

1 Einleitung

Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) führen zu einer gravierenden Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit des gesamten Organismus. Eine adäquate Therapie erfordert Arzneistoffe, die in ausreichendem Maße ZNS-gängig sind, um therapeutische Konzentrationen im Gehirngewebe zu erreichen. Die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) dient zwar dem Schutz des ZNS vor irreversiblen Schädigungen durch Xenobiotika, verhindert aber gleichzeitig die Verwendung zahlreicher hochwirksamer Therapeutika.

Das zunehmende Wissen über physiologische Transportprozesse an der BHS und die Idee der Ausnutzung solcher für eine Verbesserung des Arzneistofftransportes über die BHS haben die Entwicklung von neuartigen Transportsystemen vorangetrieben. Im Fokus der gegenwärtigen Forschung stehen Konjugate aus partikulären Wirkstoffträgern und Vektoren, die einen physiologischen, Rezeptor-vermittelten Transportprozess über die BHS auslösen. Als Wirkstoffträger zeichnen sich insbesondere Liposomen durch ihre einfache Präparation, die Möglichkeit der Arzneistoffbeladung, die gute therapeutische Verträglichkeit sowie die unkomplizierte Modifikation mit Transportvektoren aus. Liposomale Konjugate bestehend aus Proteinen als Vektoren und Liposomen als Trägern wurden bereits für den Arzneistofftransport über die BHS erprobt (Huwyler et al. 1996; Thöle et al. 2002).

Arbeiten mit Arzneistoff-beladenen Nanopartikeln zeigten, dass offenbar Apolipoprotein E (ApoE) eine wichtige Rolle beim Transport über die BHS spielt (Kreuter et al. 2002). ApoE ist ein Ligand des LDL-Rezeptors, der am zerebralen Gefäßendothel exprimiert ist und einen transzytotischen Aufnahmeprozess von Lipoproteinen vermittelt. Peptide, abgeleitet aus der LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne von ApoE, zeigen ebenfalls Rezeptorbindungsaktivität (Dyer und Curtiss 1991). Komplexe aus Liposomen und ApoE-abgeleiteten Peptiden können damit die funktionellen Eigenschaften von Lipoproteinen modellieren.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse leitete sich die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese ab, dass Peptide abgeleitet aus der LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne von ApoE den Transport von Liposomen über die BHS vermitteln können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Herstellung und Charakterisierung von ApoE-Peptid-beladenen Liposomen, der Testung ihrer Interaktion mit dem LDL-Rezeptor und der Untersuchung ihrer Internalisierung in Gehirnkapillarendothelzellen. Die Nutzung von derartigen artifiziellen Lipoproteinen als Arzneistoffvehikel zum Transport über die BHS könnte völlig neuartige Ansatzpunkte in der Therapie von Erkrankungen des ZNS eröffnen.

1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Der Mediziner Paul Ehrlich gilt als Entdecker der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Im Jahre 1885 beobachtete er, dass nach intravenöser Injektion einer Farbstofflösung in ein Versuchstier alle Organe angefärbt wurden bis auf das Gehirn (Ehrlich 1885). Seit Ende der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass die Barrierefunktion den Kapillarendothelzellen der zerebralen Gefäße zuzuordnen ist.

1.1.1 Aufbau

Die BHS wird von den Kapillarendothelzellen der zerebralen Blutgefäße gebildet. Diese Kapillaren durchziehen das Hirngewebe in einem durchschnittlichen Abstand von 40 μm und haben eine Gesamtlänge von etwa 600 km. Insgesamt nimmt das Kapillarnetzwerk ca. 25 % des Hirnvolumens ein, wobei die Gesamtoberfläche der luminalen Gefäßinnenseite der Kapillaren ca. 15 - 30 m^2 groß ist (Pardridge 1991). Abbildung 1.1 zeigt eine Plastination des zerebralen Gefäßsystems des Menschen.

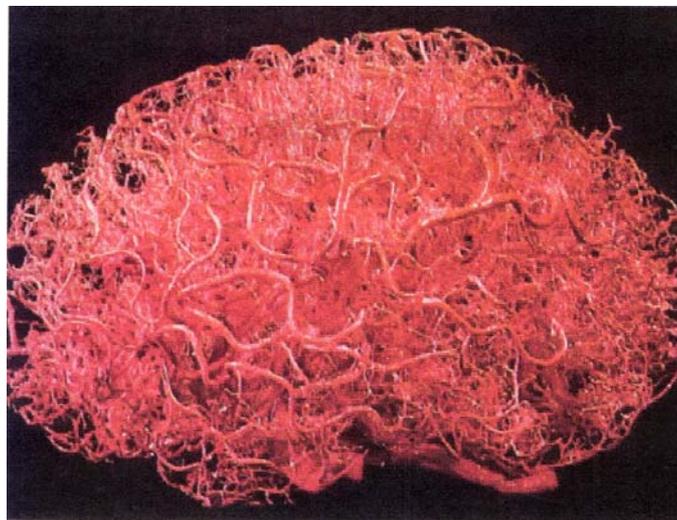


Abbildung 1.1: Plastination des zerebralen Gefäßsystems vom Menschen (Zlokovic und Apuzzo 1998)

Die Wand der Gehirnkapillaren besteht nur aus Endothelzellen, wobei eine Zelle den gesamten Kapillarrumfang umschließt. Die Kapillaren sind von einer Basalmembran umgeben, deren wesentliche Aufgabe eine Stützfunktion ist, und sind an der abluminalen Oberfläche fast vollständig mit Astrozytenfortsätzen besetzt (Abbildung 1.2 A, B). Astrozyten gehören zur Glia des ZNS und sind für die physiologische Funktion der BHS von immenser

Bedeutung. Es wird angenommen, dass sie über verschiedene noch nicht identifizierte Faktoren spezifische Eigenschaften der BHS induzieren (Janzer und Raff 1987). Weiterhin befinden sich auf der Basalmembran noch Perizyten und Neuronen; über letztere erfolgt eine Innervierung der Kapillaren. Die genaue Funktion von Perizyten an der BHS ist noch ungeklärt.

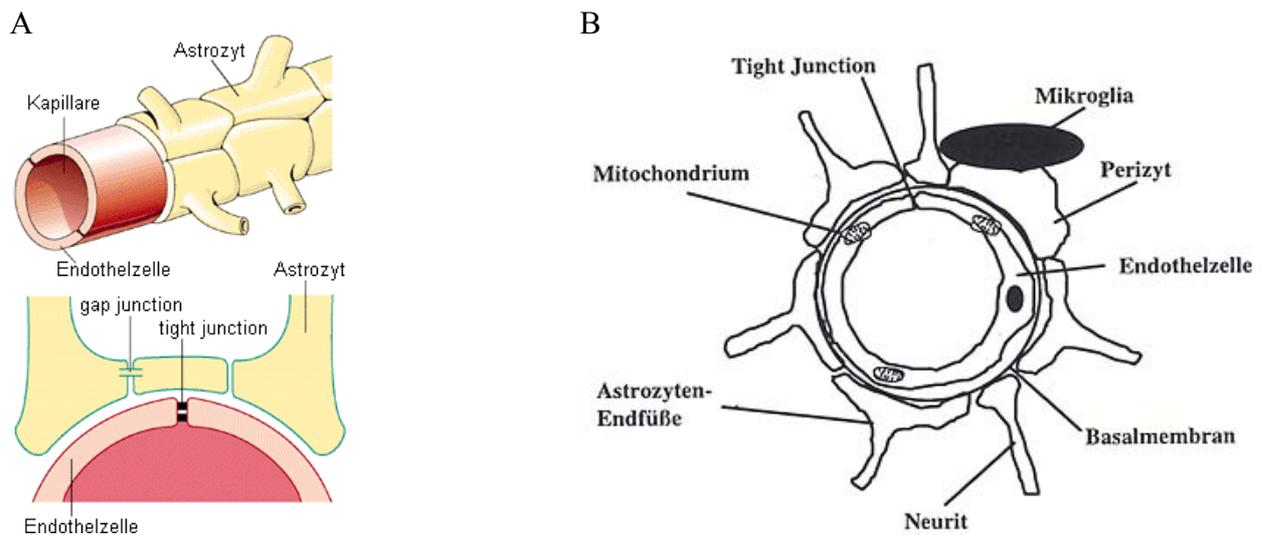


Abbildung 1.2: A: Zerebrale Kapillare mit Astrozyten besetzt (Deetjen und Speckmann 1999)
B: Schematischer Querschnitt einer zerebralen Kapillare

Zerebrale Kapillaren weisen im Gegensatz zu peripheren Kapillaren keine Fenestrierung auf, sondern sind mittels *Tight Junctions* verbunden (Abbildung 1.2 A, B). Der Aufbau von *Tight Junctions*, auch *Zonula occludens* genannt, ist außerordentlich komplex und noch nicht vollständig bekannt (Wolburg und Lippoldt 2002; Vorbrodt und Dobrogowska 2003). Diese kontinuierlichen Zell-Zell-Verbindungen zwischen angrenzenden Endothelzellen versiegeln die luminalen Seite der Kapillaren und verursachen damit eine strikte Trennung des Interstitiums des Gehirns vom Kapillarlumen (Goldstein und Betz 1983). Daneben sind sie auch für die Aufrechterhaltung der Verteilung von Membranproteinen zwischen luminaler und abluminaler Membran verantwortlich (Balda et al. 1992).

1.1.2 Barrierefunktion

Das Gehirn ist auf eine Aufrechterhaltung der inneren Homöostase, eine konstante Sauerstoff- und Energieversorgung und einen Schutz vor im Blut zirkulierenden Fremdstoffen wie Bakterien, Viren, Toxine und Xenobiotika angewiesen. Die BHS erfüllt diese Aufgabe indem

sie zum einen den selektiven Stoffaustausch zur Versorgung des Gehirns sicherstellt und zum anderen durch ihre ausgeprägte Barrierefunktion; sowohl auf physikalischem als auch auf metabolischem Wege.

Das wichtigste morphologische Merkmal, das hauptsächlich für die Barrierefunktion der BHS verantwortlich ist, ist die bereits erwähnte kontinuierliche Membranfusion der Endothelzellen durch *Tight Junctions*. Sie schränken die parazelluläre Diffusion von niedermolekularen Substanzen sehr stark ein und bewirken zudem einen außerordentlich hohen trans-endothelialen Widerstand (TEER) von bis zu $2000 \Omega\text{cm}^2$ (Crone und Olesen 1982).

Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Barrierefunktion der BHS liefert die aktive Effluxpumpe P-Glykoprotein (PGP, Produkt des *Multi Drug Resistance*-Gens *mdr1*), die in der luminalen Membran von Gehirndothelzellen vorhanden ist und in die Membran eingedrungene lipophile Stoffe zurück ins Lumen transportiert (Cordon-Cardo et al. 1989; Tatsuta et al. 1992). Das Substratspektrum von PGP ist sehr breit und damit die Ursache für die geringe Permeabilität kleiner, lipophiler Arzneistoffe. Neben PGP gibt es an der BHS noch *Multi Drug Resistance-associated* Proteine (MRP) als weitere Efflux-Transporter der Familie der ABC-Transportproteine (*ATP-binding-cassette* Transportproteine) (Huai-Yun et al. 1998; Seetharaman et al. 1998).

Auch die Endozytose- und Pinozytoseaktivität ist in Gehirnkapillarendothelzellen wesentlich geringer als in peripheren Kapillarendothelzellen und liefert damit einen wesentlichen Beitrag zur Barrierefunktion der BHS (Rubin und Staddon 1999; Goldstein und Betz 1983).

Zerebrale Kapillarendothelzellen verfügen über einen intensiven Stoffwechsel und eine umfangreiche Enzymausstattung, was zu einer starken metabolischen Aktivität führt. Damit können durch passive Diffusion eingetretene Stoffe inaktiviert werden (Gherzi-Egea et al. 1988; Drewes 1999). Weiterhin wird der BHS auch eine Funktion als immunologische Barriere zugeschrieben, da sie unter physiologischen Bedingungen undurchlässig ist für Pathogene und Antikörper (Risau et al. 1990).

1.1.3 Transportprozesse

Funktionell bedeutet die Dichtigkeit des zerebralen Kapillarendothels eine vollständige Impermeabilität für die meisten Moleküle. Jedoch verfügt die BHS über zahlreiche spezifische Transportsysteme an der luminalen und abluminalen Membran, die einen selektiven und kontrollierten Stoffaustausch ermöglichen. Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht über die Transportprozesse an der BHS, die im folgenden näher vorgestellt werden.

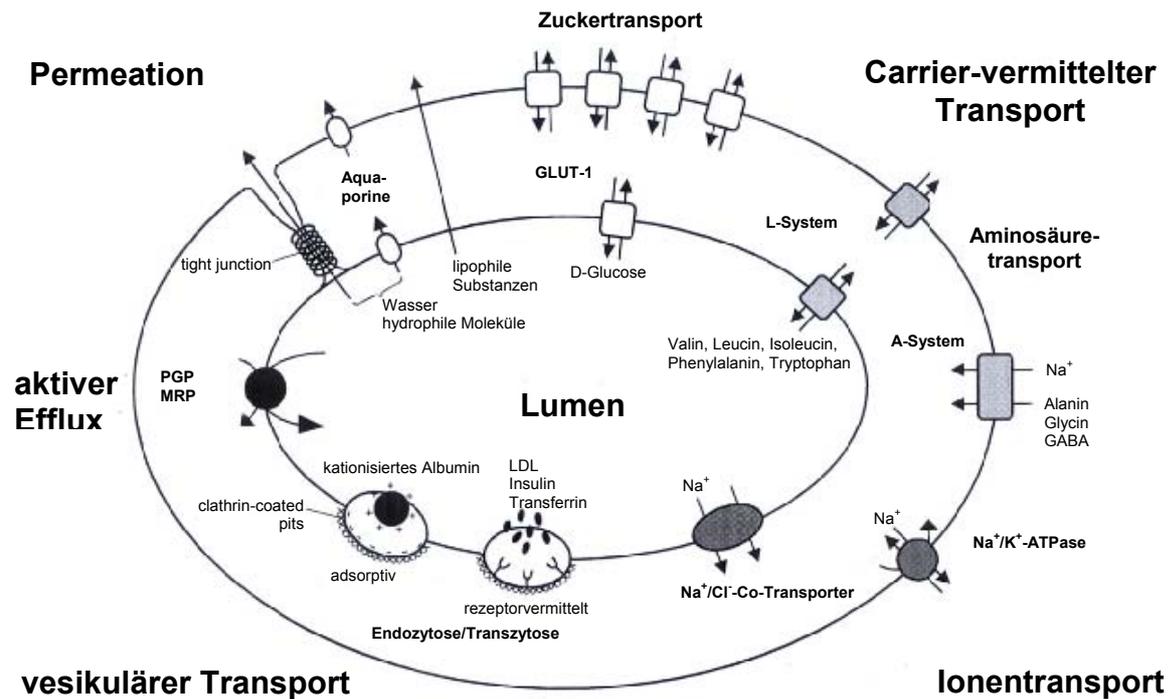


Abbildung 1.3: Transportprozesse an einer Kapillarendothelzelle der BHS (Bauer 2002)

Passive Diffusion

Theoretisch kann jedes Molekül einem Konzentrationsgradienten folgend ins Gehirn diffundieren, wobei die Geschwindigkeit der Diffusion von molekülspezifischen Parametern wie Molekulargewicht, Hydrophobizität, Ladung und Form abhängt. Es läßt sich vereinfacht sagen, daß lipophile Moleküle kleiner 500 Da die BHS auf dem Wege der Diffusion passieren können (Miller 2002). Praktisch spielt die Permeation an der BHS nur eine untergeordnete Rolle für einige lipophile Vitamine und Arzneistoffe, die nicht Substrat für die Effluxpumpe PGP sind. Kleine polare Moleküle wie Ethanol, Glycerin und Harnstoff permeieren durch die *Tight Junctions* und mit Hilfe von Aquaporinen.

Transport durch Carrierproteine

Essentielle Nährstoffe und andere endogene Substanzen gelangen über spezielle Transportproteine in das Zytosol der Kapillarendothelzellen und letztendlich über die BHS. So wird Glucose als Hauptenergielieferant des Gehirns über den Glut-1-Transporter passiv

mit dem Konzentrationsgefälle aufgenommen (Goldstein und Betz 1983; Pardridge et al. 1990a). Für Aminosäuren als Bausteine für die Proteinbiosynthese sind insgesamt 5 Transportsysteme an der BHS bekannt. Dazu gehören unter anderem das L-System für große, neutrale und essentielle aromatische Aminosäuren und das A-System für kleine neutrale Aminosäuren, die aus dem Gehirn in das Kapillarlumen transportiert werden (Betz und Goldstein 1978; Pardridge und Oldendorf 1975). Daneben existieren Transportsysteme auch für saure und kationische Aminosäuren. Ionenkanäle und -transporter in der abluminalen und luminalen Endothelzellmembran dienen der Aufrechterhaltung des Ionenkonzentrationsgradienten zwischen der Interstitialflüssigkeit und dem Zytoplasma der Endothelzelle und zur intrazellulären pH-Regulation (Goldstein und Betz 1983). Dazu gehören unter anderem die Na^+/K^+ -ATPase der abluminalen Membran und der Na^+/Cl^- -Co-Transporter.

Endozytotischer/Transzytotischer Transport

Große Moleküle und Molekülkomplexe (z.B. Proteine und Lipoproteine) werden mittels Endozytose in die Kapillarendothelzellen aufgenommen beziehungsweise im Rahmen einer Transzytose vesikulär durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert (Abbott und Romero 1996). Durch die Internalisierung bilden sich Endosomen (Transportvesikel), die dann entweder mit Lysosomen verschmelzen und inhaltsabhängig verschiedenen Prozessen und Kompartimenten zugeführt werden oder mit der abluminalen Membran der BHS verschmelzen, wobei der Vesikelinhalt freigegeben wird (Broadwell 1989).

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose binden Moleküle hochspezifisch an luminalen Membran-Rezeptoren und lösen damit einen endozytotischen Aufnahmeprozess aus. Viele physiologische Substanzen, wie das Cholesterol-reiche Low-Density Lipoprotein (LDL) (Dehouck et al. 1997), das Eisen-transportierende Transferrin (Fishman et al. 1987) sowie Insulin (Pardridge et al. 1985) werden so in Kapillarendothelzellen aufgenommen und über die BHS transportiert.

Daneben spielt auch die adsorptive Endozytose eine wichtige Rolle an der BHS, bei der positiv geladene Liganden mit anionischen Strukturen der Zellmembran der Endothelzellen (z.B. Glykoproteine) interagieren und letztendlich internalisiert werden. Beispiele für so ins Gehirn aufgenommene Moleküle sind kationisiertes Albumin (Kumagai et al. 1987) und Histon (Pardridge et al. 1989).

1.2 Arzneistofftransport über die Blut-Hirn-Schranke

Ein Großteil der in den letzten Jahren entwickelten Arzneistoffe könnte die Therapie und Diagnose verschiedenster ZNS-Erkrankungen entscheidend verbessern. Jedoch scheitert deren Anwendung, da mehr als 98 % potentieller ZNS-Wirkstoffe die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können (Pardridge 2003). Führende Pharmakonzerne haben sich bisher auf die Entwicklung von kleinen, ZNS-gängigen Wirkstoffen konzentriert. Die Entwicklung von *Drug Delivery*-Systemen für einen verbesserten Transport über die BHS blieb bisher hauptsächlich der akademischen Forschung vorbehalten. Im folgenden Kapitel werden gegenwärtige Strategien zur Verbesserung des Arzneistofftransports über die BHS vorgestellt.

1.2.1 Erhöhung der Lipophilie

Das Ausmaß der Diffusion durch zelluläre Membranen hängt ganz entscheidend von der Größe und der Lipophilie des Arzneistoffes ab. Eine verbesserte Gehirngängigkeit kann daher durch das Einfügen von lipophilen Gruppen in das Arzneistoffmolekül erreicht werden (Habgood et al. 2000). Ein bekanntes Beispiel dafür ist die 25-fach erhöhte Aufnahme ins Gehirn vom Heroin (Diacetyl-Morphin) verglichen mit Morphin (Oldendorf 1974). Auch für das analgetisch wirksame Peptide Deltorphin II wurde gezeigt, dass das *Prodrug*-Prinzip mittels Einführung lipophiler Molekülteile zu einer Verbesserung der Gehirngängigkeit führt (Patel et al. 1997).

1.2.2 Hemmung von Effluxmechanismen

Eine Reihe von Arzneistoffen können zwar in die Membran der Kapillarendothelzellen eindringen, jedoch sind sie Substrate für die Effluxpumpe PGP und werden daher aus der luminalen Membran wieder heraustransportiert. Das kann mittels PGP-Inhibitoren verhindert werden. Bekannte Beispiele dafür sind der Kalziumantagonist Verapamil und das Cyclosporinderivat PSC833 (Mutschler et al. 2001), die als sogenannte *Codrugs* die BHS-Passage von nachfolgend applizierten Arzneistoffen verbessern. So wurde gezeigt, dass Verapamil sowohl *in vivo* (Drion et al. 1996) als auch an einem *in vitro* BHS-Modell (Fenart et al. 1998) die Passage von zytostatisch wirksamen Vinca-Alkaloiden erhöht.

1.2.3 Chemische Transportsysteme

Sogenannte *Chemical Delivery-Systems* (CDS) beruhen auf dem sequentiellen Metabolismus redoxbasierter Systeme. Hierbei wird ein Arzneistoff kovalent an ein lipophiles Dihydropyridin gebunden. Dieses Konstrukt ist aufgrund seiner Lipophilie leicht in der Lage, mittels passiver Diffusion zelluläre Barrieren zu überwinden, wobei es dann enzymatisch zu einem ionischen Pyridinium-Salz oxidiert wird und eine Rückdiffusion somit verhindert wird. Durch Hydrolyse wird dann der Arzneistoff vom Trägermolekül freigegeben. Experimentell wurde die Anwendbarkeit dieses Systems bereits für verschiedenste Arzneistoffe gezeigt (Prokai et al. 2000). Limitierend an diesem Ansatz sind jedoch das durch den lipophilen Spacer erhöhte Molekulargewicht und die dadurch entstehende nachteilige Pharmakokinetik.

1.2.4 Methoden zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke

Vor ca. 20 Jahren wurde von Rapoport und Neuwelt eine erste Möglichkeit entwickelt, um die BHS zeitweise zu öffnen. Dabei wird eine hyperosmotische Zuckerlösung (z.B. Mannitose, Arabinose) in die Halsschlagader injiziert, die einen Wasserausstrom aus den Kapillaren, ein Schrumpfen der Endothelzellen und damit letztendlich eine Öffnung der *Tight Junctions* bewirkt, wodurch eine parazelluläre Passage von Arzneistoffen möglich ist. Eine Abwandlung dieser Methode wird heute hauptsächlich für Chemotherapeutika zur Behandlung von Gehirntumoren verwendet und ist bereits in klinischen Studien der Phase I und II in den USA, Kanada und Israel erfolgreich getestet worden (Neuwelt et al. 1980; Doolittle et al. 2002).

Weiterhin wurde gezeigt, dass der Bradykinin-Rezeptoragonist RMP-7 (Cereport) die Permeabilität der BHS vorübergehend erhöht (Sanovich et al. 1995). Dabei wird über eine Rezeptorbindung an den Kapillarendothelzellmembranen eine Öffnung der *Tight Junctions* hervorgerufen (Bartus et al. 1996). Auch diese Methode wurde bereits tierexperimentell für verschiedenste Arzneistoffe mit Erfolg eingesetzt (Borlongan und Emerich 2003). Ebenso ist auch für Leukotriene, Histamin und 5-Hydroxytryptamin eine Erhöhung der Durchlässigkeit der BHS beschrieben (Begley 1996).

Allerdings bergen diese Ansätze aufgrund der invasiven Öffnung der BHS und der unspezifischen Permeabilitätserhöhung für alle im Blut zirkulierenden Substanzen einschließlich Krankheitserreger ein hohes Risiko.

1.2.5 Physiologische Transportmechanismen

Mit der Erforschung spezifischer Transportmechanismen an der BHS werden die Voraussetzungen für die Entwicklung von Arzneistoffen geschaffen, die den chemischen Anforderungen dieser Translokationswege entsprechen. Da jedoch ein hohes Maß an struktureller Übereinstimmungen der Pharmaka mit den physiologischen Substraten vorhanden sein muß, ist die Anwendung dieser Strategie nur eingeschränkt möglich. Ein erfolgreiches Beispiel ist die Verwendung des neutralen Aminosäuretransporters für die Behandlung des Morbus Parkinson mittels Dopamin. Dopamin selbst kann die BHS nicht überqueren, aber die Aminosäure L-Dopa gelangt als *Prodrug* über den LAT1-Transporter ins Gehirn, wo es mittels Decarboxylasen zum wirksamen Dopamin umgesetzt wird.

1.2.6 Vektor-vermittelter Transport

Einen vielversprechenderen Ansatz bietet die Nutzung von sogenannten „trojanischen Pferden“, Konjugaten aus pharmakologisch aktiven Substanzen und einem Transportvektor. Diese Konjugate sind für eine Vielzahl von Pharmaka einsetzbar. Ist der verwendete Vektor sogar spezifisch für die BHS, lässt sich ein *Drug Targeting* zum Gehirn erzielen, was den entscheidenden Vorteil der Verringerung möglicher Nebenwirkungen mit sich bringt.

Rezeptorvermittelte Endozytose/Transzytose

Als Vektoren dienen Liganden, die an der BHS rezeptorvermittelt endozytiert werden, wobei der unter Erhalt der intrinsischen Aktivität zumeist kovalent an den Vektor gebundene Arzneistoff damit aufgenommen wird. Anschließend erfolgt die intrazelluläre Spaltung der Konjugate und letztendlich ein Weitertransport des Arzneistoffes mittels Exozytose. Als experimentelle Vektoren wurden bisher genutzt: Insulin (Fukuta et al. 1994), der Anti-Insulin-Rezeptor-Antikörper (Pardridge et al. 1995), Transferrin (Broadwell et al. 1996; van Gelder et al. 1997) und der Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper OX26 (Broadwell et al. 1996; Bickel et al. 1993; Friden et al. 1991). Die pharmakologische Ausnutzung rezeptorvermittelter Transportprozesse hat den Vorteil der hohen Selektivität; gleichzeitig ist aber die Effektivität entscheidend von der Transportkapazität, u.a. von der Rezeptorbesetzungsdichte, des Rezeptors abhängig, was wiederum die Anwendung dieser Strategie limitieren kann.

Adsorptive Endozytose

Kationische Proteine können mittels Endozytose in Kapillarendothelzellen aufgenommen werden, wobei der Auslöser der Aufnahme eine, über elektrostatische Interaktionen vermittelte, adsorptive Bindung an der negative geladenen Zellmembran ist (Pardridge 2002). Gezeigt wurde dieser Effekt mit kationisiertem Albumin als Transportvektor (Kang und Pardridge 1994; Kumagai et al. 1987; Pardridge et al. 1990b). Einen neuen Ansatzpunkt bietet die Verwendung von kleinen kationischen Peptiden aus der Klasse der „zellpenetrierenden Peptide“ als Vektoren (Plank et al. 1998; Kueltzo und Middaugh 2003). Diese Peptide sind in der Lage, die Zellmembran zu überqueren, wobei der Translokationsmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Diskutiert wird unter anderem eine adsorptive Endozytose, vermittelt durch elektrostatische Interaktionen mit dem negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykan-Gerüst (HSPG) der Zelloberfläche (Console et al. 2003; Belting 2003). Zur Klasse der „zellpenetrierenden Peptide“ gehört auch das Arginin-reiche Tat-Peptid, abgeleitet aus der Transduktionsdomäne des HIV-Tat-Proteins. Schwarze et al. konnte zeigen, dass dieses Peptid verbunden mit einem β -Galactosidase-Protein auch ins Gehirn transportiert wird (Schwarze et al. 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Doxorubicin ins Gehirn 6-fach erhöht ist, wenn es an die zellpenetrierenden Peptide Penetratin oder an Syn B, einer von Protegrin abgeleiteten Sequenz, gekoppelt ist (Rousselle et al. 2001; Rousselle et al. 2000; Drin et al. 2002). Weitere Arbeiten mit dem Syn B1-Peptid zeigten auch einen verbesserten Transport von Benzylpenicillin über die BHS (Rousselle et al. 2002). Das generelle Problem dieser Vektoren ist jedoch die fehlende Zellselektivität. So ist zwar die BHS-Passage erhöht, aber gleichzeitig auch die Aufnahme in periphere Organe.

Es ist zu erwarten, dass mit der Identifizierung weiterer Transportsysteme, insbesondere aber solcher, die spezifisch an der Blut-Hirn-Schranke vorhanden sind, erfolgversprechende Vektoren gefunden werden können. Oben beschriebene Konjugate sind sehr flexibel für eine große Auswahl von pharmakologisch interessanten Substanzen einsetzbar und bieten insbesondere Perspektiven für Gentherapeutika und Peptidarzneistoffe. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass neben den sehr wahrscheinlich auftretenden immunologischen Reaktionen *in vivo* und hohen Herstellungskosten ein ungünstiges Verhältnis von Vektor zu Arzneistoff vorliegt. Pro Vektor können nur bis ca. 10 Arzneistoffmoleküle gekoppelt werden (Bickel et al. 1993) was bedeutet, dass nur geringe Arzneistoffmengen ins Gehirn gelangen können.

1.2.7 Vesikuläre Arzneistofftransportsysteme

Da es in den meisten Fällen jedoch nötig ist, mikromolare Arzneistoffkonzentrationen im Gehirn zu erreichen, rücken Kombinationen aus vesikulären Arzneistoffträgern versehen mit den oben beschriebenen Transportvektoren aufgrund ihrer hohen Transportkapazität immer mehr in den Fokus der gegenwärtigen Forschung. Insbesondere spielen dabei Liposomen (Kapitel 1.3) und Nanopartikel eine bedeutende Rolle. Aber auch Cyclodextrine (Monnaert et al. 2004) und Dendrimere (Jevprasesphant et al. 2004; Godfray und Estibeiro 2003) wurden bezüglich einer Verwendung für den Arzneistofftransport über die BHS untersucht.

Als Nanopartikel werden polymere Körper mit einem Durchmesser von 10 nm bis 1 µm verwendet (Kreuter 1996; Lockman et al. 2002). Aufgrund ihrer Größe und der Adsorption von Serumproteinen werden sie *in vivo* durch die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) eliminiert, was durch eine Beschichtung der Nanopartikel mit Tensiden wie z.B. Polysorbat 80 vermindert werden kann und damit zu einer Erhöhung der Plasmahalbwertszeit führt (Kreuter 1996). Darüber hinaus scheint die Polysorbat 80-Beschichtung auch für die Aufnahme in Gehirnkapillarendothelzellen verantwortlich zu sein. Lück et al. fanden heraus, dass auf Polysorbat 80-beschichteten Nanopartikeln eine bevorzugte Adsorption von ApoE stattfindet (Lück 1997). Weiterführende Arbeiten von Kreuter zeigten eine deutliche Korrelation zwischen ApoE-Adsorption und der BHS-Passage von Nanopartikel-gebundenen Arzneistoffen (Kreuter et al. 2002). Der Mechanismus wird darauf zurückgeführt, daß ApoE durch Bindung an den LDL-Rezeptor der Kapillarendothelzellen einen endozytotischen Aufnahmeprozess auslöst (Kapitel 1.4). Bezüglich der Polysorbat 80-Beschichtung herrschen jedoch kontroverse Meinungen in der Literatur vor. Polysorbat 80 ist ein nichtionisches Detergens, welches die Kapillarendothelzellmembran solubilisiert und damit letztendlich eine verbesserte Arzneistoffpassage bewirkt (Azmin et al. 1985). Außerdem wird diskutiert, dass Polysorbat 80 einen Einfluß auf die Dichtigkeit der *Tight Junctions* hat (Miller 2002). Jedoch gibt es eine Reihe von erfolgreichen *in vivo* Studien mit Polysorbat 80-beschichteten, bioabbaubaren Poly-Butylcyanoacrylat-Nanopartikeln: So konnte eine analgetische Wirkung nach Injektion von Dalargin-beladenen Nanopartikeln nachgewiesen werden (Kreuter et al. 1995). Ein analgetischer Effekt konnte auch mit dem ebenfalls nicht ZNS-gängigen Opioid-Rezeptor-Agonisten Loperamid erzielt werden (Alyautdin et al. 1997), welcher aufgrund seiner ausschließlich peripheren Wirkung als Antidiarrhoikum eingesetzt wird. Ebenso wurde gezeigt, dass die Passage des Zytostatikums Doxorubicin bei Verwendung der beschichteten Nanopartikel 60-fach erhöht ist (Gulyaev et al. 1999).

1.3 Liposomen

Liposomen wurden erstmalig von Bangham im Jahre 1965 beschrieben (Bangham et al. 1965). Dabei handelt es sich um kugelförmige kolloidale Vesikel, die einen wässrigen Innenraum mit einer oder mehreren Lipiddoppelschichten (ca. 5 nm dicke Bilayer, (Huang 1969)) umschließen und deren Größe im Bereich von einigen Dutzend Nanometern bis einigen Mikrometern liegen kann. Sie entstehen durch spontane Selbstassoziation von Amphiphilen (i.d.R. Phospholipiden) im wässrigen Milieu.

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit biologischen Membranen bieten Liposomen vielseitige Einsatzmöglichkeiten als Modellsysteme zur Untersuchung von Membranprozessen (Sessa und Weissmann 1968). Bereits in den 70er Jahren wurde das Potential der Liposomen als Arzneistoffträger erkannt (Gregoriadis 1976), da man sowohl hydrophile Stoffe im wässrigen Innenraum und in den Bilayerzwischen-schichten als auch lipophile Stoffe innerhalb der Bilayer inkorporieren kann. Dadurch kann ein Arzneistoff separiert verpackt, stabilisiert und einer von seinen physikochemischen Eigenschaften unabhängigen *in vivo* Verteilungskinetik unterworfen werden, die wiederum dann von den durch Änderung der Lipidzusammensetzung variierbaren Eigenschaften der Liposomen abhängt (Allen und Everest 1983; Storm et al. 1987). Zudem bedingt die Tatsache, dass die Hauptkomponenten von Liposomen, Phospholipide und Cholesterol, natürliche Bestandteile von Säugerzellmembranen sind, eine geringe *in vivo* Toxizität sowie Immunogenität, gute Biokompatibilität und Metabolisierung. Bisher sind folgende Anwendungen für liposomale Arzneistoffe beschrieben:

- Solubilisierung schlecht wasserlöslicher Substanzen, z.B. Taxol (Straubinger et al. 1993)
- Schutz vor metabolischer Deaktivierung, z.B. Cytosin-arabinosid (Mayhew et al. 1976)
- Vermeidung toxischer Nebenwirkungen durch Modifizierung der Biodistribution, z.B. verringerte Kardiotoxizität von Doxorubicin (Forssen und Tokes 1981)
- Verzögerung der Wirkstofffreigabe (Oku und Namba 1994)
- Vermeidung von Nebenwirkungen durch passives oder gerichtetes *Targeting* (siehe Kapitel 1.3.4)

Bereits mehreren intravenös applizierbaren liposomalen Arzneistoffträgersystemen wurde die Zulassung von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (*Food and Drug Administration*) erteilt. Dazu gehören unter anderem Morphin (Depodur[®]), Doxorubicin (Doxil[®]), Daunomycin (DaunoXome[®]), Amphotericin B (AmBisome[®]) und Cytarabin (Depocyt[®]).

1.3.1 Aufbau und Zusammensetzung

Grundsätzlich unterteilt man Liposomen bezüglich ihrer Größe und Lamellarität in kleine einschichtige (SUV, *Small Unilamellar Vesicle*; 20 - 50 nm), große einschichtige (LUV, *Large Unilamellar Vesicle*; 50 nm - 1 μ m) und mehrschichtige (MLV, *Multilamellar Large Vesicle*) Liposomen.

Die zur Herstellung von Liposomen am häufigsten eingesetzten Phospholipide sind Phosphodiester-Derivate von 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phosphat, die aus Sojabohnen oder Eigelb isoliert, anschließend fraktioniert und partialsynthetisch modifiziert oder auch vollsynthetisch hergestellt werden. Die amphiphilen Phospholipide haben zwei charakteristische Molekülbereiche: die hydrophile Kopfgruppe und die lipophile Endgruppe. Die polare Kopfgruppe besteht aus dem Phosphorsäurediester, der einerseits mit Cholin, Ethanolamin, Glycerol, Inositol, Serin oder Zuckerresten verknüpft sein kann und andererseits mit einer Hydroxylgruppe des Glycerols verbunden ist. Die häufigsten Phospholipide sind Phosphatidylcholine (PC), die genauso wie die Phosphatidylethanolamine (PE) bei physiologischem pH-Wert ein neutrales Zwitterion bilden. Phosphatidylglycerine, -inositole und -serine sind negativ geladen. Die lipophile Endgruppe wird von den Kohlenwasserstoffketten zweier Fettsäurereste gebildet, die wiederum mit den übrigen beiden Hydroxylgruppen des Glycerols verestert sind, gesättigt oder ungesättigt sein können und normalerweise eine Länge zwischen 14 und 22 Kohlenstoffatomen haben.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil von Biomembranen und Liposomen ist Cholesterol, das selbst keine Bilayer bildet, sich aber in die Phospholipidbilayer bis zu einem Anteil von ungefähr 50 % (mol) einlagert und diese stabilisieren kann (New 1990).

Die lamellaren Phasen der Phospholipidbilayer können in mehr als zwei verschiedenen Zuständen vorliegen, deren Übergang ineinander durch die Phasenübergangstemperatur gekennzeichnet ist. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur befinden sich die Phospholipide in einem geordneten Gelzustand, in dem die Fettsäurereste nur eine geringe Eigenbeweglichkeit aufweisen. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur sind die Acylketten deutlich beweglicher. Die Bilayer befindet sich in einem flüssigkristallinen Zustand. Beide Zustände weisen unterschiedliche physikalische Eigenschaften auf. Auch die Bilayerdicke reduziert sich beim Übergang in den flüssigkristallinen Zustand von ca. 47 Å auf 39 Å (New 1990). Die Phasenübergangstemperatur der einzelnen Lipide ist sowohl von der Kopfgruppe als auch von Länge und Sättigungsgrad des Fettsäurerestes abhängig (Szoka, Jr. und Papahadjopoulos 1980) und kann mit thermoanalytischen Methoden bestimmt werden.

1.3.2 Herstellung und Charakterisierung

Bei der überwiegend eingesetzten Filmmethode (Bangham et al. 1965) werden Lipide und eventuell zusätzliche lipophile Stoffe (Arzneistoffe, Fluoreszenzsonden) in organischen Lösungsmitteln gelöst und bilden nach Lösungsmittelentzug einen homogenen, transparenten Lipidfilm, der im Hochvakuum nachgetrocknet wird. Dieser Film wird durch Zugabe von Puffer oberhalb der Phasenübergangstemperatur hydriert und dispergiert, wobei sich spontan eine Liposomendispersion bildet, die jedoch in Bezug auf Größe und Lamellarität inhomogen ist und vorwiegend aus MLVs besteht.

Anschließend erfolgt eine Weiterbehandlung der Liposomendispersion, um eine definierte, enge Größenverteilung zu erhalten und um die Lamellarität zu verringern. Mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen erhöht die Homogenität der Dispersion, die durch Ultraschallbehandlung, Extrusion, Detergenzdialyse oder Hochdruckhomogenisation noch verbessert werden kann. Durch Ultraschallbehandlung der Liposomendispersion mit einem Ultraschallstab oder in einem Ultraschallbad können kleine, unilamellare Liposomen hergestellt werden, wobei durch die hohe Energiezufuhr eine sehr effektive Reduktion der Liposomengröße stattfindet (Huang 1969). Bei der Extrusion (Olson et al. 1979) wird die Liposomendispersion mehrmals durch porenhaltige Polycarbonatmembranen gepresst. Dabei entstehen in Abhängigkeit von der Porengröße und Anzahl der Extrusionsschritte unilamellare Liposomen mit einer engen Größenverteilung.

Für die Beladung von Liposomen mit Arzneistoffen müssen die Eigenschaften und das Herstellungsverfahren der Liposomen und die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes berücksichtigt werden. Mittels der Filmmethode können Liposomen beladen werden, indem lipophile Arzneistoffe dem organischen Lösungsmittel und hydrophile Arzneistoffe dem wässrigen Puffer zugegeben werden. Nach der Liposomenherstellung wird der unverkapselte Arzneistoff z.B. durch Dialyse, Zentrifugation oder chromatographische Verfahren entfernt (New 1990). Eine spezielle Methode zur Beladung ist die sogenannte aktive Beladungsmethode für lipophile Amine, z.B. Adriamycin (Mayer et al. 1986), bei der Liposomen bei niedrigem pH-Wert hergestellt werden und anschließend der äußere Puffer gegen einen wirkstoffhaltigen, neutralen Puffer ausgetauscht wird (Mayer et al. 1985). Die Amine diffundieren nun in das Liposomeninnere und werden dort aufgrund des niedrigen pH-Wertes protoniert und damit festgehalten. Eine weitere Methode, die keinen liposomalen Einschluß erfordert, ist die Komplexbildung zwischen negativ geladenen Nukleinsäuren und kationischen Liposomen zur Herstellung von Transfektionsreagenzien (Zabner 1997).

Prinzipiell variieren die physikalischen Eigenschaften von Liposomen wie Membranfluidität, Größe und Ladung sehr stark in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung. Die Bestimmung der Liposomengröße und der Partikelgrößenverteilung erfolgt mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS). Zetapotentialmessungen geben Aufschluß über die Ladung der Liposomen und damit auch über die Stabilität der Dispersion. Eine ausführliche Übersicht über die vielfältigen Verfahren zur Liposomenherstellung und -charakterisierung findet sich unter (New 1990).

1.3.3 Wechselwirkung mit Zellen und *in vivo* Verhalten

Die Wechselwirkungen von Liposomen mit Zellen hängen nicht nur von den Eigenschaften der Liposomen sondern auch vom Zelltyp ab. So nehmen Zellen des RES Liposomen als körperfremde Stoffe auf, wohingegen für nicht-phagozytierende Zellen adsorptive Bindung der Liposomen an die Zelloberfläche, Fusion, Endozytose oder Lipidaustausch beschrieben ist (Pagano und Weinstein 1978). Welche Interaktion überwiegt, hängt von der Oberflächenladung, der Größe und der Lipidzusammensetzung der Liposomen ab (Duzgune und Scedil et al. 1999; Ulrich 2002).

Auch das *in vivo* Verhalten der Liposomen nach intravenöser Applikation wird dadurch bestimmt. So haben große Liposomen eine wesentlich geringere Plasmahalbwertszeit als kleinere, da sie von den zirkulierenden (Blut) und stationären (Leber, Milz) Makrophagen des RES erkannt und aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Liposomen mit einem Durchmesser kleiner als 150 nm können hingegen durch das fenestrierte Kapillarendothel auch in periphere Gewebe gelangen.

Eine Erhöhung der Plasmahalbwertszeit kann durch „sterische Stabilisierung“ der Liposomen erreicht werden (Klibanov et al. 1990). Dabei wird die Liposomenoberfläche mit kovalent an die Kopfgruppen gebundenen hydrophilen Polymeren, zumeist Polyethylenglykol (PEG), modifiziert und somit eine Opsonisierung (Adsorption von Plasma- und Serumproteinen auf der Liposomenoberfläche) und Erkennung durch das RES vermieden (Woodle et al. 1994). Der protektive Effekt ist sowohl von der Kettenlänge der PEG-Derivate als auch von der molaren Konzentration abhängig (Maruyama et al. 1991), wobei heute i.d.R. eine Konzentration von 5 mol%/Gesamtlipid eines pegylierten Lipidderivates mit einer Molmasse von 2000 bis 5000 eingesetzt wird, welches dann eine ca. 4 bis 5 nm dicke, kontinuierliche, hydrophile Schutzschicht auf der Liposomenoberfläche bildet (Woodle et al. 1994). Diese langzirkulierenden Liposomen werden auch als *Stealth*-Liposomen bezeichnet.

1.3.4 *Drug Targeting* mit liposomalen Konjugaten

Bereits 1906 erkannte Paul Ehrlich mit seinem „Prinzip der magischen Kugeln“ das Potential eines zielgerichteten Arzneistofftransportes (Ehrlich 1906). Ziel eines *Targeting* mit wirkstoffhaltigen Liposomen ist die spezifische Anreicherung in den Zielgeweben zur Vermeidung von Nebenwirkungen und zur Steigerung der therapeutischen Effizienz.

Ein *Targeting* kann sowohl passiv als auch aktiv erfolgen. Die Hauptvariante des passiven *Targeting* beruht darauf, dass Liposomen als körperfremde Stoffe in den Zellen des RES angereichert werden. Dieser Effekt wird in der Therapie der Leishmaniose ausgenutzt (Gilbreath et al. 1985) sowie zur Aktivierung von Makrophagen in der Antitumorthherapie (Fidler et al. 1981). Mittels „sterischer Stabilisierung“ und durch die Reduktion der Liposomengröße lässt sich prinzipiell ein passives *Targeting* zu den Kapillarendothelien von Lunge (Le Conte et al. 1992), Tumoren oder Infektionsherden erreichen, da diese eine erhöhte Kapillarpermeabilität besitzen (Wu et al. 1993).

Um jedoch ein gerichtetes *Targeting* zu jedem beliebigen Zielort zu erreichen, bedarf es der Modifizierung der Liposomen mit zielortspezifischen Vektoren, welche zumeist kovalent und seltener adsorptiv auf die Liposomenoberfläche unter Erhalt ihrer Funktion und der Liposomenintegrität gekoppelt werden (Torchilin 1985). Als Vektoren werden hauptsächlich Antikörper, Proteine und Peptide verwendet, die spezifische Zelloberflächenstrukturen, z.B. Rezeptoren, erkennen und die zelluläre Aufnahme am Wirkungsort vermitteln. Für den Erfolg des *Targeting* ist es erforderlich, spezifische Oberflächendeterminanten auf den Zielzellen zu finden, die sich zumindest quantitativ vom restlichen Organismus unterscheiden, wie z.B. die vermehrte LDL-Rezeptor-Expression in den Kapillarendothelien von Leber und BHS im Gegensatz zum Endothel großer Gefäße, bzw. idealerweise nur unter pathologischen Bedingungen exprimiert werden, wie z.B. Adhäsionsmoleküle in Entzündungsarealen oder tumorspezifische Antigene. Insbesondere auf dem Gebiet der Tumorthherapie wurde mit Immunoliposomen, Komplexen aus Liposomen und Antikörpern, beachtliche Erfolge erzielt (Bendas 2001; Maruyama 2002). Aber auch kleinere Peptide, gebunden an sterisch stabilisierten Liposomen (SSL), wurden bezüglich einer Anwendung in der Tumorthherapie untersucht wie z.B. das RGD-Peptid als Angiogenese-Inhibitor (Janssen et al. 2003), das Fibrosarkom-spezifische YIGSR-Peptid (Lopez-Barcons et al. 2004), das den in Brustkrebszellen überexprimierten VIP-Rezeptor erkennende VIP-Peptid (Dagar et al. 2003) und der Wachstumsfaktor-Antagonist G (Moreira et al. 2001) bei kleinzelligem Lungenkarzinom.

Kovalente Kopplung des Vektors

Prinzipiell kann man zwischen der Kopplung an die Kopfgruppen der Phospholipide bzw. Endgruppen der pegylierten Phospholipide von vorgefertigten Liposomen und der Präkopplung mit anschließender Insertion in das bereits bestehende Liposom unterscheiden. Es wurden verschiedene Konjugationsstrategien entwickelt, wobei die thioreaktiven Methoden aufgrund ihrer hohen Effizienz große Bedeutung bei der Herstellung von Immunliposomen erlangt haben. Dazu gehört auch die Thioladdition an Maleimido-Gruppen unter Bildung einer irreversiblen Thioetherbindung, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (Huwyler et al. 1996; Frisch et al. 1996). Dazu muss der zu koppelnde Vektor eine Sulfhydryl-Gruppe enthalten, die durch chemische Modifizierung eingeführt werden kann, entweder durch Reduktion endogener Disulfidbindungen (Dithiothreitol) oder mit Thiolyse-Reagenzien (Trauts Reagenz: 2-Iminothiolan, SATA: N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat). Selbstverständlich muss bei der kovalenten Kopplung und der chemischen Modifizierung die Funktion des Vektors erhalten bleiben. Eine ausführliche Darstellung verschiedenster Konjugationstechniken für die kovalente Vektorkopplung an Liposomen befindet sich unter New (New 1990).

Nicht-kovalente Bindung des Vektors

Die adsorptive Bindung von Vektoren an Liposomen mittels lipidbindender Domänen ist eine unkomplizierte Möglichkeit zur Herstellung von liposomalen Konjugaten für das *Drug Targeting*, da aufwendige chemische Modifizierungen und Reinigungsschritte vermieden werden. Trotzdem gibt es dafür bisher nur wenige Beispiele. Prinzipiell ist die adsorptive Bindung beschränkt auf Liganden, die eine hohe Affinität zur Lipidbilayer und eine stabile Inkorporierung in die Lipidbilayer ohne Verlust der Vektorfunktion gewährleisten. Dazu gehören insbesondere Apolipoproteine, die als Proteinkomponenten verschiedener Lipoproteine über eine hochaffine lipidbindende Domäne verfügen. So wurde gezeigt, dass Apolipoprotein B, eine Proteinkomponente von LDL-Partikeln, mit Liposomen komplexiert LDL-Rezeptor-spezifisch in Zellen aufgenommen wird (Lundberg et al. 1993). Ebenso wurden Komplexe aus Apolipoprotein E (siehe Kapitel 1.4) mit Liposomen hergestellt, mit dem Ziel, künstliche LDL-Partikel für eine tumorspezifische Arzneistoffapplikation über den in einer Reihe von Tumoren überexprimierten LDL-Rezeptor zu entwickeln (Rensen et al.

1997b; Versluis et al. 1998; Versluis et al. 1999). Diese rekombinanten Lipoproteine stellen daher ein großes Potential für den gezielten Arzneistofftransport dar (Rensen et al. 2001). Aber auch kleinere, vollsynthetisch hergestellte Peptide mit lipidbindenden Bereichen, wie z.B. amphipathischen oder transmembranalen Helizes oder Acylketten, bieten aufgrund ihrer einfachen Herstellung ein hohes Potential für eine adsorptive Vektorkopplung. Daneben ist auch die Avidin-Biotin-Technologie von Bedeutung, bei der die hohe Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin ausgenutzt wird. Dabei werden biotinylierte Vektoren und Phospholipide verwendet, wobei die Bindung zwischen Liposom und Vektor dann über Avidin als Brückenglied hergestellt wird (Rivnay et al. 1987).

Trotz dieser durchaus erfolgversprechenden Ansätze zum Erzielen eines *Targeting* ergeben sich eine Reihe von Problemen bei der Verwendung von funktionalisierten Liposomen. Allem voran ist die Instabilität der Liposomen bzw. Vektoren *in vivo* zu nennen, die durch Interaktionen mit Serumproteinen verursacht wird (Bonte und Juliano 1986; Guo et al. 1980). Insbesondere bei Immunoliposomen erfolgt durch die Anwesenheit des Antikörpers eine zusätzliche Komplementaktivierung, die in einer reduzierten Zirkulationsdauer resultiert (Harding et al. 1997). Peptidische Vektoren unterliegen dem enzymatischen Abbau durch Peptidasen. Desweiteren zeigen eine Reihe von chemischen Konjugationstechniken Immunogenität (Boeckler et al. 1996). Diese Probleme sind jedoch nicht unlösbar. So kann die *in vivo* Halbwertszeit durch stabilisierende Maßnahmen erhöht werden, wie z.B. PEG-Modifizierung, Erhöhung der Liposomenstabilität durch Cholesterol, Verbesserung der Vektorstabilität und Verringerung der Antigenität durch Verwendung von humanisierten Antikörpern bzw. Fragmenten.

Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass nach der Anreicherung der Liposomen am Wirkort auch der Wirkstoff für die Zelle verfügbar gemacht werden muss; entweder durch Endozytose des Vesikels, Fusion mit der Zellmembran oder durch extrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes und anschließenden Transport in das Zellinnere. Die Verwendung von Vektoren, die ein *Targeting* ermöglichen und gleichzeitig einen endozytotischen Aufnahmeweg initiieren, erscheint als die ideale Lösung. Vesikelfusion mit der Zellmembran ist durch Einbau von fusogenen Stoffen, z.B. Fusionsproteine, forcierbar. Weiterhin können Liposomen auch mit einem *Controlled-Release-Mechanismus* versehen werden, in dem sie z.B. pH-, Target- oder Temperatur-abhängig den Vesikelinhalt freisetzen. Alles in allem stehen den Problemen Lösungen und erfolgreiche Untersuchungen sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* gegenüber, die die Verwendbarkeit von Liposomen für eine gezielte Arzneistoffapplikation bekräftigen.

Liposomale Konjugate zum Transport über die Blut-Hirn-Schranke

Wie bereits in Kapitel 1.2.6. dargestellt, gibt es eine Reihe von Ansätzen zum Vektorvermittelten Transport über die Blut-Hirn-Schranke. Jedoch mangelt es an Wissen über Transportsysteme, die spezifisch an der BHS vorkommen. Aufgrund dessen und aufgrund des stark limitierten Transports im allgemeinen steht an der BHS eher die Verbesserung des Transportes im Vordergrund. Man sollte daher eher von *Drug Delivery* anstelle von *Drug Targeting* sprechen.

Im Gegensatz zu den in 1.2.6 beschriebenen Konjugaten weisen Liposomen aufgrund der Arzneistoffverkapselung dabei entscheidende Vorteile auf. Tabelle 1.1 zeigt bisher für einen Transport über die BHS untersuchte liposomale Konjugate mit zumeist kovalent gebundenem Vektor.

Tabelle 1.1: Liposomale Vektoren zum Arzneistofftransport über die BHS

Vektor	Zielstruktur	Transport	Literatur
kationisiertes Albumin	anionische Zelloberfläche	adsorptive Endozytose	(Thöle et al. 2002)
Anti-Insulin-Rezeptor-Antikörper	Insulin-Rezeptor	rezeptorvermittelte Endozytose	(Zhang et al. 2002)
Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper OX26	Transferrin-Rezeptor	rezeptorvermittelte Transzytose	(Cerletti et al. 2000; Huwyler et al. 1996)
Transferrin	Transferrin-Rezeptor	rezeptorvermittelte Transzytose	(Omori et al. 2003)
RMP7-Peptid	Bradykinin-Rezeptor	Öffnung der <i>Tight Junctions</i>	(Zhang et al. 2003)

Mit diesen Beispielen wurde gezeigt, dass funktionalisierte Liposomen ein großes Potential für die Verbesserung des Arzneistofftransportes über die BHS haben. Das zunehmende Wissen über spezifische Transportsysteme an der BHS wird daher auch zu einer Weiterentwicklung der liposomalen Konjugate führen.

1.4 Apolipoprotein E und ApoE-abgeleitete Peptide

Apolipoprotein E (ApoE), zuerst beschrieben von Shore et al. im Jahre 1973 und ursprünglich bezeichnet als das „Arginin-reiche Apoprotein“, ist ein Mitglied der heterogenen Gruppe von Apolipoproteinen, die in zehn Klassen (A bis J) eingeteilt werden. Sie besitzen als stabilisierende Proteinkomponenten der Lipoproteine spezifische Funktionen im Lipidtransport, in der Aktivierung bzw. Inhibierung bestimmter Enzyme des Lipidstoffwechsels und in der Rezeptorinteraktion. Das sowohl strukturell als auch funktionell am besten charakterisierte Apolipoprotein ist ApoE, dessen Bedeutung weit über seine zahlreichen Funktionen im Lipidstoffwechsel hinaus geht.

1.4.1 Vorkommen, Struktur und Funktion

ApoE kommt vor allem in Triglyzerid-reichen Lipoproteinen der Dichte $d < 1,019 \text{ kg/l}$, also hauptsächlich in Chylomikronen sowie in deren Abbauprodukten (*Remnants*), in *Very Low-Density-Lipoproteinen* (VLDL) und in *Intermediate-Density-Lipoproteinen* (IDL), aber auch in Cholesterol-reichen *High-Density-Lipoproteinen* (HDL) vor. Es wird zum größten Teil in den Parenchymzellen der Leber synthetisiert und sezerniert, kommt aber auch in vielen anderen Organen wie Gehirn (insbesondere in den Astrozyten und im Liquor cerebrospinalis), Lunge, Niere, Milz, in Makrophagen und in der glatten Muskulatur vor (Mahley 1988). Die normale Plasmakonzentration von ApoE beträgt 3 bis 7 mg/dl (Mahley et al. 1984).

ApoE ist ein 34,2 kDa großes helikales Protein, das aus 299 Aminosäuren (AS) besteht (Rall, Jr. et al. 1982). Prinzipiell besteht ApoE aus zwei unabhängigen und unterschiedlich gefalteten, helikalen Domänen: einer globularen N-terminalen Domäne (AS 1-191), die die LDL-Rezeptor-Bindungsregion enthält, und einem gestreckten C-Terminus, der für die Lipidbindung verantwortlich ist (Wetterau et al. 1988). In hydrophiler Umgebung und in Abwesenheit lipophiler Oberflächen bildet ApoE über einen großen Konzentrationsbereich hinweg Tetramere, die durch die Selbstassoziation des C-Terminus entstehen (Aggerbeck et al. 1988). Diese Tetramere existieren jedoch nicht in lipophiler Umgebung. Die Struktur des N-Terminus wurde mittels Röntgen-Kristallographie untersucht. Er bildet ein aus vier Helizes bestehendes Bündel (Abbildung 1.4) (Wilson et al. 1991), wobei die hydrophoben Anteile der Helizes im Inneren des Bündels lokalisiert sind und die hydrophilen Anteile nach außen ragen.

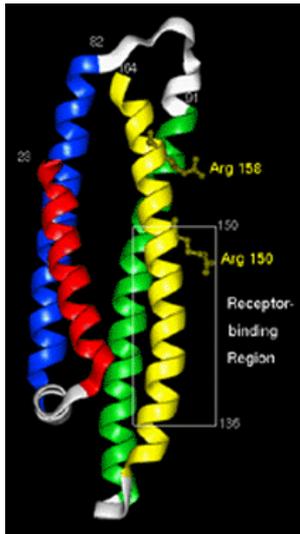


Abbildung 1.4: N-Terminus von Apolipoprotein E, 4-Helix-Bündel mit LDL-Rezeptor-Bindungsregion
(aus: <http://www-structure.llnl.gov/ApoE/apoe.html>)

Helix 1:	AS 24-42
Helix 2:	AS 54-81
Helix 3:	AS 87-122
Helix 4:	AS 130-164

LDL-Rezeptor-Bindungsregion:	AS 140-160
Heparin-Bindungsregion:	AS 142-147

AS 140-160: H LRKLR KLLLR DAADL QKRLA

Die LDL-Rezeptor-Bindungsregion wurde in der Helix 4 zwischen den AS 140 bis 160 lokalisiert (Mahley 1988; Weisgraber et al. 1983; Innerarity et al. 1983) und ist eine stark konservierte Region (Weisgraber 1994). Dieser Sequenzbereich ist durch eine massive Ansammlung von basischen Aminosäuren gekennzeichnet, die für die elektrostatischen Interaktionen mit der anionischen Bindungsdomäne des LDL-Rezeptors (Brown und Goldstein 1986) verantwortlich und damit essentiell für die physiologische Funktion sind.

ApoE bindet an Lipid-Oberflächen und an Lipoproteinen durch die amphipathischen Helizes des C-Terminus und vermittelt den Transport von Cholesterol- und Triglyzerid-haltigen Lipoproteinen im Organismus, die Umverteilung zwischen verschiedenen Geweben und die Bindung an verschiedene Rezeptoren (Mahley 1988). ApoE ist neben ApoB ein Ligand des LDL-Rezeptors und des LDL-Rezeptor-assoziierten Proteins (LRP). Weiterhin bindet ApoE auch an andere Lipoprotein-Rezeptoren, wie z.B. VLDL-Rezeptor und ApoE-Rezeptor.

Daneben besitzt ApoE eine hochaffine Heparin-Bindungsstelle in den AS 142 bis 147, die mit der LDL-Rezeptor-Bindungssequenz koinzidiert (Weisgraber et al. 1986; Cardin et al. 1986). Die Ursache der Interaktion mit Heparin liegt in der elektrostatischen Wechselwirkung der positiv geladenen Aminosäuren mit den negativen Sulfat- und Carboxylatgruppen des Heparins. Eine *in vivo* vorhandene Heparin-artige Struktur, mit der ApoE-haltige Lipoproteine wechselwirken können, ist das polyanionische Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG), das auf allen Säugerzellmembranen und in der extrazellulären Matrix vorkommt. Auf den Zellmembranen übernimmt das HSPG Rezeptor- und - durch die endozytotische Aktivität - Internalisierungsfunktion für viele biologisch aktive Liganden, z.B. Thrombin, Wachstumsfaktoren und virale Invasionsfaktoren (siehe auch Kapitel 1.2.6) (Belting 2003). Es kann auch als „Co-Rezeptor“ dienen, indem es die Rezeptorinteraktion der Liganden

moduliert. Das HSPG spielt auch bei der Verstoffwechslung von Chylomikron-*Remnants*, die neben dem LDL-Rezeptor bzw. dem LRP auch über das HSPG internalisiert werden können, eine wichtige Rolle (Ji et al. 1994). Weiterhin wurde schon frühzeitig diskutiert, dass die Interaktion von Lipoproteinen mit der Zellmembran der arteriellen Gefäße einen Beitrag zur Atherosklerose-assoziierten Cholesterablagerung liefert (Srinivasan et al. 1972).

ApoE hat aufgrund seines weitverbreiteten Vorkommens noch weitere Funktionen. Dazu gehören die Modulation der zellulären Immunantwort (Mahley 1988), Hemmung der Thrombozytenaggregation (Riddell et al. 1997), Regulation der Steroidhormonsynthese (Reyland et al. 1991) und die Beeinflussung von Wachstum und Differenzierung von Neuronen, wobei ApoE insbesondere bei Reparatur- und Remyelinisierungsprozessen nach Nervenzelltraumen eine wichtige Rolle spielt (Mahley 1988; Poirier 1994).

1.4.2 Interaktion mit dem LDL-Rezeptor



Der LDL-Rezeptor ist ein aus 839 AS bestehendes transmembranäres Glykoprotein, wobei die N-terminale Domäne die Cystein-reiche Bindungsregion für ApoE und ApoB100 enthält und der C-Terminus mit dem Zytoskelett verbunden ist. Der LDL-Rezeptor ist ubiquitär präsent und reguliert den Plasmacholesterolspiegel indem er die endozytische Aufnahme Cholesterol-reicher Lipoproteine über *Clathrin-coated Pits* und deren Metabolismus vermittelt (Brown und Goldstein 1986).

Abbildung 1.5: Struktur des LDL-Rezeptors (<http://web.umn.edu/~nercal/>)

Das LDL-Rezeptor-Expressionslevel einer Zelle ist stark abhängig vom Cholesterol-Angebot; bei Mangel wird die Expression hochreguliert (bis zu 100 000 Rezeptoren pro Zelle), um die Aufnahme zu steigern und die Versorgung der Zelle sicherzustellen (Goldstein et al. 1983).

ApoE bindet mit einer 20- bis 25-fach erhöhten Affinität an den LDL-Rezeptor verglichen mit ApoB100 (Mahley et al. 1984). Die Ursache dafür ist, dass bis zu vier ApoE-Moleküle mit einem Rezeptormolekül interagieren. Je mehr ApoE-Moleküle auf einem Lipoprotein-Partikel vorhanden sind, desto höher ist dessen Affinität zum Rezeptor (Weisgraber 1994; Pitas et al. 1979). Mit der hohen Affinität zum LDL-Rezeptor korreliert auch die sehr schnelle Plasma-Clearance ApoE-haltiger Lipoproteine im Vergleich zu ApoB-enthaltenden LDL-Partikeln (Mahley et al. 1984).

Weiterhin ist bekannt, dass ApoE nur im Lipid-assoziierten Zustand die richtige Konformation für die Bindung an den LDL-Rezeptor hat (Innerarity et al. 1979), wobei die Konformation und damit die Rezeptoraffinität von der Lipidzusammensetzung der Lipoproteine moduliert wird (Weisgraber 1994). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Emulsionspartikeln gefunden (Rensen et al. 1997a).

1.4.3 ApoE und LDL-Rezeptoren im Gehirn und an der Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn verfügt über ein autarkes System für die Synthese und den Transport von Lipiden und Cholesterol. Die Anwesenheit von verschiedenen Lipoproteinen, Apolipoproteinen und deren Rezeptoren im Gehirn wurde nachgewiesen (Pitas et al. 1987). Damit ist das Gehirn in der Lage, die Cholesterol- und Lipid-Homöostase eigenständig aufrechtzuerhalten. Störungen dieser Homöostase haben pathologische Auswirkungen und werden unter anderem im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit und anderen neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert (Danik et al. 1999).

Das Gehirn besitzt darüber hinaus die Möglichkeit, essentielle Lipide aus dem Plasma aufzunehmen. Dabei spielt insbesondere der LDL-Rezeptor an der BHS, der auf der luminalen Membran des Gehirnkapillarendothels anwesend ist, eine wichtige Rolle (Meresse et al. 1989). Interessanterweise ist die LDL-Rezeptor-Expression auf dem Gehirnkapillarendothel hochreguliert (Dehouck et al. 1994), wohingegen die Expression auf dem Endothel großer Gefäße runterreguliert ist (Kenagy et al. 1984; Vasile et al. 1983). Für die Expressionsregulation an der BHS scheinen insbesondere die Astrozyten eine wichtige Rolle zu spielen. Bei der *in vitro* Co-Kultur von Gehirnkapillarendothelzellen mit Astrozyten wurde gefunden, dass ein von Astrozyten sezernierter löslicher Faktor diese Regulation übernimmt (Lucarelli et al. 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass LDL-Partikel über eine LDL-Rezeptor-vermittelte Transzytose unter Umgehung der lysosomalen Degradation, anders als der klassische LDL-Rezeptor-Transportweg, in das Gehirn gelangen können (Dehouck et al. 1997).

ApoE ist als Ligand des LDL-Rezeptors prinzipiell in der Lage, den Transport von Lipoproteinen über die BHS zu vermitteln. Die Datenlage hierzu ist jedoch unzureichend. Es wurde zwar mehrfach gezeigt, dass einige Lipoproteine die BHS passieren können (Urien et al. 1987; Goti et al. 2000; Balazs et al. 2004; de Vries et al. 1995), jedoch bleibt die Beteiligung von ApoE im Unklaren. Es scheint aber für den Erhalt der BHS-Funktionen wichtig zu sein. In ApoE-*Knock Out* Mäusen wurde zurückzuführen auf eine beschädigte BHS eine erhöhte Permeabilität für Immunglobuline gefunden (Fullerton et al. 2001).

Wie bereits im Kapitel 1.2.7 dargestellt, zeigen die Arbeiten von Kreuter (Kreuter et al. 2002), dass ApoE bei dem Transport von Nanopartikel-gebundenen Arzneistoffen über die BHS eine entscheidende Rolle spielt. Weiterhin wurde eine vermehrte Adsorption von ApoE auf Lipidnanopartikeln bei Inkubation mit Serumproteinen gefunden, was im Zusammenhang mit der erfolgreichen Passage dieser Partikel über die BHS diskutiert wurde (Gessner et al. 2001). Ob ApoE dabei einen LDL-Rezeptor-abhängigen Aufnahmemechanismus initiiert oder ob ApoE die Bindung der Partikel an das Gehirnkapillarendothel vermittelt und der Arzneistoff folglich aufgrund des Konzentrationsgefälles durch die BHS diffundiert, geht aus diesen Arbeiten nicht klar hervor, in jedem Falle scheint ApoE jedoch ursächlich beteiligt zu sein. Die Arbeiten von Verslius et al. und Rensen et al. zeigen, dass rekombinante Lipoproteine für das *Targeting* verwendet werden können (Rensen et al. 2001). So zeigten Komplexe aus ApoE und Liposomen (siehe Kapitel 1.3.4) eine spezifische Aufnahme über den in Tumoren überexprimierten LDL-Rezeptor (Rensen et al. 1997b; Versluis et al. 1998; Versluis et al. 1999).

Das Vorhandensein des LDL-Rezeptors am Gehirnkapillarendothel in einem im Vergleich zum Endothel der großen Gefäße hochregulierten Expressionsstatus, der transzytotische Transportweg über die BHS und ApoE als hochaffiner Ligand des LDL-Rezeptors ergeben ein vielversprechendes Konzept, das für eine Verbesserung des Arzneistofftransportes über die BHS mittels eines Vektor-Träger-Systems genutzt werden könnte, wobei ApoE oder davon abgeleitete rezeptoraktive Peptide als Vektoren fungieren könnten.

1.4.4 ApoE-abgeleitete Peptide

Untersuchungen mit Analoga und synthetischen Peptiden abgeleitet aus der LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne von ApoE haben wesentlich zur Klärung der strukturellen Voraussetzungen für eine LDL-Rezeptor-Bindung beigetragen. Obwohl diese Peptide LDL-Rezeptor-Affinität zeigen, sind sie in der Lage, auch Rezeptor-unspezifische Aufnahmeprozesse auszulösen.

Ein rezeptoraktives Peptid muss eine aus dem Bereich AS 140 bis 160 abgeleitete kationische Sequenz enthalten und eine amphipathische α -Helix bilden können, wobei die Sequenz so beschaffen sein muss, dass sich durch die räumliche Anordnung mindestens zwei Cluster basischer Aminosäuren auf der hydrophilen Seite der Helix ergeben (Dyer et al. 1995). Obwohl die Sequenz AS 141-155 die positiven Ladungen der Bindungsdomäne enthält, zeigt sie keine Rezeptorbindungsaktivität. Erst das Tandemdimer (141-155)₂ zeigt eine α -helikale

Konformation und bindet an den LDL-Rezeptor mit einer Aktivität von ca. 1 % der von LDL-Partikeln bzw. ApoB100 (Dyer und Curtiss 1991; Weisgraber 1994). Von Dyer und Curtiss wurde eine Zunahme der LDL-Rezeptor-Affinität bei Zunahme der Multimerisierung des Peptides gezeigt: Monomer (keine Rezeptoraktivität), Dimer und Trimer (20-fach erhöhte Affinität verglichen mit dem Dimer) des Peptides 141-155 (Dyer und Curtiss 1991). Die Erklärung für die Zunahme der Bindungsaffinität ist, dass durch die Oligomerisierung eine stabilere α -helikale Konformation vorliegt. Eine α -helikale Konformation kann aber auch durch eine Erhöhung der Lipidaffinität erzielt werden, z.B. durch das Einführen von Alkylketten, wodurch die Strukturierung des Peptides durch Bindung an Lipidvesikel erleichtert wird (Mims et al. 1994).

Eine Interaktion dieser Peptide kann auch mit dem LRP (LDL-Rezeptor-related Protein) erfolgen. Das LRP weist eine hohe Sequenzhomologie zum LDL-Rezeptor auf und benötigt damit offenbar dieselben ApoE-Sequenzbereiche wie für die LDL-Rezeptor-Bindung (Dyer und Curtiss 1991; Dyer et al. 1991). Für das Tandemdimer (141-149)₂ wurde ein endozytotischer Aufnahmeprozess in kultivierte corticale Neuronen gefunden, der vermutlich über das LRP vermittelt wurde (Wang et al. 1997). Erst kürzlich beschrieben Croy et al. die Interaktion des Tandemdimerpeptides (141-155)₂ mit dem LRP1 (Croy et al. 2004), welches mehrere sequenzhomologe Bereiche zum LDL-Rezeptor besitzt und damit einen weiteren spezifischen Interaktionspartner für ApoE und -abgeleitete Peptide auf der Zelloberfläche darstellt.

Allerdings ist die Existenz von spezifischen Bindungsorten (LDL-Rezeptor oder LRP) nicht notwendigerweise an einen endozytotischen Aufnahmeweg gebunden. So ist das Zweidomänen-Peptid bestehend aus dem Dekapeptid 141-150 und einer Lipid-bindenden, amphipathischen Klasse A-Helix in der Lage, die Aufnahme von LDL-Partikeln zu vermitteln; hauptsächlich über Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-vermittelte adsorptive Endozytose (Datta et al. 2000). Dabei kommt es zu einer Komplexierung des Lipid-bindenden Bereiches des Peptides mit den Lipoproteinen und einer elektrostatischen Interaktion zwischen dem positiv geladenen Bereich des Peptides und den negativ geladenen Heparansulfat-Ketten der Proteoglykan-Matrix der Zelloberfläche. *In vivo* Versuche mit diesem Peptid zeigten eine Interaktion mit LDL- und VLDL-Partikeln und eine verbesserte Clearance der Lipoproteine über das HSPG der Leber (Datta et al. 2001). Von Murdoch et al. wurde gefunden, dass die Sequenz des Perlecan, eines Kernproteins der Proteoglykan-Matrix der Basalmembran, eine LDL-Rezeptor-ähnliche, Cystein-reiche Sequenz aufweist (Murdoch

et al. 1992). Eine Interaktion der ApoE-abgeleiteten Peptide ist also nicht nur mit den Heparin-ähnlichen Seitenketten, sondern auch mit den Kernproteinen des HSPGs möglich.

Weiterhin wurde ein neurotoxischer Effekt für das Tandempeptid (141-155)₂ gefunden, der nicht über ein Mitglied der LDL-Rezeptor-Familie vermittelt wurde und möglicherweise mit der Alzheimer-Krankheit assoziiert ist (Moulder et al. 1999). Da amphipathische Peptide mit Membranen wechselwirken, ist es wahrscheinlich, dass der toxische Effekt durch Membranpermeation ausgelöst wird.

Aufgrund der geringen Größe und der großen Anzahl von basischen Aminosäuren in den ApoE-abgeleiteten Peptiden besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zur Klasse der „zellpenetrierenden Peptide“, die fast jede Zellmembran und sogar die BHS überqueren können (siehe Kapitel 1.2.6) und zudem auch Makromoleküle oder vesikuläre Strukturen wie Liposomen (Torchilin et al. 2001) ins Zellinnere transportieren können. Der tatsächliche Mechanismus der Translokation ist allerdings unklar (siehe Kapitel 1.2.6). Diskutiert wird unter anderem ein endozytotischer Aufnahmeprozess mit Involvierung des HSPGs aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen.

Eine Idee von Dyer et al. war, die bei Hyperlipidämie vorliegenden erhöhten Plasma-cholesterol-Spiegel durch Leberaufnahme-vermittelnde, synthetische ApoE-Peptide zu senken (Dyer et al. 1995). Die Beobachtung, dass die intravenöse Injektion des N-terminal acetylierten Dimerpeptides (141-155)₂ in hyperlipidämischen ApoE-*Knock Out* Mäusen zu einer drastischen Senkung des Plasmacholesterol-Spiegels führte, ist auf die Lipidaffinität des Peptides, die Komplexierung mit im Plasma vorhandenen Lipoproteinen und die daraus resultierende erhöhte Clearance der Lipoproteine zurückzuführen (Nikoulin und Curtiss 1998). An der Aufnahme sind sowohl der LDL-Rezeptor, das LRP als auch HSPG beteiligt, was *in vitro* an kultivierten Fibroblastenzellen gezeigt wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden bei intravenöser Injektion des Zweidomänen-Peptides von Datta gemacht (Garber et al. 2003). Die Clearance der VLDL- und LDL- Partikel durch die Leber erfolgte dabei über einen HSPG-vermittelten Aufnahmeweg. Da der erzielte *in vivo* Effekt aufgrund der enzymatischen Degradation des Zweidomänen-Peptides jedoch nur von kurzer Dauer ist, wurde von Ramprasad et al. ein liposomales Trägersystem mit verlängerter Freisetzungsdauer verwendet (DepoFoamTM, Skye-Pharma). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde eine verlängerte, nachhaltige Freisetzung des Peptides aus den Liposomen und ein damit verbundener verbesserter therapeutischer Effekt erzielt (Ramprasad et al. 2002).