

Insulin neu verpackt – die „Antidiabetespille“?

Madlin Bille, Julia Eißing, Matthias Jung, Sarah Peters, Daniel Pietruschka, Lea Robert, Stephan Rodi, Bent Starke

Einführung

Zurzeit leiden in Deutschland etwa 6,7 Millionen Menschen an Diabetes, Tendenz steigend. Bislang ist das Spritzen von Insulin die einzige Möglichkeit einen Typ-1-Diabetes einzustellen. Insulin kann nur subkutan verabreicht werden, da es als Protein ohne Schutz die Magen-Darmbarriere nicht überwinden kann. Deshalb war es unser Ziel eine orale Applikationsform zu entwickeln, welche den erforderlichen Schutz für Insulin aufweist. Dazu wurden Nanopartikel (NP) hergestellt und anschließend in Kapseln verarbeitet. Die hergestellten Nanopartikel bildeten eine lipophile Hülle, in der Insulin eingebettet wurde. Anschließend wurde die nanopartikuläre Formulierung anhand von Zellversuchen und analytischen Methoden auf Resorptionsfähigkeit und Zytotoxizität überprüft.

Material und Methoden

- 1 • **Herstellung der Insulin-Nanopartikel**
Doppelemulsionsmethode mit Cetylpalmitat/Tween 80
- 2 • **Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)**
Bestimmung des Durchmessers der Nanopartikel
- 3 • **Bestimmung der Einschlusseffizienz**
Indirekte Quantifizierung mittels HPLC
- 4 • **Testung am Caco-2-Resorptionsmodell**
Vermessung mittels Radioimmunoassay (RIA)
- 5 • **Zelltoxizitätsuntersuchung** durch MTT-Assay
- 6 • **Kapselherstellung**

Radioimmunoassay (RIA): Um zu testen, ob und in welchem Ausmaß die Nanopartikel durch die Darmmembran gelangen und anschließend das Insulin freisetzen, wurde der Assay durchgeführt. Dafür wurde Zell-Medium von der apikalen und basolateralen Seite entnommen und mittels RIA vermessen. Den Proben wurden eine definierte Menge an radioaktiv-markiertem Insulin sowie Insulin bindende Antikörper hinzugefügt. Die Antikörper binden das Insulin aus den NP mit höherer Affinität als das radioaktiv-markierte Insulin. Bei hoher Insulinkonzentration nimmt nach mehrmaligem Waschen die Konzentration des radioaktiv-markierten Insulins ab. Die gemessene Radioaktivität ist antiproportional zur Konzentration des freigesetzten Insulins.

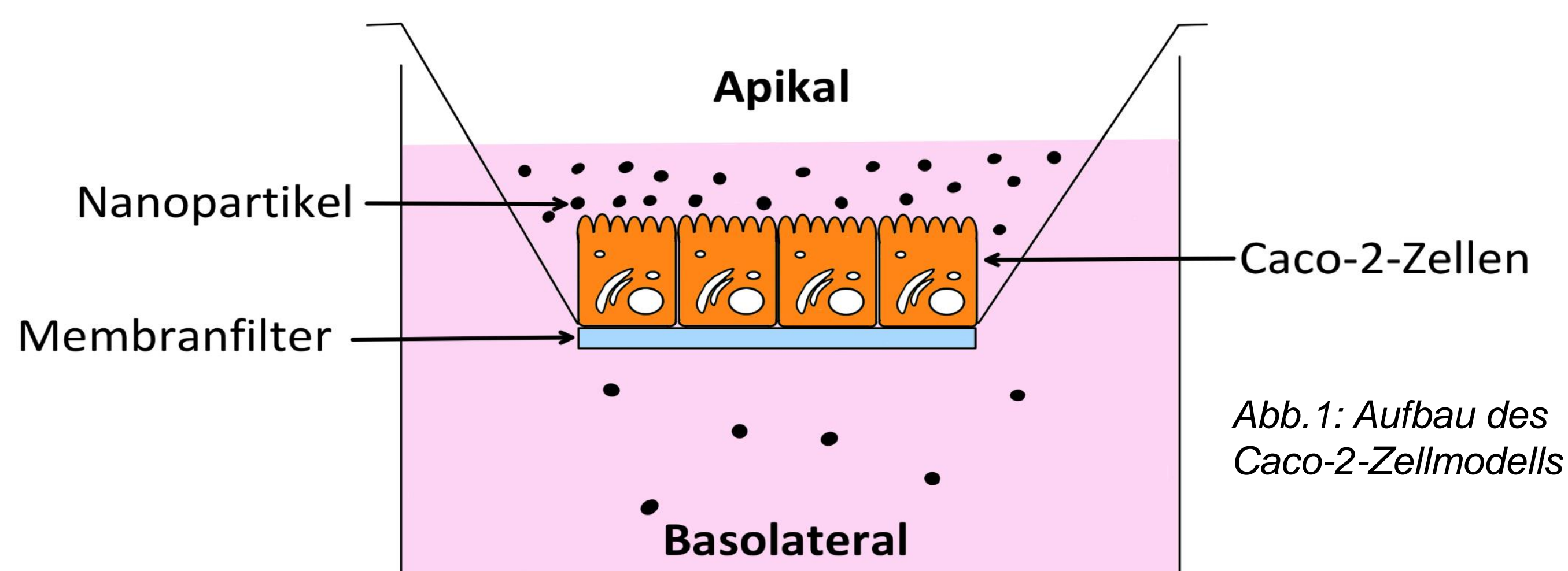


Abb. 1: Aufbau des Caco-2-Zellmodells

MTT Assay: Nach Zugabe von Nanopartikeln in verschiedenen Konzentrationen wird die Stoffwechselaktivität von Caco-2-Zellen getestet. Das auf die Zellen gegebene Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von lebenden Zellen zu Formazan reduziert. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit wird der Ansatz photometrisch bei 595 nm vermessen, wobei das gebildete Formazan proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen ist.

Ergebnisse

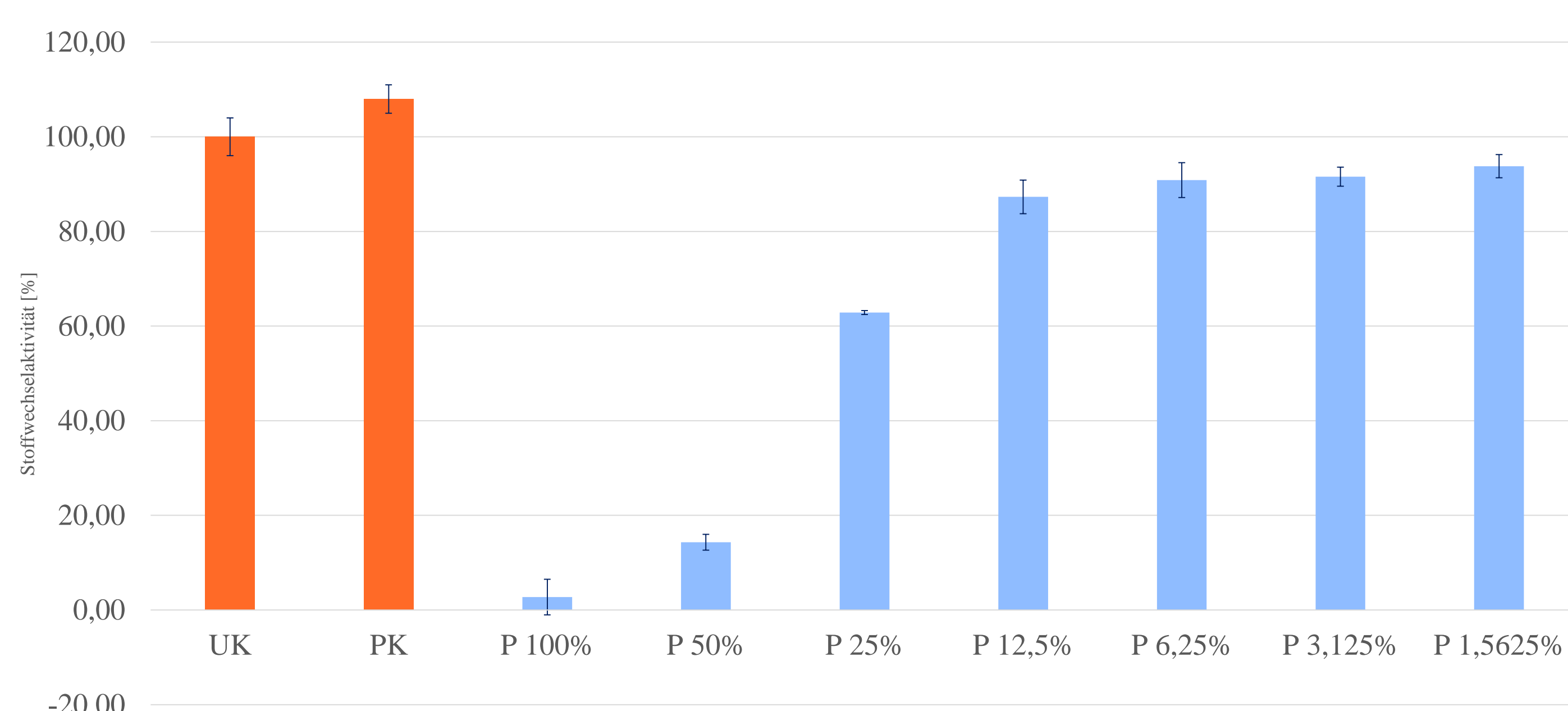
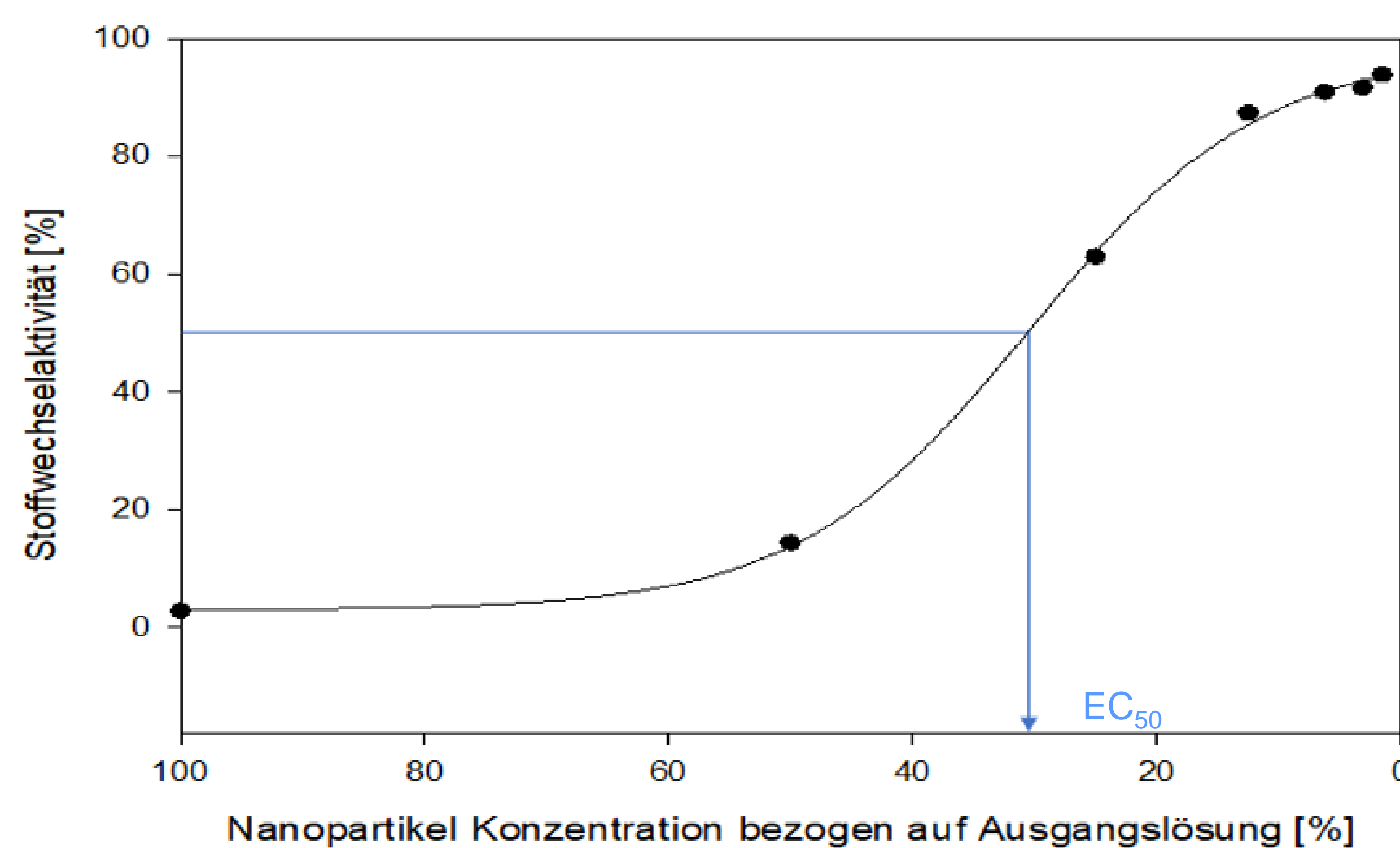
Die Quantifizierung erfolgte indirekt mittels HPLC. Dabei konnte eine Einschlusseffizienz von etwa 45% bestimmt werden.

Radioimmunoassay (RIA)

Auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmodells konnte kein Insulin nachgewiesen werden.

MTT-Assay

Mithilfe einer Verdünnungsreihe konnte ein EC_{50} -Wert der Insulin-Nanopartikel-Suspension von 1,48 mg/mL ermittelt werden. Ab einer Konzentration von <12,5% der Nanopartikel-Ausgangslösung zeigte sich nur noch ein geringer Unterschied in der Stoffwechselaktivität.


 Abb. 2: Ergebnisse des MTT-Assays: Unbehandelte Kontrolle (UK), Positivkontrolle (PK), Verdünnungsreihe der Insulin-Nanopartikel
Fehlerbalken: Standardabweichung

 Abb. 3: EC_{50} -Berechnung aus dem MTT-Assay

Fazit

Es konnten erfolgreich Insulin-Nanopartikel hergestellt werden. Beim RIA konnte kein Insulin auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmodells nachgewiesen werden. Ob und wie das Insulin aus den Nanopartikeln freigesetzt werden kann, ist allerdings nicht bekannt. Sofern das Insulin noch in den NP eingeschlossen ist oder aufgrund der hohen Lipophilie in der Membran der Zelle verbleibt, kann es vermutlich nicht mittels RIA erfasst werden.

Der MTT-Assay ergab, dass die Nanopartikel-Suspension im Organismus zytotoxisch wirken könnte. Jedoch können die Testbedingungen nicht als physiologisch angesehen werden, da die Zellen beim MTT-Assay den NP 24 h ausgesetzt wurden, was die Verweildauer im Dünndarm um ein Vielfaches übersteigt. Als möglicher Lösungsansatz könnte der Drug-Load erhöht werden, um die Nanopartikel-Konzentration zu verringern.

Referenz

Sarmiento et al., Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. Int J Nanomedicine, 743-749 (2007)

Danksagung

Wir bedanken uns herzlich bei unserer Mentorin Frau Prof. Düfer und dem Phar^{MS}school-Koordinationsteam für die tatkräftige Unterstützung bei unseren Projekten. Zudem gilt ein besonderer Dank an den AK Langer, vor allem an Dr. Mulac und Gerrit Alberding.