, A., Steigmann, G., Rabenau, H., Doerr, H. W., Kornhuber, B., 1992. Aphidicolin selectively kills neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett.*, 67, 199-206.

Configliacchi, E., Razzano, G., Rizzo, V., Vigevani, A., 1996. HPLC methods for the determination of bound and free doxorubicin, and of bound and free galactosamine, in methacrylamide polymer-drug conjugates. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 123-129.

Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., Speiser, P., 1982a. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, 71, 790-792.

Couvreur, P., Roland, M., Speiser, P., 1982b, Biodegradable submicroscopic particles containing a biologically active substance and compositions containing them., US Patent, 4,329,332

Cusack, B. J., Young, S. P., Driskell, J., Olson, R. D., 1993. Doxorubicin and doxorubicinol pharmacokinetics and tissue concentrations following bolus injection and continuous infusion of doxorubicin in the rabbit. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 32, 53-58.

Cuvier, C., Roblot-Treupel, L., Millot, J. M., Lizard, G., Chevillard, S., Manfait, M., Couvreur, P., Poupon, M. F., 1992. Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 44, 509-517.

da Cruz, M. T., Simoes, S., de Lima, M. C., 2004. Improving lipoplex-mediated gene transfer into C6 glioma cells and primary neurons. *Exp. Neurol.*, 187, 65-75.



Damascelli, B., Cantu, G., Mattavelli, F., Tamplenizza, P., Bidoli, P., Leo, E., Dosio, F., Cerrotta, A. M., Di Tolla, G., Frigerio, L. F., Garbagnati, F., Lanocita, R., Marchiano, A., Patelli, G., Spreafico, C., Ticha, V., Vespro, V., Zunino, F., 2001. Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity. *Cancer*, 92, 2592-2602.

Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., Del Tacca, M., 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, 41, 431-444.

Davignon, J., Gregg, R. E., Sing, C. F., 1988. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 8, 1-21.

de Boer, A. G., van der Sandt, I. C., Gaillard, P. J., 2003. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 629-656.

Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M. P., Pierce, A., Torpier, G., Cecchelli, R., 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.*, 138, 877-889.

Dergunov, A. D., 2004. Apolipoprotein E structure and substrate and receptor-binding activities of triglyceride-rich human plasma lipoproteins in normo- and hypertriglyceridemia. *Biochemistry (Mosc)*, 69, 720-737.

Donelli, M. G., Zucchetti, M., D'Incalci, M., 1992. Do anticancer agents reach the tumor target in the human brain? *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 30, 251-260.

Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., Papahadjopoulos, D., 1999. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.*, 51, 691-743.

Duncan, R., 2003. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 347-360.

Duncan, R., Vicent, M. J., Greco, F., Nicholson, R. I., 2005. Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 12 Suppl 1, S189-199.

Eatock, M., Church, N., Harris, R., Angerson, W., McArdle, C., French, R., Twelves, C., 1999. Activity of doxorubicin covalently bound to a novel human serum albumin microcapsule. *Invest. New Drugs*, 17, 111-120.

Ehrlich, P., 1885. *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus; Eine Farbenanalytische Studie*. Berlin: Hirschwald.

Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77.

Erdlenbruch, B., Schinkhof, C., Kugler, W., Heinemann, D. E., Herms, J., Eibl, H., Lakomek, M., 2003. Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 139, 685-694.

Farese, R. V., Jr., Herz, J., 1998. Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet.*, 14, 115-120.

Feinstein, S. B., Cheirif, J., Ten Cate, F. J., Silverman, P. R., Heidenreich, P. A., Dick, C., Desir, R. M., Armstrong, W. F., Quinones, M. A., Shah, P. M., 1990. Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 16, 316-324.

Fellner, S., Bauer, B., Miller, D. S., Schaffrik, M., Fankhanel, M., Spruss, T., Bernhardt, G., Graeff, C., Farber, L., Gschaidmeier, H., Buschauer, A., Fricker, G., 2002. Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.*, 110, 1309-1318.

Freundlich, H., 1907. Über die Adsorption in Lösungen. *Z. Phys. Chem.*, 57, 385-470.

Fricker, G., Miller, D. S., 2004. Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. *Pharmacology*, 70, 169-176.

Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A., Barenholz, Y., 1994a. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.*, 54, 987-992.

Gabizon, A., Isacson, R., Libson, E., Kaufman, B., Uziely, B., Catane, R., Ben-Dor, C. G., Rabello, E., Cass, Y., Peretz, T., et al., 1994b. Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta. Oncol.*, 33, 779-786.

Gabizon, A. A., 1994. Liposomal anthracyclines. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 8, 431-450.

Gebbia, N., Leto, G., Gagliano, M., Tumminello, F. M., Rausa, L., 1985. Lysosomal alterations in heart and liver of mice treated with doxorubicin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 15, 26-30.

Gee, J. R., Keller, J. N., 2005. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37, 1145-1150.

Gelperina, S. E., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Smirnova, Z. S., Bobruskin, A. I., Severin, S. E., Turowski, B., Zanella, F. E., Kreuter, J., 2002. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. *Toxicol. Lett.*, 126, 131-141.

Geny, B., Mettauer, B., Muan, B., Bischoff, P., Epailly, E., Piquard, F., Eisenmann, B., Haberey, P., 1993. Safety and efficacy of a new transpulmonary echo contrast agent in echocardiographic studies in patients. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 22, 1193-1198.

Goldman, E. E., 1909. Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. *Beitr. Klin. Chir.*, 64, 192-265.

Gradishar, W. J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M., O'Shaughnessy, J., 2005. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23, 7794-7803.

Gulyaev, A. E., Gelperina, S. E., Skidan, I. N., Antropov, A. S., Kivman, G. Y., Kreuter, J., 1999. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.*, 16, 1564-1569.

Haluska, M., Anthony, M. L., 2004. Osmotic blood-brain barrier modification for the treatment of malignant brain tumors. *Clin. J. Oncol. Nurs.*, 8, 263-267.

Hau, P., Fabel, K., Baumgart, U., Rummele, P., Grauer, O., Bock, A., Dietmaier, C., Dietmaier, W., Dietrich, J., Dudel, C., Hubner, F., Jauch, T., Drechsel, E., Kleiter, I., Wismeth, C., Zellner, A., Brawanski, A., Steinbrecher, A., Marienhagen, J., Bogdahn, U., 2004. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer*, 100, 1199-1207.

Henke, D. 2006. Doxorubicinhydrochlorid. Kommentar zum Deutschen Arzneibuch, Stuttgart, Govi-Verlag,

Herz, J., Bock, H. H., 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 405-434.

Herz, J., Marschang, P., 2003. Coaxing the LDL receptor family into the fold. *Cell*, 112, 289-292.

Hiller, Y., Gershoni, J. M., Bayer, E. A., Wilchek, M., 1987. Biotin binding to avidin. Oligosaccharide side chain not required for ligand association. *Biochem. J.*, 248, 167-171.

Hoffmann, M., Scharnagl, H., Panagiotou, E., Banghard, W., Wieland, H., Marz, W., 2001. Diminished LDL receptor and high heparin binding of apolipoprotein E2 Sendai associated with lipoprotein glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12, 524-530.

Holten, C. H., 1957. Inhibitory effect of benactyzine derivatives and other compounds on the Straub-Herrmann mouse tail reaction due to morphine. *Acta. Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, 13, 113-124.

Huwylar, J., Wu, D., Pardridge, W. M., 1996. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93, 14164-14169.

Iablonovskaia, L., Spryshkova, N. A., 1970. [Morphologic and biologic characteristics of experimental tumors of the cerebellum in rats]. *Arkh. Patol.*, 33, 50-53.

Ibrahim, N. K., Desai, N., Legha, S., Soon-Shiong, P., Theriault, R. L., Rivera, E., Esmaeli, B., Ring, S. E., Bedikian, A., Hortobagyi, G. N., Ellerhorst, J. A., 2002. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin. Cancer Res.*, 8, 1038-1044.

Iga, K., Ogawa, Y., Toguchi, H., 1993. Rates of systemic degradation and reticuloendothelial system (RES) uptake of thermosensitive liposome encapsulating cisplatin in rats. *Pharm. Res.*, 10, 1332-1337.

Isabel, G., Wright, D. M., Henry, J. L., 1981. Design for an inexpensive unit for measuring tail flick latencies. *J. Pharmacol. Methods*, 5, 241-247.

Juliano, R. L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 152-162.

Kemper, E. M., Boogerd, W., Thuis, I., Beijnen, J. H., van Tellingen, O., 2004. Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat. Rev.*, 30, 415-423.

Kirpotin, D. B., Drummond, D. C., Shao, Y., Shalaby, M. R., Hong, K., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Benz, C. C., Park, J. W., 2006. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.*, 66, 6732-6740.

Klugmann, F. B., Decorti, G., Mallardi, F., Klugmann, S., Baldini, L., 1984. Effect of polyethylene glycol 400 on adriamycin toxicity in mice. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 20, 405-410.

Kostner, G., März, W. 2001. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, Stuttgart, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1-57

Koukourakis, M. I., Koukouraki, S., Fezoulidis, I., Kelekis, N., Kyrias, G., Archimandritis, S., Karkavitsas, N., 2000. High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *Br. J. Cancer*, 83, 1281-1286.

Kratz, F., 2007. DOXO-EMCH (INNO-206): the first albumin-binding prodrug of doxorubicin to enter clinical trials. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 16, 855-866.

Kratz, F., Beyer, U., Collery, P., Lechenault, F., Cazabat, A., Schumacher, P., Falken, U., Unger, C., 1998a. Preparation, characterization and in vitro efficacy of albumin conjugates of doxorubicin. *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 56-61.

Kratz, F., Beyer, U., Roth, T., Tarasova, N., Collery, P., Lechenault, F., Cazabat, A., Schumacher, P., Unger, C., Falken, U., 1998b. Transferrin conjugates of doxorubicin: synthesis, characterization, cellular uptake, and in vitro efficacy. *J. Pharm. Sci.*, 87, 338-346.

Kratz, F., Beyer, U., Schumacher, P., Krüger, M., Zahn, H., 1997. Synthesis of new maleinimid derivatives of daunorubicin and biological activity of acid labile transferrin conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, 617-622.

Kratz, F., Ehling, G., Kauffmann, H. M., Unger, C., 2007. Acute and repeat-dose toxicity studies of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH), an albumin-binding prodrug of the anticancer agent doxorubicin. *Hum. Exp. Toxicol.*, 26, 19-35.

Krause, H. J., Schwarz, A., Rohdewald, P., 1985. Polylactic acid nanoparticles, a colloidal drug delivery system for lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.*, 27, 145-155.

Kreuter, J., 1983. Evaluation of nanoparticles as drug delivery systems

I: Preparation methods. *Pharm. Acta. Helv.*, 58, 196-209.

Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ramge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R., 2002. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug Target.*, 10, 317-325.

Kreuter, J., Speiser, P. P., 1976. In vitro studies of poly(methyl methacrylate) adjuvants. *J. Pharm. Sci.*, 65, 1624-1627.

Kreutzmann, K., Langner, A. 2006. Naloxonhydrochlorid-Dihydrat. Kommentar zum Deutschen Arzneibuch, Stuttgart, Govi-Verlag,

Krewson, C. E., Klarman, M. L., Saltzman, W. M., 1995. Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Res.*, 680, 196-206.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Langer, K., Anhorn, M. G., Steinhauser, I., Dreis, S., Celebi, D., Schrickel, N., Faust, S., Vogel, V., 2007. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *Int. J. Pharm.*, in press.

Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H., Schubert, D., 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 257, 169-180.

Langer, K., Coester, C., Weber, C., von Briesen, H., Kreuter, J., 2000. Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 49, 303-307.

Leo, E., Cameroni, R., Forni, F., 1999. Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin-gelatin nanoparticle conjugates. *Int. J. Pharm.*, 180, 23-30.

Leo, E., Vandelli, M. A., Cameroni, R., Forni, F., 1997. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. *Int. J. Pharm.*, 155, 75-82.

Li, Y., Ogris, M., Wagner, E., Pelisek, J., Ruffer, M., 2003. Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.*, 259, 93-101.

Lück, M., 1997, Plasmaproteinadsorption als möglicher Schlüsselfaktor für eine

kontrollierte Arzneistoffapplikation mit partikulärenträgern, Berlin, Freie Universität Berlin. Dissertation

Lück, M., Schröder, W., Harnisch, S., Thode, K., Blunk, T., Paulke, B. R., Kresse, M., Müller, R. H., 1997. Identification of plasma proteins facilitated by enrichment on particulate surfaces: analysis by two-dimensional electrophoresis and N-terminal microsequencing. *Electrophoresis*, 18, 2961-2967.

Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Rel.*, 65, 271-284.

Marty, J. J., Oppenheim, R. C., Speiser, P., 1978. Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv*, 53, 17-23.

Mazel, M., Clair, P., Rousselle, C., Vidal, P., Scherrmann, J. M., Mathieu, D., Tamsamani, J., 2001. Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. *Anticancer Drugs*, 12, 107-116.

Michaelis, K., 2005, Entwicklung und Untersuchung von Apolipoprotein modifizierten Albumin-Nanopartikeln zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität. Dissertation



Michaelis, K., Hoffmann, M. M., Dreis, S., Herbert, E., Alyautdin, R. N., Michaelis, M., Kreuter, J., Langer, K., 2006. Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317, 1246-1253.

Michaelis, M., Suhan, T., Cinatl, J., Driever, P. H., Cinatl, J., Jr., 2004. Valproic acid and interferon-alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.*, 25, 1795-1799.

Molday, R. S., Dreyer, W. J., Rembaum, A., Yen, S. P., 1974. Latex spheres as markers for studies of cell surface receptors by scanning electron microscopy. *Nature*, 249, 81-82.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.

Neault, J. F., Tajmir-Riahi, H. A., 1998. Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1384, 153-159.

Newman, M. S., Colbern, G. T., Working, P. K., Engbers, C., Amantea, M. A., 1999. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43, 1-7.

Nimpf, J., Schneider, W. J., 2000. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1529, 287-298.

Novak, S., Hiesberger, T., Schneider, W. J., Nimpf, J., 1996. A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J. Biol. Chem.*, 271, 11732-11736.

Oppenheim, R. C., Stewart, N. F., 1979. The manufacture and tumor cell uptake of nanoparticles labelled with fluorescein isothiocyanate. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 5, 583-591.

Pardridge, W. M., 1991. Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 291, 43-53.

Pardridge, W. M., 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.*, 2, 3-14.

Purcell, M., Neault, J. F., Tajmir-Riahi, H. A., 2000. Interaction of taxol with human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1478, 61-68.

Rahman, A., Fumagalli, A., Barbieri, B., Schein, P. S., Casazza, A. M., 1986. Antitumor and toxicity evaluation of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 16, 22-27.

Rahman, A., Husain, S. R., Siddiqui, J., Verma, M., Agresti, M., Center, M., Safa, A. R., Glazer, R. I., 1992. Liposome-mediated modulation of multidrug resistance in human HL-60 leukemia cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 1909-1915.

Rajaonarivony, M., Vauthier, C., Couarraze, G., Puisieux, F., Couvreur, P., 1993. Development of a new drug carrier made from alginate. *J. Pharm. Sci.*, 82, 912-917.

Ransom, C. B., Sontheimer, H., 1995. Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in rat spinal cord astrocytes. *J. Neurophysiol.*, 73, 333-346.

Rapoport, S. I., 2001. Advances in osmotic opening of the blood-brain barrier to enhance CNS chemotherapy. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 10, 1809-1818.

Robert, J., 1987. Continuous infusion or intravenous bolus: what is the rationale for doxorubicin administration? *Cancer Drug Deliv.*, 4, 191-199.

Rücker, G., Egerer, H. 2006. Loperamidhydrochlorid. Kommentar zum Deutschen Arzneibuch, Stuttgart, Govi-Verlag,

Ryberg, M., Nielsen, D., Skovsgaard, T., Hansen, J., Jensen, B. V., Dombernowsky, P., 1998. Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 16, 3502-3508.

Sadeque, A. J., Wandel, C., He, H., Shah, S., Wood, A. J., 2000. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 68, 231-237.

Safra, T., Muggia, F., Jeffers, S., Tsao-Wei, D. D., Groshen, S., Lyass, O., Henderson, R., Berry, G., Gabizon, A., 2000. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m<sup>2</sup>. *Ann. Oncol.*, 11, 1029-1033.

Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A., van Deemter, L., 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.*, 97, 2517-2524.

Schroeder, U., Sommerfeld, P., Ulrich, S., Sabel, B. A., 1998. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, 87, 1305-1307.

Seymour, L. W., Ulbrich, K., Strohmalm, J., Kopecek, J., Duncan, R., 1990. The pharmacokinetics of polymer-bound adriamycin. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1125-1131.

Smith, P., 1995. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.

Smith, Q. R., Stoll, J. 1999. Molecular characterization of amino acid transporters at the blood brain barrier. *Brain Barrier Systems. Alfred Benzon Symposium vol. 45., Copenhagen, 303-320*

Soma, C. E., Dubernet, C., Barratt, G., Nemati, F., Appel, M., Benita, S., Couvreur, P., 1999. Ability of doxorubicin-loaded nanoparticles to overcome multidrug resistance of tumor cells after their capture by macrophages. *Pharm. Res., 16, 1710-1716.*

Steiniger, S. C., Kreuter, J., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Bobruskin, A. I., Smirnova, Z. S., Severin, S. E., Uhl, R., Kock, M., Geiger, K. D., Gelperina, S. E., 2004. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer, 109, 759-767.*

Tanaka, T., Shiramoto, S., Miyashita, M., Fujishima, Y., Kaneo, Y., 2004. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *Int. J. Pharm., 277, 39-61.*

Terasaki, T., Hosoya, K., 1999. The blood-brain barrier efflux transporters as a detoxifying system for the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev., 36, 195-209.*

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 76, 4350-4354.*

Traut, R. R., Bollen, A., Sun, T. T., Hershey, J. W., Sundberg, J., Pierce, L. R., 1973. Methyl 4-mercaptobutyrimidate as a cleavable cross-linking reagent and its application to the *Escherichia coli* 30S ribosome. *Biochemistry, 12, 3266-3273.*

Wang, J. P., Maitani, Y., Takayama, K., Nagai, T., 2000. Pharmacokinetics and antitumor effect of doxorubicin carried by stealth and remote loading proliposome. *Pharm. Res., 17, 782-787.*

Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., Langer, K., 2004a. Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *J. Drug Target., 12, 461-471.*

- Wartlick, H., Spänkuch-Schmitt, B., Strebhardt, K., Kreuter, J., Langer, K., 2004b. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J. Control. Rel.*, 96, 483-495.
- Weber, C., Kreuter, J., Langer, K., 2000. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 196, 197-200.
- Wei, R. D., Wright, L. D., 1964. Heat stability of avidin and avidin-biotin complex and influence of ionic strength on affinity of avidin for biotin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117, 341-344.
- Weisgraber, K. H., Roses, A. D., Strittmatter, W. J., 1994. The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr. Opin. Lipidol.*, 5, 110-116.
- Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J., Thorpe, G. H., 1979. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.*, 25, 1531-1546.
- Wood, M. J., Irwin, W. J., Scott, D. K., 1990. Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 15, 291-300.
- Yoo, H. S., Oh, J. E., Lee, K. H., Park, T. G., 1999. Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharm. Res.*, 16, 1114-1118.
- Zhang, Y., Jeong Lee, H., Boado, R. J., Pardridge, W. M., 2002. Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J. Gene. Med.*, 4, 183-94.

## 7 Anhang

### 7.1 Materialien und Geräte

#### 7.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage Supermicro S4	Sartorius
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Minizentrifuge Galaxy	VWR
Schlauchpumpe IPN	Ismatec
Peristaltic Pump 12000 Varioperpex	LKB Bromma
Rührplatte Variomag Multipoint	Komet
Analysenwaage AB204	Mettler Toledo
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Ultraschallbad Sonorex RK102H	Bandelin
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Zetasizer 3000HS <sub>A</sub>	Malvern
Trockenschrank TKE117	Ehret
Laminar Flow HERASafe	Heraeus
MilliQplus	Millipore
Spectrophotometer U-3000	Hitachi
Multiwell-Scanning-Spectrometer GENios	Tecan
Mini-Protean-II-Apparatur	Bio-RAD
Tail-Flick-Analgesia Meter	Ugo Basile

## HPLC Merck Hitachi:

- Interface D-7000
- Autosampler D-7200
- Pump L-7120
- UV-VIS-Detector L-7420
- FL-Detector L-7455
- Säulen:
  - Luna C18(2) 250x4,6 mm Phenomenex
  - LiChroCart<sup>®</sup> 250-4 LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 Merck
- Software HPLC-System-Manager

## 7.1.2 Verbrauchsmaterialien

D-Salt <sup>®</sup> Dextran Desalting Columns	Pierce
Ultrafree-MC Zentrifugenfilter Biomax <sup>®</sup> 30	Amicon
Cuvettes No./REF 67.754	Sarstedt
Omnifix <sup>®</sup> -F 1 ml Feindosierspritze	Braun
Sterican <sup>®</sup> -Kanüle No.8	Braun
Aluminium Micro Weighing Dishes	Lüdi AG/VWR

## 7.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Humanes Serum Albumin Fraktion V	Sigma Aldrich
Ethanol 96%	Merck
Glutaraldehyd 25%	Fluka
NeutrAvidin (NAV)	Pierce

## Anhang

PFP-Biotin	Pierce
2-Iminothiolan·HCl, (Traut's-Reagenz)	Pierce
5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure), (Ellman's-Reagenz)	Pierce
L-Cystein·HCl	Sigma Aldrich
NHS-PEG-MAL 3400	Nektar
NHS-PEG-MAL 5000	Nektar
mPEG-SPA 5000	Nektar
MicroBCA-Assay Protein Quantification Kit	Uptima
Loperamid·HCl	Sigma Aldrich
Doxorubicin·HCl	Sicor
Tween 80	ICI Chemicals
Acetonitril	Merck
Trifluoressigsäure	Fluka
Dimethylsulfoxid	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck
0,01M Natriumhydroxid-Lösung	Merck
Natriumethylendiamintetraacetat (NaEDTA)	Caelo
Ampuwa <sup>®</sup>	Fresenius Kabi
Isotone Kochsalz-Lösung	Braun



## 7.1.4 Puffer und Fließmittel

Phosphatpuffer pH 8,0	Natriumdihydrogenphosphat 2H <sub>2</sub> O	0,20 g
	Dinatriumhydrogenphosphat 2H <sub>2</sub> O	3,53 g
	Ultrareines Wasser	ad 1000 ml

Phosphatpuffer pH 7,5	Natriumdihydrogenphosphat H <sub>2</sub> O	2,30 g
	Dinatriumhydrogenphosphat 2H <sub>2</sub> O	16,80 g
	NaEDTA	3,72 g
	Ultrareines Wasser	ad 1000 ml

Phosphatpuffer pH 7,0	Natriumdihydrogenphosphat H <sub>2</sub> O	1,069 g
	Dinatriumhydrogenphosphat 2H <sub>2</sub> O	2,158 g
	Natriumchlorid	8,766 g
	Ultrareines Wasser	ad 1000 ml

## HPLC-Fließmittel Loperamid pH 4,0 bis 5,0

Komponente A 60%	Natriumdihydrogenphosphat 2H <sub>2</sub> O	3,120 g
	Ultrareines Wasser	ad 1000 ml
Komponente B 40%	Acetonitril	1000 ml

## HPLC-Fließmittel Doxorubicin pH ≤ 3,0

Komponente A 70%	Ultrareines Wasser	1000 ml
	Trifluoressigsäure	0,1%
Komponente B 30%	Acetonitril	1000 ml
	Trifluoressigsäure	0,1%

## 7.1.5 Zellen

UKF-NB3-Zelllinie: Humane Neuroblastomzellen des Universitätsklinikums Frankfurt aus Metastasen von Evans stage 4 Neuroblastomen

IMR-32-Zelllinie: Humane Neuroblastomzellen der Firma ATCC (Manassass, VA, USA)

## Anhang

### 7.1.6 Tiere

Auszucht-Ratten Wistar (CrI:WI)	Charles River Laboratories
Auszucht-Mäuse ICR (CD-1)	Harlan Winkelmann
Mäuse Serum ICR (CD1)	Harlan Winkelmann

### 7.2 Verwendete Abkürzungen

ABC	ATP-binding-Casette
AMT	adsorptiv vermittelter Transport
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE3	Apolipoprotein E3
ApoE3-NAV-NP	ApoE3-NAV-Nanopartikel
ApoE3-PEG-NP	ApoE3-PEG-Nanopartikel
ApoER2	ApoE-Rezeptor2
BCA	Bicinchoninic acid
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CMT	Carrier vermittelter Transport
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMBA	$\alpha$ -Dimethylbenzanthracene

DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)
Dxr-Lsg	Doxorubicin-Lösung
Dxr-NP	Doxorubicin-Nanopartikel
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EPR-Effekt	Enhanced Permeability and Retention Effekt
FBS	fötales Kälberserum
GI	Gewichts-Index
HDL	High Density Lipoprotein
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamid
HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	Humanes Serum Albumin
HSA-NP	HSA-Nanopartikel
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration 50%
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LRP	LDL-Rezeptor-related-Protein
%MPE	% Maximal Possible Effect
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
NAV	Neutravidin
NAV-PEG-NP	NAV-PEG-Nanopartikel

## Anhang

NHS	N-Hydroxy-Succinimid
PAA	Poly(acrylamid)
PBCA	Poly(butylcyanoacrylat)
PBCA-NP	Poly(butylcyanoacrylat)-Nanopartikel
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie
PEG	Polyethylenglykol
Pgp	Para-Glykoprotein
PIBCA	Poly(isobutylcyanoacrylat)
PIHCA	Poly(isohexylcyanoacrylat)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolsäure)
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
RES	Retikuloendotheliales-System
RMT	Rezeptor vermittelter Transport
SH-Gruppen	Sulfhydryl-Gruppen
TEER	transendothelialer Widerstand
TNB	2-Nitro-Thiobenzoessäure
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDLR	VLDL-Rezeptor
WB	Western-Blot
ZNS	zentrales Nervensystem

### 7.3 Lebenslauf

#### Daten

Name: Sebastian Heinrich Dreis  
Geburtstag: 13. Oktober 1977  
Geburtsort: Mainz

#### Wissenschaftlicher Werdegang

16/10/04 Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main.

12/12/03 Approbation als Apotheker

21/11/03 3.Staatsexamen (Note 1,5)

Seit 11/03 Annahme als Doktorand an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

05/03 – 10/03 Pharmaziepraktikant in der Sophien-Apotheke Koblenz

11/02 – 04/03 Pharmaziepraktikant bei der Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG im Bereich Pharmazeutische Forschung und Entwicklung in Biberach

17/10/02 2. Staatsexamen (Note 1,75)

25/08/00 1. Staatsexamen (Note 2,25)

03/00 4-wöchige Famulatur in der Amts-Apotheke in Nastätten

08/99 4-wöchige Famulatur im Bundeswehr-Zentral-Krankenhaus in Koblenz

10/98 Beginn des Studiums der Pharmazie, Johannes Gutenberg–Universität in Mainz

Anhang

## Wehrdienst

11/97 – 08/98 Fernmelderegiment 920, Hunsrück Kaserne, Kastellaun

## Schule

25/06/97 Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Note 1,8)

08/88 – 06/97 Wilhelm Hoffmann-Gymnasium, St. Goarshausen

08/84 Mühlbach-Schule (Grundschule), Miehlen

## 7.4 Publikationsliste

Kerstin Michaelis, Michael M Hoffmann, Sebastian Dreis, Elisabeth Herbert, Renad N Alyautdin, Martin Michaelis, Joerg Kreuter, Klaus Langer. **Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin-nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006; 317(3):1246-1253.

Jörg Kreuter, Telli Hekmatara, Sebastian Dreis, Tikva Vogel, Klaus Langer, Svetlana Gelperina. **Covalent attachment of apolipoprotein A-1 and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain.** J. Control. Release 2007; 118(1): 54-58.

E. Pereverzeva, I. Treschalin, D. Bodyagin, O. Maksimenko, K. Langer, S. Dreis, B. Asmussen, J. Kreuter, S. Gelperina, **Influence of the formulation on the tolerance profile of the nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: Focus on cardio- and testicular toxicity.** Int. J. Pharma. 2007 Jun 7th; 337(1-2): 346-356.

S. Dreis, F. Rothweiler, M. Michaelis, J. Cinatl jr., J. Kreuter, K. Langer. **Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles.** Int. J. Pharm. 2007; 341 (1-2): 207-214

K. Langer, M.G. Anhorn, I. Steinhauser, S. Dreis, D. Celebi, N. Schrickel, S. Faust, V. Vogel. **Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation.** Int. J. Pharm. 2007 in press.

## 7.5 Kongressbeiträge

Sebastian Dreis, Kerstin Michaelis, Michael M. Hoffmann, Jörg Kreuter, Klaus Langer. **Human serum albumin nanoparticles for brain targeting with covalently attached apolipoprotein E.** APV World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva 27th-30th March 2006, Oral Presentation.

Sebastian Dreis, Jörg Kreuter, Klaus Langer. **Doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles.** Controlled Release Society Congress 2006, Vienna 22nd-26th July 2006, Poster Presentation.