

2 Allgemeiner Teil

2.1 Arzneistofftransport über die Blut-Hirn-Schranke

Durch die Zunahme der Lebenserwartung in unserer modernen Gesellschaft treten degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie Demenz oder die Alzheimer Erkrankung, immer mehr in den Vordergrund. Nicht zuletzt deshalb stellt die Therapie von Erkrankungen des ZNS ein wichtiges Gebiet moderner Arzneimittelentwicklung dar. Da die Blut-Hirn-Schranke (BHS) aber die undurchlässigste Barriere im Organismus ist (Forth et al., 2001), stellt der Arzneistofftransport über die BHS zugleich auch die größte Herausforderung für die Arzneiformentwicklung dar. So können z. B. mehr als 98% aller potentieller ZNS-Wirkstoffe die BHS nicht passieren (Pardridge, 2003).

2.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Das extrazelluläre Milieu des Gehirns ist vom Blutplasma durch eine restriktive Barriere, die sogenannte Blut-Hirn-Schranke getrennt. Sie wird von den Kapillarendothelzellen der zerebralen Blutgefäße gebildet, wobei eine polarisierte Endothelzelle den gesamten Kapillariumfang umschließt (Abb. 2.1-1 a, b). Im Gegensatz zu den peripheren Kapillaren gibt es hier keine Fenestrierung, denn die angrenzenden Endothelzellen sind durch kontinuierliche Membranfusionen miteinander verbunden. Diese dichten Zell-Zell-Verbindungen werden „Tight Junctions“ genannt und verursachen eine strikte Trennung des Kapillarlumens vom Interstitium des Gehirns (Goldstein und Betz, 1983).

Die Endothelzellen sind von einer Basalmembran umgeben (Abb. 2.1-1 b), deren Hauptaufgabe eine Stützfunktion ist. Die Basalmembran ist fast vollständig mit Astrozytenfortsätzen besetzt. Die Astrozyten gehören zur Glia des ZNS und über die Ausschüttung von Faktoren aus ihren Endfüßen haben sie einen starken Einfluss auf die Dichtigkeit des Endothels (Janzer und Raff, 1987). Auf der abluminalen Oberfläche befinden sich weitere verschiedene Zelltypen wie Neuriten, Perizyten und Mikroglia (Abb. 2.1-1 b). Über die Neuriten erfolgt die Innervierung der Kapillaren, die genauen Funktionen der anderen Zelltypen an der BHS sind noch weitgehend ungeklärt (Klimke und Silbernagl, 2003).

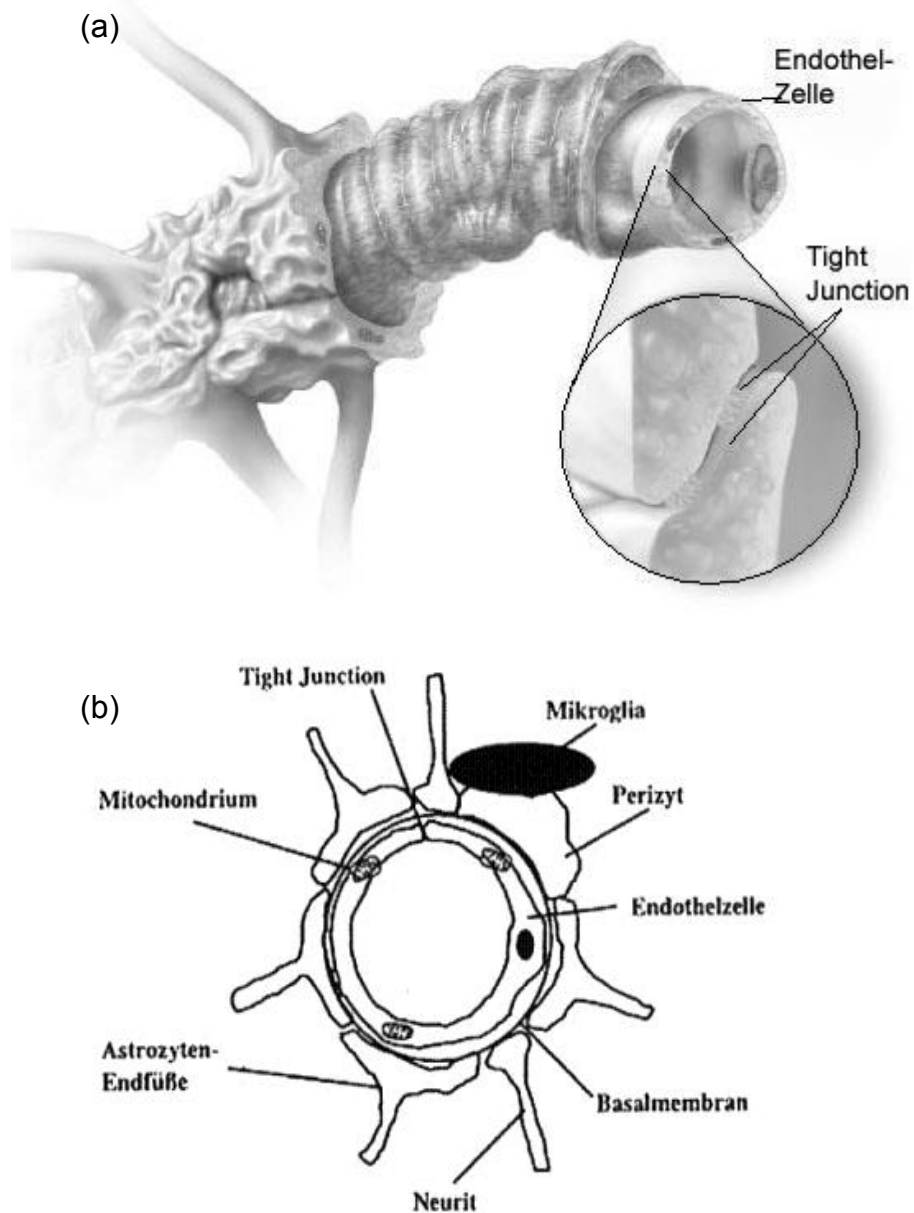


Abb. 2.1-1 (a): Zerebrale Kapillare mit Astrozyten besetzt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die dichte Zell-Zell-Verbindung (Tight Junction) (Miller, 2002). (b): Schematischer Querschnitt einer zerebralen Kapillare (Borchard, 1998).

Wie bereits einleitend erwähnt, ist das Gehirn auf einen Schutz vor im Blut zirkulierenden Fremdstoffen und auf eine Aufrechterhaltung der inneren Homöostase zwingend angewiesen. Deshalb gibt es zusätzlich zu der morphologischen Dichtigkeit der zerebralen Blutgefäße noch weitere Faktoren, die zur ausgeprägten Barrierefunktion der BHS führen:

Einen wichtigen Beitrag liefert die aktive Effluxpumpe P-Glykoprotein (P-gp, codiert von dem Multi Drug Resistance-Gen MDR1). Sie ist in der luminalen Membran der

zerebralen Endothelzellen lokalisiert und transportiert lipophile Stoffe, die in die Membran eingedrungen sind, zurück in das Kapillarlumen (Cordon-Cardo et al., 1989). Bemerkenswert ist das für einen aktiven Transporter äußerst breite Substanzspektrum, was erklärt, warum selbst viele kleine, lipophile Arzneistoffe die BHS nicht passieren können. Generell werden von P-gp eher lipophile und kationische Substanzen transportiert. Dazu zählen z. B. Zytostatika, wie Vinca-Alkaloide und Anthrazykline, HIV-Proteaseinhibitoren, wie Ritonavir oder Immunsuppressiva wie Cyclosporin A (Seelig, 1998). Daneben gibt es an der BHS noch weitere effiziente Effluxpumpen aus der Familie der ATP-binding-cassette-Transportproteine (ABC-Transportproteine), z. B. das Multi-drug-resistance-related Protein 2 (MRP2) (Huai-Yun et al., 1998, Kusuhara und Sugiyama, 2002). Durch ATP-Hydrolyse treiben diese ABC-Proteine den Transport von Substanzen durch Zellmembranen gegen einen Konzentrationsgradienten an.

Einen großen Beitrag zur Barrierefunktion der BHS leistet auch die im Vergleich zu peripheren Kapillarendothelzellen sehr geringe Endozytose- und Pinozytoseaktivität der zerebralen Kapillarendothelzellen (Goldstein und Betz, 1983).

Daneben verfügen die Gehirnkapillarendothelzellen über eine umfangreiche Enzymausstattung mit hoher Aktivität (z. B. Leucin-Amino-peptidase, Acetylcholin-esterase oder Angiotensin Converting Enzyme), wodurch wiederum viele durch passive Diffusion eingetretene Stoffe inaktiviert werden können (Drewes, 1999).

2.1.2 Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke

Damit die innere Homöostase und die Energieversorgung des Gehirns gewährleistet sind, ist es aber auch zwingend erforderlich, dass die BHS nicht für alle Stoffe undurchlässig ist. Deshalb existieren eine Reihe spezifischer Transportsysteme an der luminalen und abluminalen Membran der zerebralen Kapillarendothelzellen. Sie ermöglichen einen selektiven Stoffaustausch zwischen Blut und Interstitium des Gehirns. Abb. 2.1-2 zeigt eine Übersicht über die Transportprozesse an der BHS, die im folgenden näher beschrieben werden.

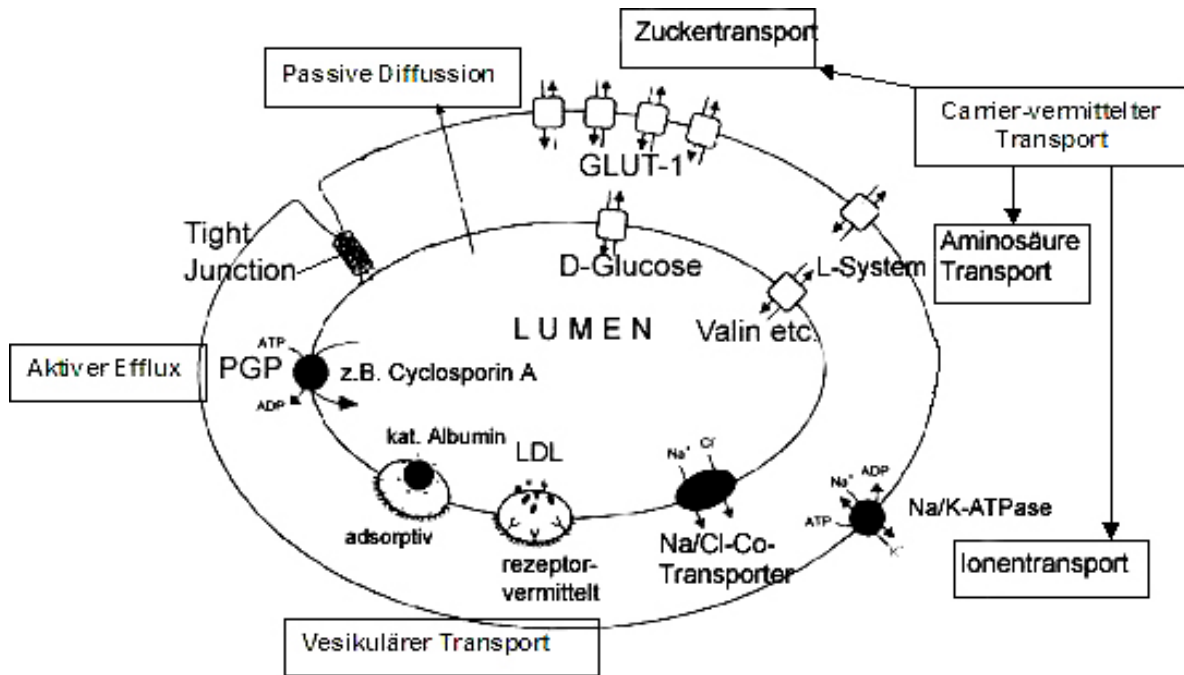


Abb. 2.1-2: Transportprozesse an einer zerebralen Kapillarendothelzelle (modifiziert nach Bauer (2002)).

2.1.2.1 Passive Diffusion (Permeation)

Alle Verbindungen, die ein Molekulargewicht von weniger als 500 Dalton (Da) aufweisen und ausreichend lipophil sind, können theoretisch einem Konzentrationsgradienten folgend passiv ins Gehirn diffundieren (Miller, 2002). Praktisch spielt das jedoch nur eine Rolle für einige lipophile Vitamine und Arzneistoffe, die nicht Substrat einer Effluxpumpe (v. a. P-gp) sind. Außerdem gelangen auf diese Weise z. B. Sauerstoff, Kohlendioxid oder volatile Anästhetika wie Lachgas (Distickstoffoxid) in das Gehirn.

2.1.2.2 Transportsysteme

2.1.2.2.1 Carrier-vermittelter Transport

Glucose ist der Hauptenergielieferant des Gehirns und wird vor allem mittels des Insulin- und ATP-unabhängigen Hexose-Transporters GLUT-1 aufgenommen (Goldstein und Betz, 1983). Dieses Transportprotein ist sowohl auf der luminalen als auch auf der abluminalen Membran der zerebralen Kapillarendothelzellen zu finden. Der Durchtritt der hydrophilen Glucose wird somit durch erleichterte Diffusion ermöglicht.

Für Aminosäuren, als Bausteine der Proteinbiosynthese, sind fünf verschiedene Transportsysteme an der BHS bekannt. Das wichtigste ist das L (Leucin)-System

(=LNAA (large neutral amino acid)-System) für große neutrale und aromatische, essentielle Aminosäuren, wie z. B. Phenylalanin (Audus und Borchardt, 1986). Der LAT1-Transporter gehört zu diesem L-System und transportiert unter anderem auch Levodopa (L-Dopa, Madopar[®]) - die Vorstufe des Neurotransmitters Dopamin - in das Gehirn. Dies nutzt man bei der Therapie des Parkinson-Syndroms aus, denn die naheliegende Behandlung mit dem nicht mehr ausreichend gebildeten Dopamin ist nicht möglich, weil dieses die BHS nicht passieren kann (Mutschler, 2001).

Daneben existieren an der BHS noch weitere aktive Transporter wie der Monocarboxylsäure-Carrier für den Transport von Pyruvat, Laktat und β -Hydroxybutyrat oder der Purin-Base-Carrier für den Transport von Purinbasen wie z. B. Adenin (Borchard, 1998).

Zur Aufrechterhaltung des Ionenkonzentrationsgradienten existieren in der luminalen und abluminalen Endothelzellmembran Ionenkanäle und -transporter wie z. B. die Na^+/K^+ -ATPase (Goldstein und Betz, 1983).

2.1.2.2.2 Vesikulärer Transport

Makromoleküle werden mittels Endozytose in die Kapillarendothelzellen aufgenommen bzw. mittels Transzytose vesikulär durch die BHS transportiert (Abbott und Romero, 1996).

Die Endozytose beginnt in den „Clathrin-coated pits“ der Plasmamembran. Dabei handelt es sich um Einstülpungen der Membran, die mit dem Protein Clathrin besetzt sind. Die daraus entstehenden Vesikel im Zellinnern heißen „Clathrin-coated vesicles“ (Steer und Klausner, 1983). Diese sind sehr kurzlebig und verschmelzen schnell mit frühen Endosomen (Transportvesikel). Die Endosomen wiederum fusionieren dann entweder mit Lysosomen, wobei ihr Vesikelinhalt durch lysosomale Enzyme verdaut wird, oder sie verschmelzen mit der abluminalen Membran der BHS, wobei der Inhalt freigegeben wird (Transzytose) (Steer und Klausner, 1983).

Bei der adsorptiven Endozytose binden positiv geladene Liganden an anionische Strukturen der Zellmembran (z. B. Glycoproteine) und werden dann internalisiert. Ein Beispiel hierfür ist kationisiertes Albumin (Kumagai et al., 1987).

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose binden Moleküle hochspezifisch an luminalen Membran-Rezeptoren und lösen so einen endozytotischen Aufnahmeprozess aus. Beispiele für so ins Gehirn aufgenommene Makromoleküle sind Insulin (Pardridge et al., 1985), das Eisen-transportierende Transferrin (Fishman et al., 1987) oder das Cholesterol-reiche LDL (Dehouck et al., 1997). Bisher sind ca. 15 derartige

Transportsysteme an der BHS identifiziert worden, Schätzungen zufolge gibt es aber mindestens 50 davon (Miller, 2002).

2.1.3 Strategien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die Entwicklung von Drug Delivery-Systemen für einen Transport über die BHS blieb bisher fast ausschließlich der akademischen Forschung vorbehalten, da sich die Pharmaindustrie hauptsächlich auf die Entwicklung kleiner, ZNS-gängiger Wirkstoffe konzentrierte (Miller, 2002). Wie bereits einleitend erwähnt, sind jedoch gerade die neueren entwickelten Wirkstoffe zunehmend Makromoleküle, weshalb auch die Unternehmungen und die Zahl der Strategien zur Überwindung der BHS immer mehr zunehmen. Nach Partridge (1996) können diese Strategien in invasive, pharmakologische und physiologische Verfahren eingeteilt werden.

2.1.3.1 Invasive Strategien

Die Durchlässigkeit der BHS kann durch Infusion hypertotonischer Lösungen, von z. B. Mannitose in die Halsschlagader, zeitweise erhöht werden (Rapoport, 1988). Die hypertotonische Lösung bewirkt eine Schrumpfung der Endothelzellen, wodurch ein Zug auf die Tight Junctions entsteht und sich Poren in der BHS bilden. Eine Abwandlung dieser Methode wurde bereits in den USA in klinischen Studien zur Behandlung von Gehirntumoren getestet (Doolittle et al., 2002). Weiterhin wurde eine Erhöhung der Durchlässigkeit der BHS für Substanzen wie den Bradykinin-Rezeptoragonist RMP-7 (Sanovich et al., 1995), Leukotriene und Histamin (Begley, 1996) beschrieben. Ein klarer Nachteil dieser Methoden ist jedoch die fehlende Spezifität, da die Permeabilität für alle Substanzen und Krankheitserreger, die klein genug sind, erhöht wird, was ein entsprechend hohes Risiko mit sich bringt.

Eine weitere, nicht minder risikoreiche, invasive Technik ist ein chirurgischer Eingriff, bei dem ein Arzneistoffträgersystem in das Gehirn implantiert wird (Bellinzona et al., 2004). Obwohl dies auf den ersten Blick die zuverlässigste Methode ist, den Arzneistoff ins Gehirn zu bekommen, ist der klinische Erfolg solcher Implantate bisher trotzdem eher ernüchternd ausgefallen (Miller, 2002). Aus diesen Gründen ist das 1996 von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA zugelassene Gliadel[®] Wafer, ein Carmustin-Implantat, bisher noch das einzige derartige Arzneimittel auf dem Markt.

2.1.3.2 Pharmakologische Strategien

2.1.3.2.1 Erhöhung der Lipophilie

Das Ausmaß der Diffusion eines Stoffes durch zelluläre Membranen (transzellulärer Transport) hängt von seiner Größe und Lipophilie ab. Eine Erhöhung der Gehirngängigkeit kann daher über eine Erhöhung der Lipophilie des Arzneistoffes, z. B. durch Einfügen von lipophilen Gruppen und Bildung von Prodrugs, erreicht werden (Habgood et al., 2000). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Methylierung des Morphins zum Heroin, was zu einer 25fach erhöhten Aufnahme ins Gehirn führt (Oldendorf, 1974). Diese Strategie ist jedoch nur bei relativ kleinen Molekülen umsetzbar und führt zudem zu einem verstärkten Transport durch alle lipophilen Barrieren im Organismus, was wiederum zusätzliche/verstärkte Nebenwirkungen mit sich bringt (Pardridge, 1996). Außerdem besitzt dieses Verfahren eine umstrittene Effizienz, denn die Arzneistoffe können dann zwar in die Membran der Endothelzellen eindringen, sind dann aber oft Substrate einer Effluxpumpe und werden so wieder ins Gefäßlumen zurücktransportiert (Pardridge, 1996).

2.1.3.2.2 Hemmung von Effluxmechanismen

Insbesondere die Effluxpumpe P-gp transportiert sehr viele effektive Arzneistoffe aus den Zellen heraus. Eine ausgeprägte Expression von P-gp findet man nicht nur bei zerebralen Kapillarendothelzellen, sondern z. B. auch bei vielen Tumorzellen (Kartner et al., 1985) und im Dünndarm (Thiebaut et al., 1987). Das versucht man mittels P-gp-Inhibitoren, z. B. mit dem Calciumkanalblocker Verapamil, zu verhindern (Mutschler, 2001). An einem *In-vitro*-Modell der BHS (Fenart et al., 1998) und auch in *In-vivo*-Studien (Drion et al., 1996) wurde gezeigt, dass Verapamil die Passage von zytostatisch wirksamen Vinca-Alkaloiden erhöht. P-gp-Inhibitoren werden deshalb als sogenannte „Codrugs“ vor dem eigentlichen Wirkstoff appliziert, um dessen Membranpassage zu erhöhen (Shrivastava et al., 1998).

2.1.3.2.3 Chemical Delivery Systems

Sogenannte „Chemical Delivery Systems“ (CDS) sind pharmakologisch inerte Moleküle, aus denen im Zielgewebe von gewebespezifischen Enzymen, über einen mehrstufigen metabolischen Prozess, der Arzneistoff gebildet wird (Borchard, 1998). Der Vorteil dieser Strategie ist die höhere Spezifität hinsichtlich der Akkumulation im Zielgewebe, was die Reduktion möglicher Nebenwirkungen zur Folge hat (Brewster

et al., 1995). Bekanntes Beispiel hierfür ist der Nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor Zidovudin (AZT, Retrovir®), welcher erst durch eine dreifache intrazelluläre Phosphorylierung aktiviert wird (Brewster et al., 1995).

Andere Arzneistoffe wurden kovalent an ein lipophiles Dihydropyridin gebunden, was eine erleichterte passive Diffusion durch lipophile Membranen zur Folge hatte. In der Zelle wird dieses CDS dann enzymatisch zu einem ionischen Pyridinium-Salz oxidiert und somit eine Rückdiffusion aus der Zelle verhindert. Durch Hydrolyse wird dann der Arzneistoff vom Trägermolekül freigegeben (Prokai et al., 2000).

2.1.3.3 Physiologische Strategien

Physiologische Strategien für einen Arzneistofftransport ins Gehirn basieren auf dem Kenntnis spezieller Transportprozesse an der BHS (vgl. Kapitel 2.1.2).

Da jedoch ein hohes Maß an struktureller Übereinstimmung mit dem physiologischen Substrat vorhanden sein muss, ist die Anwendung dieser Strategie auf den Arzneistoff selbst nur eingeschränkt möglich. Einziges Beispiel hierfür ist die bereits erwähnte Aminosäure L-Dopa, welche als Prodrug mit Hilfe des LAT1-Transporters ins Gehirn gelangt und dort mittels Decarboxylasen in das wirksame Dopamin überführt wird (Mutschler, 2001).

Vielversprechender ist die Kopplung des Arzneistoffes an einen Antikörper oder Liganden, der eine Aufnahme in das Gehirn vermitteln kann. Solch ein Transportvektor wäre für eine Vielzahl von Arzneistoffen einsetzbar (Pardridge, 1996). Ein solches Konjugat kann entweder durch adsorptive- oder durch rezeptorvermittelte Endozytose in die zerebralen Kapillarendothelzellen aufgenommen werden (vgl. Kapitel 2.1.2).

2.1.3.3.1 Adsorptive Endozytose

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, können kationische Proteine an negativ geladene Zellmembranen binden und mittels Endozytose in die Kapillarendothelzellen aufgenommen werden (Pardridge, 2002). Zum ersten Mal wurde das mit kationisiertem Albumin als Transportvektor ausgenutzt (Kumagai et al., 1987, Pardridge et al., 1990). Weitere Transportvektoren aus der Klasse der kationischen, „zellpenetrierenden Peptide“ sind das Arginin-reiche Tat-Peptid (Schwarze et al., 1999) und das von Protegrin abgeleitete Syn B1-Peptid (Rousselle et al., 2000, Drin et al., 2002). So konnte eine sechsfach erhöhte Aufnahme von Doxorubicin ins Gehirn gezeigt werden, wenn es an Syn B1 gekoppelt war (Rousselle et al., 2001).

Problematisch ist dabei jedoch die erhöhte Immunogenität solcher kationischer Peptide infolge der Veränderung der Proteinstruktur (Muckerheide et al., 1987). Darüber hinaus haben diese Vektoren das generelle Problem der fehlenden Zellelektivität, da außer der BHS auch andere Endothelien durch eine ähnliche Endozytoseaktivität gekennzeichnet sind.

2.1.3.3.2 Rezeptorvermittelte Endozytose

Wesentlich spezifischer ist deshalb die Ausnutzung der rezeptorvermittelten Endozytose. Basierend auf der Kenntnis der spezifischen Transportwege an der BHS (vgl. Kapitel 2.1.2) wurden Konjugate aus potentiellen Arzneistoffen mit Peptiden bzw. Proteinen als Liganden der Rezeptoren an der BHS konzipiert. Für diese von Pardridge bezeichnete „chimeric-peptides“-Strategie (Pardridge, 1996) wurden bisher experimentell folgende Vektoren eingesetzt: 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 (Friden et al., 1991). Darüber hinaus gibt es Bestrebungen, den LDL-Rezeptor für einen Arzneistofftransport ins Gehirn auszunutzen (Lucarelli et al., 1997). In Frage kommende Vektoren für diesen Ansatz sind das native ApoE (Lück, 1997, Harnisch, 1998) und Peptide, die aus der LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne von ApoE abgeleitet sind (Sauer et al., 2004).

Ein großer Nachteil dieses „molekularen Ansatzes“, der Bindung von Arzneistoffen an spezifische Liganden oder Antikörper, ist das ungünstige Verhältnis von Vektor zu Arzneistoff, denn pro Vektor können nur bis zu ca. 10 Arzneistoffmoleküle gekoppelt werden (Bickel et al., 1993). Das bedeutet nicht nur hohe Herstellungskosten (v. a. wenn der Vektor ein monoklonaler Antikörper ist), sondern auch, dass beim Übertritt eines Konjugats über die BHS nur geringe Mengen Arzneistoff ins Gehirn gelangen.

Da es jedoch in den meisten Fällen nötig ist, mikromolare Arzneistoffkonzentrationen im Gehirn zu erreichen, wäre die Kombination von Transportvektoren mit partikulären Arzneistoffträgern optimal, da diese eine viel höhere Transportkapazität aufweisen. Der „partikuläre Ansatz“ hätte zusätzlich den Vorteil, dass über die Wahl der Trägermatrix und der Herstellungsbedingungen der Partikel viele in ihren physikochemischen Eigenschaften und ihrem Molekulargewicht unterschiedliche Wirkstoffe transportiert werden können (Borchard, 1998).

Damit die partikulären Arzneistoffträger die BHS überwinden, müsste also ihre Oberfläche, wie oben beschrieben, funktionalisiert werden oder - im Falle einer i. v.

Injektion der Partikel - das Konzept der „Differenzierenden Adsorption“ umgesetzt werden. Dieses Konzept soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

2.2 Das Konzept der „Differenzierenden Adsorption“

Für einen zielgerichteten Arzneistofftransport bietet sich in erster Linie die i. v. Injektion an (Kreuter, 1983, Speiser, 1998). Seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden deshalb Versuche unternommen, um die unterschiedliche Organverteilung von i. v. injizierten partikulären Arzneistoffträgern mit ihren physikochemischen Eigenschaften, wie z. B. der Partikelladung (Wilkins und Meyers, 1966) oder -größe (Davis, 1981), zu korrelieren. Der komplexe Vorgang der Organverteilung wird jedoch nicht allein durch die physikochemischen Eigenschaften der Arzneistoffcarrier bestimmt. So konnten für Partikel mit sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften völlig verschiedene *In-vivo*-Verhalten gezeigt werden (Illum und Davis, 1987, Illum et al., 1987, Müller, 1991, Moghimi, 1999).

Werden partikuläre Arzneistoffträger i. v. appliziert, so treten sie sofort mit den Plasmaproteinen in der Blutbahn in Interaktion, wobei Art und Menge der adsorbierten Proteine wiederum von den physikochemischen Eigenschaften der Partikel abhängig sind (Blunk et al., 1993). In der Folge wird dann die Halbwertszeit der Partikel bzw. deren Organverteilung durch die adsorbierten Plasmaproteine entscheidend bestimmt (Juliano, 1988, Müller und Heinemann, 1989, Blunk et al., 1993, Davis et al., 1993, Moghimi, 1999, Price et al., 2001). Dabei ist nicht die von Chonn et al. (1992) angegebene Gesamtmenge an gebundenen Proteinen entscheidend, sondern vielmehr die Zusammensetzung des Adsorptionsmuster auf den Partikeln. So wird z. B. die Phagozytose i. v. applizierter Arzneistoffträger durch den Prozess der Opsonisierung gefördert, d. h. durch die Adsorption von Proteinen aus dem Blut, die die Phagozytose durch Zellen des mononukleären phagozytären Systems (MPS) verstärken (Absolom, 1986, Juliano, 1988, Leroux et al., 1995, Thiele et al., 2003). Zu diesen sogenannten Opsoninen gehören insbesondere Immunglobulin G (IgG) (Hsu und Juliano, 1982, Camner et al., 2002) und die Komponenten des Komplementsystems (Komplementkaskade, vor allem C4 γ (Kazatchkine und Carreno, 1988, van Raamsdonk et al., 2002)), denn für sie existieren spezifische Rezeptoren auf den MPS-Zellen (Salminen et al., 2001). Weitere Rezeptoren wurden beispielsweise für Fibronectin (Pommier et al., 1984), Fibrinogen (Altieri et al., 1986), Transferrin (Vogel et al., 1987) und α 2-Macroglobulin (Van Leuven et al., 1986)

beschrieben. Wenn dagegen keine Opsonine auf der Partikeloberfläche adsorbieren bzw. Proteine adsorbieren, durch die ein gewisser Schutz vor der Phagozytose der Partikel entsteht (sogenannte Dysopsonine), bleiben diese Arzneistoffträger vom Immunsystem unerkant und können in der Blutbahn zirkulieren (Absolom, 1986, Moghimi et al., 1993). Zu diesen Dysopsoninen gehören z. B. Albumin (Gessner, 2001, Ogawara et al., 2004) und Immunglobulin A (IgA) (Patel, 1992), die durch ihre Adsorption eine Abnahme der Oberflächenhydrophobie der Partikel bewirken (Stolnik et al., 1995).

Wenn darüber hinaus Plasmaproteine auf der Oberfläche der Arzneistoffträger angereichert werden, die eine Aufnahme der Partikel durch bestimmte Zellen vermitteln, kann mit diesen Partikeln ein zielgerichteter Arzneistofftransport erreicht werden. So konnte z. B. mit Hilfe der zwei-dimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-D PAGE) gezeigt werden, dass auf Polysorbat 80-beschichteten Polybutylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikeln, die die BHS passieren können, eine bevorzugte Adsorption von ApoE stattfindet (Lück, 1997, Kreuter, 2001). Der Arzneistofftransport ins Gehirn mit diesen Partikeln wurde in einer Reihe erfolgreicher *In-vivo*-Studien mit verschiedenen Arzneistoffen, wie z. B. Dalargin (Kreuter et al., 1995), Loperamid (Alyautdin et al., 1997), Tubocurarin (Alyautdin et al., 1998b) und Doxorubicin (Gulyaev et al., 1999) gezeigt. Weiterführende Arbeiten der Arbeitsgruppen von Kreuter und Müller zeigten eine eindeutige Korrelation zwischen einer ApoE-Adsorption und der BHS-Passage. Nach der Präadsorption von ApoE auf der Oberfläche der negativen Kontrolle der *In-vivo*-Studien von Kreuter et al. (1995) (unbeschichtete, Dalargin-beladene PBCA-Nanopartikel) waren diese Partikel in der Lage, die BHS zu passieren (Alyautdin et al., 1995, Lück, 1997). Die Präadsorption anderer Apolipoproteine führte zu keinem Effekt *in vivo* (Kreuter et al., 2002).

Zusammengefasst, nicht die Gesamtmenge an adsorbierten Plasmaproteinen spielt die Schlüsselrolle für das *In-vivo*-Verhalten von i. v. injizierten Arzneistoffträgern, sondern vielmehr ist die genaue Differenzierung der Zusammensetzung der adsorbierten Proteine entscheidend. Darauf basiert das Konzept der „Differenzierenden Adsorption“ für die gewebspezifische Arzneistoffapplikation (Abb. 2.2-1). Es wurde von Müller und Heinemann (1989) aufgestellt und ist mittlerweile durch die beschriebenen Erkenntnisse allgemein anerkannt (Yamazaki et al., 1999, Brash, 2000, Carignano und Szleifer, 2000, Price et al., 2001, Zhang et al., 2001, Jahangir et al., 2003, Thiele et al., 2003).

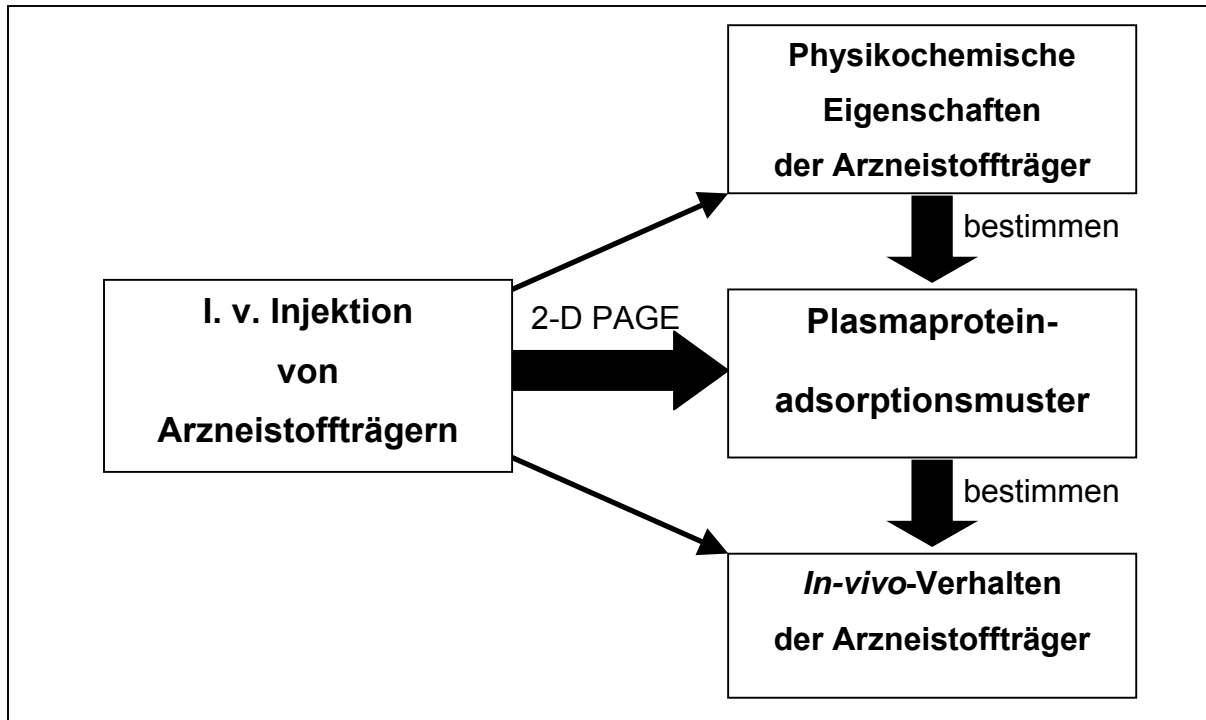


Abb. 2.2-1: Konzept der „Differenzierenden Adsorption“: Auf i. v. injizierten Arzneistoffträgern adsorbieren, abhängig von ihren physikochemischen Oberflächeneigenschaften, bestimmte Plasmaproteine, die ihrerseits das *In-vivo*-Verhalten der Partikel bestimmen. Das Proteinadsorptionsmuster wird mit Hilfe der 2-D PAGE analysiert.

Das Konzept sieht die gezielte Oberflächenmodifikation von partikulären Arzneistoffträgern vor, um durch präferentielle Adsorption der gewünschten Plasmaproteine die angestrebte Aufnahme in das Zielorgan zu erreichen.

Für die praktische Umsetzung spielt die Analytik der Plasmaproteine auf partikulären Arzneistoffträgern eine entscheidende Rolle. Die Bestimmung von auf Oberflächen adsorbierten Proteinen ist mit verschiedenen analytischen Verfahren möglich, wie z. B. mit Immunoassays (Bergström et al., 1992, Cornelius et al., 2003), SDS-PAGE (Norman et al., 1993, Archambault und Brash, 2004), Field Flow Fractionation (FFF) (Bergström et al., 1992, Li und Caldwell, 1996), Ellipsometrie (Kurrat et al., 1998) oder Massenspektroskopie (Oleschuk et al., 2000). Jedoch nur mittels der 2-D PAGE ist eine gleichzeitige Analytik aller adsorbierten Proteine, d. h. der Zusammensetzung des Adsorptionsmusters und der Anteile der Proteine zueinander, möglich (Klose und Kobalz, 1995). Diese Methode wurde von Blunk et al. (1993) zur Bestimmung der Plasmaproteinadsorptionsmuster auf partikulären Trägern etabliert und wurde in der vorliegenden Arbeit auf SLN übertragen und zu deren Analytik verwendet (vgl. Kapitel 4.2.1).

2.3 Kolloidale Arzneistoffträger

Als partikuläre Arzneistoffträger für eine zielgerichtete Arzneistoffapplikation werden insbesondere Nanopartikel, d. h. Partikel im kolloidalen Größenbereich zwischen ca. 10 nm bis 300 nm (maximal 1µm), eingesetzt (Kreuter, 1994, Speiser, 1998). Sie haben die erwähnten Vorteile der hohen Transportkapazität und der hohen Flexibilität, durch die Auswahl der verwendeten Trägermatrix. Aufgrund ihrer Größe und der Adsorption von Opsoninen auf ihrer Oberfläche werden sie jedoch nach i. v. Injektion sehr schnell als körperfremd erkannt und durch die Makrophagen des MPS aus der Blutbahn eliminiert. Einen Großteil der Entfernung übernehmen dabei die Kupffer-Zellen der Leber (ca. 90%) und die Milzmakrophagen (ca. 5%) (O'Mullane et al., 1987). Deshalb ist es für die Entwicklung von kolloidalen Carriern, die den Arzneistoff in andere Organe transportieren sollen („aktives Targeting“) wichtig, diese Interaktion mit dem MPS zu verhindern oder zumindest zu minimieren.

Weiterhin ist es wichtig, dass die verwendeten Trägermaterialien *in vivo* sehr gut verträglich und abbaubar sind, da die Bedenken der pharmazeutischen Hersteller und Zulassungsbehörden diesbezüglich ein Hauptgrund für den fehlenden kommerziellen Durchbruch von kolloidalen Arzneistoffträgern sind. Für den pharmazeutischen Hersteller ist darüber hinaus die Existenz eines großtechnischen, möglichst einfachen Herstellungsverfahrens von entscheidender Bedeutung, ob einem Arzneistoffcarrier ein gewisses Marktpotential zugeordnet wird.

2.3.1 Polymernanopartikel

Polymernanopartikel sind kolloidale Feststoffsysteme bestehend aus Wirkstoff und synthetischen oder natürlichen Polymeren (Speiser, 1991). Die feste Matrix ermöglicht nicht nur längere Freisetzungzeiten als schnell metabolisierte Carrier wie z. B. Emulsionen, sondern auch eine Variation des Freisetzungsprofils von Wirkstoffen. Außerdem sind die Wirkstoffe durch Inkorporation in die feste Matrix gegen chemische Zersetzung wie z. B. Hydrolyse geschützt (Speiser, 1998). Doch obwohl diese Systeme seit Mitte der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts in der Entwicklung sind, spielen sie bisher auf dem pharmazeutischen Markt fast keine Rolle. Die Gründe dafür sind vor allem schlechte *In-vivo*-Verträglichkeit z. B. durch Lösungsmittelrestbestände aus der Herstellung (z. B. bei der Solvent Evaporation (Tice und Gilley, 1985)) oder durch Zytotoxizität der Polymere. So sind Polymere wie Polylactide (PLA) und Poly(lactid)glycolide (PLGA) als Implantate zwar relativ gut

verträglich, zeigen jedoch nach Aufnahme in die Zellen in Form von Nanopartikeln einen zytotoxischen Effekt (Smith und Hunneyball, 1986). Und die bereits erwähnten Polyalkylcyanoacrylat-Polymere setzen bei ihrem Abbau *in vivo* geringe Mengen Formaldehyd frei (Kreuter et al., 1984, Lenaerts et al., 1984), das unter Verdacht steht, kanzerogen zu sein.

2.3.2 Emulsionen

Emulsionen sind disperse Systeme, die aus zwei oder mehr nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten bestehen (Benita und Levy, 1993). Sie sind im Gegensatz zu den meisten Nanopartikeln toxikologisch unproblematisch und können durch Hochdruckhomogenisation problemlos im Großmaßstab hergestellt und anschließend sterilisiert werden, weshalb Öl-in-Wasser-Emulsionen (O/W-Emulsionen, Fettemulsionen) seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts zur parenteralen Ernährung eingesetzt werden (z. B. Intralipid[®], Lipofundin[®] oder Abbolipid[®]) (Hallberg et al., 1967, Wretling, 1981). Außerdem werden Fettemulsionen in der Anästhesie eingesetzt (Stroschneider et al., 1998), denn die meisten Anästhetika haben lipophilen Stoffcharakter, der die notwendige Voraussetzung für die Passage der BHS ist. Aufgrund dieser Eigenschaft können sie gut in die Ölphase der Fettemulsionen eingebracht werden (z. B. Etomidat-Lipuro[®] oder Disoprivan[®]) (Doenicke et al., 1999). Allgemein können O/W-Emulsionen als Vehikel für schlecht wasserlösliche aber gut öllösliche Arzneistoffe ausgenutzt und so eine i. v. Therapie ermöglicht werden (Klang et al., 1998). Dadurch können häufig auftretende Unverträglichkeiten wie z. B. Irritationen an der Einstichstelle reduziert werden, da die schädigende Substanz „eingekapselt“ vorliegt. Vor kurzem wurde ein neuer Weg entwickelt, der das Einarbeiten von Arzneistoffen, die sowohl in wässrigen als auch in öligen Medien schwer löslich sind (z. B. Amphotericin B), in die Emulgatorschicht von Emulsionen ermöglicht (SolEmuls[®] Technologie) (Müller et al., 2004).

Die kontrollierte Freisetzung eines Arzneistoffs kann mit Emulsionen allerdings nur schwer erreicht werden, da die inkorporierten Wirkstoffe bei i. v. Injektion spontan freigesetzt werden (Benita und Levy, 1993). Dieser sogenannte „burst release“ liegt bei diesen Systemen in der Größenordnung von Millisekunden.

2.3.3 Feste Lipidnanopartikel (SLN)

Feste Lipidnanopartikel (SLN) wurden 1991 als Alternative zu bestehenden kolloidalen Carriersystemen wie Polymernanopartikel oder Emulsionen eingeführt

(Müller et al., 1995, Müller und Lucks, 1996, Müller et al., 2000). Vereinfacht gesagt, wurde bei den SLN das flüssige Lipid der Emulsionen gegen ein festes Lipid ausgetauscht. So kombinieren sie die Vorteile beider Systeme: Sie bestehen wie O/W-Emulsionen aus physiologisch gut verträglichen Materialien (Müller et al., 1997a), besitzen eine sehr gute *In-vivo*-Verträglichkeit (Weyhers et al., 1995) und können wie diese großtechnisch über Hochdruckhomogenisation hergestellt (vgl. Kapitel 4.3.1) und anschließend sterilisiert werden (Müller und Lucks, 1996, Mehnert et al., 1997). Durch ihre feste Matrix erlauben sie aber auch eine Modulation des Freisetzungsprofils (Mehnert et al., 1997, zur Mühlen et al., 1998) und können wie Nanopartikel die inkorporierten Wirkstoffe gegen Zersetzung schützen (Zimmermann, 2001). Die Wirkstoffe sind dabei in der Lipidmatrix gelöst (feste Lösung) oder dispergiert.

Die Partikelgröße bewegt sich im kolloidalen Bereich von ca. 50 nm bis 1 µm. Die durch Hochdruckhomogenisation erhaltenen SLN sind zudem in ihrer Größe sehr homogen und der Gehalt an Mikropartikeln ist sehr gering, was eine problemlose parenterale Applikation ermöglicht (Wissing et al., 2004). Deshalb sind SLN ein sehr interessantes Carriersystem für die Umsetzung des beschriebenen Konzepts der „Differenzierenden Adsorption“ für i. v. applizierbare Arzneistoffträger. In der Literatur sind bereits erste Studien zur Anreicherung im Gehirn von Camptothecin (Yang et al., 1999), Doxorubicin (Fundaro et al., 2000, Zara et al., 2002) und einem 5-Fluorouracil-Derivat (DO-FudR) (Wang et al., 2002) mit SLN beschrieben, was das grundsätzliche Potential von SLN als Arzneistoffcarrier zur Überwindung der BHS zeigt. Aus diesen Gründen sollte die bereits für Polymernanopartikel (Blunk et al., 1993) und Emulsionen (Harnisch und Müller, 1998) etablierte 2-D PAGE-Analytik auf SLN übertragen werden.

2.3.4 Nanopartikel aus Gelatine

Gelatine wird schon seit mehreren Jahrzehnten in modifizierter Form als Plasmaexpander eingesetzt (z. B. Oxypolygelatine in Gelifundol® Infusionslösung). Aufgrund seiner geringen Immunogenität (Schwick und Heide, 1969), guten Verträglichkeit, und Biodegradierbarkeit ist Gelatine auch ein Biopolymer mit sehr guten Voraussetzungen, um als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Nanopartikeln verwendet zu werden. Dies wurde zwar schon zu Beginn der Erforschung von Nanopartikeln erkannt, jedoch waren die mittels Emulsions- bzw. Aussalztechniken

erzielten Ergebnisse nicht besonders befriedigend, da sie zu breiten Größenverteilungen (wenige hundert Nanometer bis einige Mikrometer) bzw. zu instabilen Dispersionen führten (Marty et al., 1978). Erst im Jahr 2000 wurde mit der sogenannten Zwei-Stufen-Desolvatation eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, stabile und gleichzeitig definierte Gelatine-Nanopartikel (Gelatine-NP) in der Größe von 250-300 nm herzustellen (Coester et al., 2000b).

Ein großer Vorteil von Gelatine-NP ist das Vorhandensein funktioneller Gruppen, welche eine Vielzahl von Oberflächenmodifikationen ermöglicht (Truong-Le et al., 1998, Coester et al., 2000a, Weber et al., 2000). So können z. B. durch kovalente Kopplung des quartären Amins Cholin positiv geladene Gelatine-NP hergestellt werden (Coester, 2003a), die ähnlich wie positiv geladene Liposomen (Chesnoy und Huang, 2000) oder positiv geladene SLN (Olbrich et al., 2001, Tabatt et al., 2004) als nichtvirale Gentransfervehikel verwendet werden könnten.

2.4 Struktur und Eigenschaften der Apolipoproteine

2.4.1 Allgemeines

Die Apolipoproteine nehmen eine zentrale Rolle in dieser Arbeit ein. Es ist eine heterogene Gruppe von Blutproteinen, die in zehn Klassen (A bis J) eingeteilt wird. Die wichtigsten sind Apolipoproteine der Klassen A-, C- und E, die aus jeweils mehreren amphipathischen α -Helices unterschiedlicher Länge und Aminosäuresequenz bestehen. Die Helices sind durch kurze, Prolin enthaltende Abschnitte verbunden, über die eine Rotation erfolgen kann (Rousselle et al., 2000). Aufgrund dieser besonderen Sekundärstruktur besitzen sie eine sehr flexible Struktur („weiche Proteine“) (Graham und Phillips, 1979). In wässriger Lösung sind die α -Helices als Bündel angeordnet, in dem die hydrophoben (apolaren) Seitenketten nach innen gerichtet sind (Aggerbeck et al., 1988). Bei Adsorption tritt die apolare Seite mit dem hydrophoben Substrat in Interaktion, während die polare Seite der Wasserphase zugewandt ist (vgl. Abb. 2.4-1). Der an ein Lipid gebundene Zustand ist für Apolipoproteine thermodynamisch am günstigsten (Rosseneu, 1992), was ihre hohe Affinität zu hydrophoben Oberflächen erklärt (Horbett und Brash, 1987). Trotzdem sind alle Apolipoproteine im Blut nur schwach mit der Oberfläche von Lipoprotein-Partikeln assoziiert, da ein schneller Transfer zwischen den verschiedenen Lipoprotein-Partikeln für deren physiologische Funktion unerlässlich ist (Rosseneu, 1992). Aus diesem Grund ist eine Übertragung der Apolipoproteine auf kolloidale

Arzneistoffträger bei Kontakt mit Plasma sehr wahrscheinlich, vor allem wenn es sich ebenfalls um eine hydrophobe Oberfläche handelt (Cornelius et al., 2002a).

2.4.2 Struktur, Eigenschaften und Bedeutung von ApoE

Das sowohl strukturell als auch funktionell am besten charakterisierte Apolipoprotein ist ApoE, dessen Bedeutung weit über seine zahlreichen Funktionen im Lipidstoffwechsel hinaus geht. Es ist ein 34,2 kDa großes, helikales Protein, das aus 299 Aminosäuren (AS) und aus zwei unabhängigen und unterschiedlich gefalteten, helikalen Domänen besteht (Rall et al., 1982): einer globulären N-terminalen Domäne (AS 1-191), die die LDL-Rezeptor-Bindungsregion enthält, und einem C-Terminus, der für die Lipidbindung verantwortlich ist (Wetterau et al., 1988) (Abb. 2.4-1).

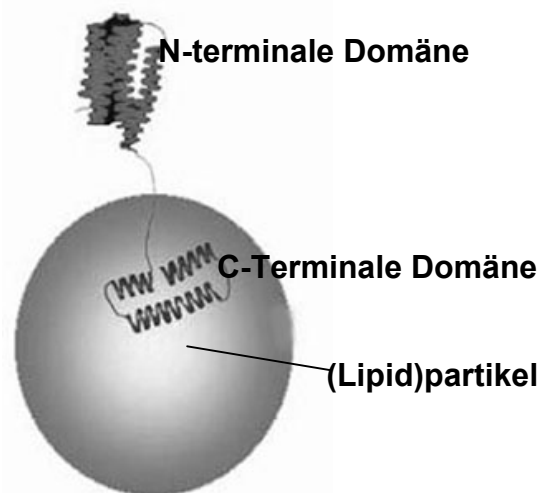


Abb. 2.4-1: Schematische Darstellung der Adsorption der amphipathischen Helices des C-Terminus von ApoE auf einer Partikeloberfläche.

In hydrophiler Umgebung und in Abwesenheit einer lipophilen Oberfläche bildet ApoE Tetramere, die durch Selbstassoziation des C-Terminus entstehen (Aggerbeck et al., 1988). Die LDL-Rezeptor-Bindungsregion wurde in Helix 4 zwischen den AS 140 bis 160 lokalisiert (Innerarity et al., 1983, Weisgraber et al., 1983) (Abb. 2.4-2). Dieser Sequenzbereich ist durch eine massive Ansammlung von basischen Aminosäuren (v. a. Arginin) gekennzeichnet (deshalb die alte Bezeichnung „Argininreiches Apoprotein“), die für die elektrostatischen Interaktionen mit der anionischen Bindungsdomäne des LDL-Rezeptors verantwortlich sind (Brown und Goldstein, 1986).

Der LDL-Rezeptor (Apo B, E-Rezeptor*) kommt ubiquitär vor und reguliert den Plasmacholesterolspiegel, indem er die endozytotische Aufnahme Cholesterolreicher Lipoproteine über Clathrin-coated Pits (vgl. Kapitel 2.1.2) und deren Metabolismus vermittelt (Brown und Goldstein, 1986).

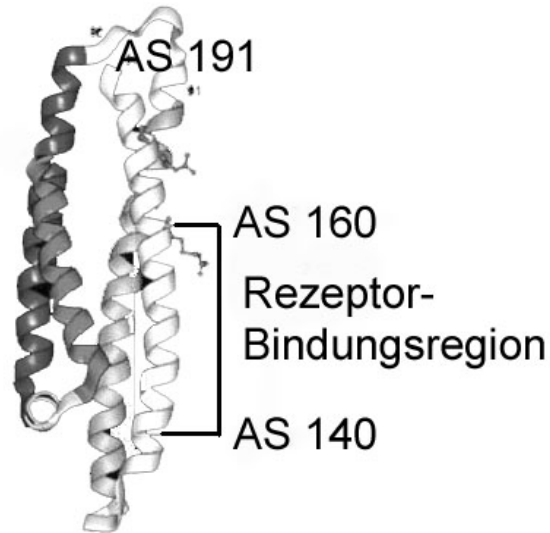


Abb. 2.4-2: N-terminale Domäne von ApoE mit LDL-Rezeptor-Bindungsregion (aus: <http://www-structur.llnl.gov/ApoE/apoe.html>).

Je mehr ApoE-Moleküle auf einem Lipoprotein-Partikel vorhanden sind, desto höher ist dessen Affinität zum Rezeptor (Weisgraber, 1994). Außerdem wurde schon früh gezeigt, dass ApoE nur im Lipid-assoziierten Zustand die richtige Konformation für die Rezeptorbindung hat (Innerarity et al., 1979), wobei die Konformation und damit die Rezeptoraffinität von der Lipidzusammensetzung der Lipoproteine moduliert wird (Weisgraber, 1994).

Das Gehirn verfügt über ein autarkes System für die Synthese und den Transport von Lipiden und Cholesterol (Pitas et al., 1987), d. h. das Gehirn ist in der Lage, die Lipid-Homöostase eigenständig aufrechtzuerhalten. Das Gehirn besitzt aber auch die Möglichkeit, essentielle Lipide aus dem Plasma aufzunehmen. Dabei spielt vor allem

*Anm.: Die Bezeichnung „LDL-Rezeptor“ ist etwas ungenau, da LDL-Partikel nur ApoB-100 enthalten. Die Affinität von Chylomikron- bzw. VLDL (Very Low Density Lipoproteins)-Remnants zum „LDL-Rezeptor“ ist aber etwa zwanzig Mal größer, da diese Lipoprotein-Partikel ApoE enthalten. Das erklärt auch die vergleichsweise lange Verweilzeit der LDL-Partikel im Blut und das im Vergleich zu den anderen Lipoproteinen höchste atherogene Potential des cholesterinreichen LDL. Genauer wäre deshalb die Bezeichnung ApoB, E-Rezeptor.

der LDL-Rezeptor eine wichtige Rolle (Meresse et al., 1989), dessen Expression auf den zerebralen Kapillarendothelzellen im Vergleich zu anderen Gefäßen interessanterweise stärker ist (Dehouck et al., 1994). Es wurde gezeigt, dass LDL-Partikel über eine rezeptorvermittelte Transzytose, unter Umgehung einer lysosomalen Degradation, in das Gehirn gelangen können (Dehouck et al., 1997). Wie bereits in Kapitel 2.2 dargestellt, wurde auch gezeigt, dass ApoE bei dem Transport von Nanopartikel-gebundenen Arzneistoffen über die BHS eine entscheidende Rolle spielt. Wie bei den Lipoproteinen kommt es zu einem LDL-Rezeptor-abhängigen Aufnahmemechanismus in die Endothelzellen (Kreuter, 2001, Kreuter et al., 2002). Ob es dann anschließend ebenfalls zu einer Transzytose der beladenen Partikel ins Gehirn kommt, oder ob der Arzneistoff in den Zellen freigesetzt wird und dann durch die abluminale Membran ins Gehirn diffundiert, ist noch nicht abschließend geklärt.

Darüber hinaus bindet ApoE auch an das LDL-Rezeptor-assoziierte Protein (LRP) und an andere Lipoprotein-Rezeptoren, wie z. B. den VLDL-Rezeptor (Mahley, 1988). ApoE besitzt auch eine hochaffine Heparin-Bindungsstelle in den AS 142-147 (Cardin et al., 1986), d. h. sie koinzidiert mit der LDL-Rezeptor-Bindungsstelle. Eine *in vivo* vorhandene Heparin-artige Struktur, mit der ApoE-haltige Lipoproteine (wie z. B. Chylomikron-Remnants) in Wechselwirkung treten, ist das polyanionische Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG), das bei Säugetieren auf allen Zellmembranen vorkommt. Aus diesem Grund können ApoE-haltige Lipoproteine neben dem LDL-Rezeptor auch über das HSPG internalisiert werden (Ji et al., 1994).

Auf die Eigenschaften und Bedeutungen anderer wichtiger Apolipoproteine (wie z. B. ApoC-II, ApoC-III, ApoA-I und ApoA-IV) wird in Kapitel 5 „Ergebnisse und Diskussion“ genauer eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorhandensein des LDL-Rezeptors am zerebralen Kapillarendothel in hochreguliertem Expressionsstatus und ApoE als hochaffiner Ligand dessen, ein vielversprechendes Konzept ergeben, das für eine Verbesserung des Arzneistofftransportes über die BHS mittels kolloidaler Arzneistoffträger genutzt werden könnte. Vorzugsweise wären die Arzneistoffträger dann den Lipoproteinen ähnliche und physiologisch gut verträgliche Lipidpartikel, wie es z. B. die SLN sind, da dies die Basis für eine Anreicherung von ApoE (in der richtigen Konformation) darstellt.