

Wirkstoff-Transport

DOI: 10.1002/ange.200500519

Membranmimetische Nanotransporter auf Grundlage eines dipalmitoylierten zellpenetrierenden Peptids**

Sandro Keller,* Ines Sauer, Holger Strauss, Klaus Gast, Margitta Dathe und Michael Bienert

Molekulare und supramolekulare Freisetzungssysteme für Arzneimittel haben als pharmazeutische Formulierungen für ansonsten schlecht lösliche, schnell abbaubare oder sogar toxische Wirkstoffe große Aufmerksamkeit erlangt.^[1] Von der Vielzahl bisher entwickelter kolloidaler Träger gehören Micellen zu den nützlichsten Transportern für hydrophobe Verbindungen.^[2] Micellare Träger sind jedoch auch mit einigen schwerwiegenden Nachteilen behaftet: So werden einige normalerweise membrangebundene Biomoleküle wie Vektorpeptide bei Entfernung von der Lipiddoppelschicht durch Verlust ihrer nativen Konformation in ihrer Aktivität

stark beeinträchtigt.^[3,4] Hier berichten wir über ein dipalmitoyliertes zellpenetrierendes Peptid, das aufgrund seiner Fähigkeit zur Einlagerung großer Mengen an Lipid unter Bildung gemischter Micellen früher beschriebenen Kolloiden mit biologischer Funktion überlegen ist und deshalb als membranmimetischer Nanotransporter ein neues System zur intrazellulären Freisetzung hydrophober Arzneimittel sein könnte.

Idealerweise sollten solche Träger eine Reihe von Kriterien erfüllen: Erstens muss eine anpassbare Peptidsequenz, die bei Wechselwirkung mit einem biologischen Zielmolekül einen spezifischen Effekt auslöst, auf der Micellenoberfläche exponiert werden.^[5] Zweitens sollten die Nanotransporter einen Überschuss an Lipid enthalten, um mit einer membranähnlichen Umgebung die Funktionalität des oberflächengebundenen Peptids zu erhalten. Drittens ist zu berücksichtigen, dass eine solche Substanz unweigerlich ein starkes Tensid darstellt; der Aggregatzustand muss deshalb leicht kontrollierbar und die Kinetik der Membransolubilisierung sollte langsam sein.

Auf der Suche nach einem Peptidvektor, der die Internalisierung in ein breites Spektrum unterschiedlicher Zelltypen begünstigt, haben wir ein aus 20 Aminosäureresten bestehendes Tandemdimer [A2, (LRKLR KRLLR)₂] ausgewählt, das Bindungsstellen für den Rezeptor des Lipoproteins mit geringer Dichte (LDL) und für die auf Zelloberflächen lokalisierten Heparansulfatproteoglycane enthält, also für zwei weit verbreitete Bestandteile von Säugetiermembranen, die die zelluläre Aufnahme ihrer Liganden vermitteln können.^[6] Kürzlich konnte die durch A2 nach kovalenter Bindung an die Vesikeloberfläche induzierte Internalisierung von Liposomen in primäre Hirnkapillar-Endothelzellen der Ratte nachgewiesen werden.^[7] Zudem ist die Gegenwart von Lipiden eine Voraussetzung für die Rezeptorbindung von Apolipoprotein E,^[8] aus dem A2 abgeleitet wurde. Da sich Fettsäure-modifizierte Peptide als außergewöhnlich starke Tenside bei der Herstellung von Suspensionen von Membranproteinen in gemischten Micellen mit einer membranmimetischen Umgebung erwiesen haben,^[8,9] wählten wir zur Hydrophobierung die Einführung von zwei Palmitoylresten (P2) in benachbarte Positionen einer aus drei Aminosäureresten bestehenden Sequenz, die mit dem N-Terminus von A2 verbunden wurde. Das Lipopeptid P2A2 konnte mit einer einfachen und effizienten Methode in hohen Ausbeuten und in Mengen von einigen Hundert Milligramm hergestellt werden. A2 wurde durch standardmäßige Festphasensynthese unter Verwendung von *N*^ε-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-geschützten Aminosäuren aufgebaut und N-terminal um die Sequenz Fmoc-WK(Dde)G mit einem *N*^ε-1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl(Dde)-geschützten Lysinrest verlängert. Nach Abspaltung der Dde- und der aminoterminalen Fmoc-Gruppe mit Hydrazin wurden die beiden Aminofunktionen in der Lysinseitenkette und am N-Terminus gleichzeitig mit Palmitinsäure acyliert.^[10]

Die daraus erhaltene Chimäre P2A2 (Abbildung 1) mit einer Molmasse von 3.53 kg mol⁻¹ hat durch den aus den beiden Acylketten bestehenden, äußerst hydrophoben Schwanz am geladenen Peptid eine amphipathische Struktur, ist aber dennoch in wässriger Lösung (10 mM 2-Amino-2-

[*] S. Keller, Dr. I. Sauer, H. Strauss, Dr. M. Dathe, Prof. Dr. M. Bienert
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie FMP
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-94793-159
E-mail: mail@sandrokeller.com

Dr. K. Gast
Physikalische Biochemie
Institut für Biochemie und Biologie
Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, Haus 25
14467 Potsdam-Golm (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt von der Europäischen Kommission (Stipendium QLK3-CT-2002-01989 an SK) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Stipendien DA 324/4-1/2 an IS und SFB 498 an HS). Wir danken Prof. Hartmut Oschkinat und Prof. Peter Pohl für hilfreiche Kommentare, Dr. Annette Meister, Dr. Michael Schümann, Dr. Michael Beyermann und Dr. Heiko Heerklotz für ergiebige Diskussionen, Heidemarie Lerch für MS-Messungen, Bernhard Schmikale für die Peptidsynthese sowie Heike Nikolenko, Carolyn Vargas, Seong-Ji Han, Jens H. Laettig und Stephan Pritz für technische Mithilfe.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

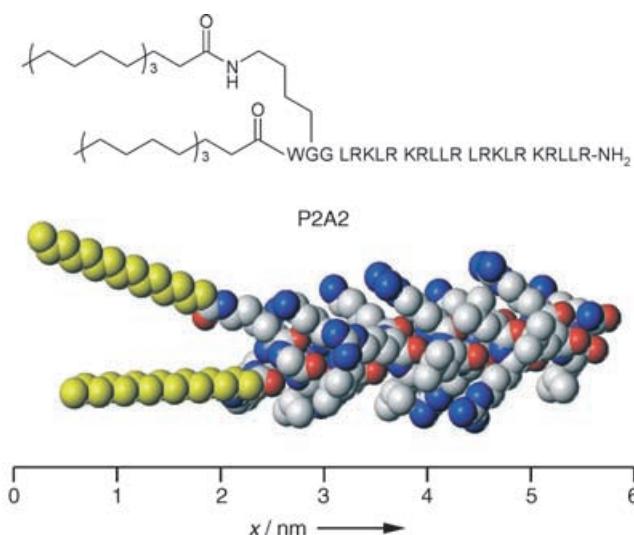


Abbildung 1. Struktur von P2A2. Die zwei Palmitoylketten sind über Amidgruppen mit dem N-terminalen Tryptophan und der Seitenkette des benachbarten Lysins verbunden (Einbuchstaben-Code, formale Ladungszahl $z=12$ bei pH 7.4). Die hydrophoben Methylen- und Methylgruppen der Palmitoylreste sind im Kalottenmodell gelb hervorgehoben.^[11]

(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Tris), 154 mM NaCl, 0.1 mM Ethyldiamintetraacetat (EDTA), pH 7.4) gut löslich (mehr als 5 mM).^[12] Im Unterschied zu doppelkettigen Phospholipiden mit relativ kleinen Kopfgruppen scheint das sperrige Peptid von P2A2 keine Selbstorganisation unter Bildung von Doppelschichten zu ermöglichen; vielmehr scheint eine für Tenside typische Micellbildung stattzufinden.

Analytische Ultrazentrifugation zeigte in der Tat, dass sich P2A2 zu wohldefinierten Aggregaten mit einer Molmasse von 68 kg mol^{-1} zusammenlagert, was 19 Monomeren entspricht (Abbildung 2 a). Statische Lichtstreuung (LS) bestätigte dieses Ergebnis,^[10] während mit dynamischer LS ein

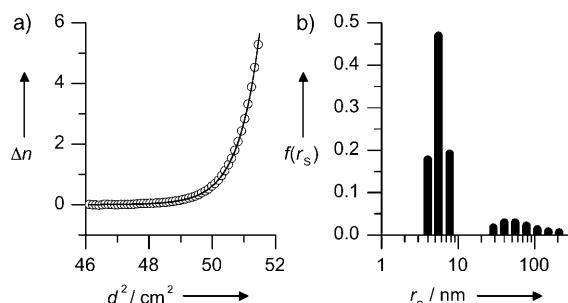


Abbildung 2. Massen- und Größencharakterisierung von P2A2-Micellen. a) Analytische Ultrazentrifugation bei $c_{\text{P2A2}} = 96 \mu\text{M}$ und 20 kU min^{-1} ergab die lokale Brechungsindexdifferenz Δn (offene Kreise) als Funktion des quadrierten Abstands d^2 von der Rotorachse im Sedimentationsgleichgewicht. Die beste Anpassung für eine monodispersen Lösung (durchgezogene Linie) wurde für eine Molmasse von $(67.7 \pm 0.3) \text{ kg mol}^{-1}$ erhalten. b) Dynamische Lichtstreuung bei $c_{\text{P2A2}} = 244 \mu\text{M}$ lieferte die Verteilungsfunktion $f(r_s)$ des Stokes-Radius r_s . Aus den bei vier unterschiedlichen Konzentrationen beobachteten stärkeren Peaks bei kleinen Radien wurde $r_s^{\text{exp.}} = (5.25 \pm 0.30) \text{ nm}$ extrapoliert.^[10]

Stokes-Radius von $r_s^{\text{exp.}} = 5.3 \text{ nm}$ ermittelt wurde (Abbildung 2 b), der deutlich größer ist als der für ein kugelförmiges Teilchen dieser Masse berechnete Wert von $r_s^{\text{ber.}} = 3.4 \text{ nm}$.^[10] Diese Diskrepanz und die kleine Aggregationszahl sind höchstwahrscheinlich auf eine nichtsphärische Struktur der Micellen zurückzuführen, wie sie auch für andere Lipopeptide diskutiert worden ist,^[8] und erinnern zudem an Gallensalze.^[13]

Vorteilhaft gegenüber den Gallensalzen ist allerdings, dass wegen der ausgeprägten Hydrophobie durch die beiden Palmitoylketten die kritische Micellbildungskonzentration (CMC) von P2A2 beträchtlich niedriger sein und so den kolloidalen Zustand selbst bei extremer Verdünnung erhalten sollte. Tatsächlich liegt die subnanomolare CMC des Lipopeptids unterhalb der mit Fluoreszenzspektroskopie (nanomolar) oder Kalorimetrie (mikromolar)^[12,14] experimentell zugänglichen Bereiche, was nahe legt, dass die Konzentration von monomerem P2A2 stets vernachlässigbar ist.

Die Effizienz von P2A2 bei der Bildung lipidreicher Micellen wurde mithilfe der Lichtstreuintensität I von seinen Mischungen mit dem zwitterionischen Phospholipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC) untersucht. Hierfür wurden getrocknete Lipidfilme in gepufferten Lösungen unterschiedlicher P2A2-Konzentrationen suspendiert und unilamellare Vesikel unter Anwendung von Standardmethoden hergestellt.^[10] Für eine Serie von Proben mit gleicher Lipidkonzentration stiegen die I -Werte mit zunehmender P2A2-Konzentration nur leicht an, bis bei einem sättigenden Tensid/Lipid-Molverhältnis R_e^{sat} Membransolubilisierung einsetzte (Abbildung 3 a). Eine weitere Erhöhung

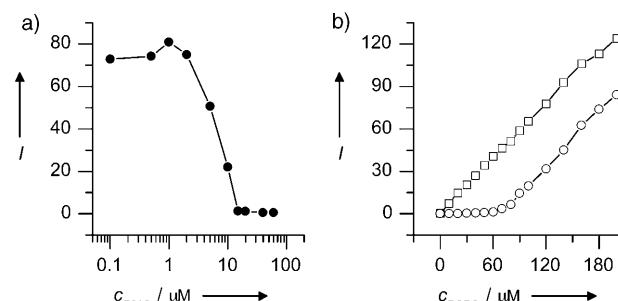


Abbildung 3. 90°-Lichtstreuung zur Tensidaktivität von P2A2 gegenüber POPC-Vesikeln (Durchmesser 100 nm). a) Streuintensität I von $100 \mu\text{M}$ POPC nach Extrusion in Gegenwart von steigenden P2A2-Konzentrationen c_{P2A2} . b) I -Werte für verschiedene Lipidkonzentrationen c_{POPC} in Gegenwart (Kreise) oder Abwesenheit (Quadrate) von $10 \mu\text{M}$ P2A2.

von c_{P2A2} führte zu einer dramatischen Abnahme von I , bis die Solubilisierung bei R_e^{sat} abgeschlossen war. Dies war in ausgezeichneter Übereinstimmung mit einem anderen Streuexperiment, bei dem eine konstante Lipopeptidkonzentration, aber unterschiedliche Mengen an Lipid verwendet wurden (Abbildung 3 b).

Auftragen der charakteristischen P2A2-Konzentrationen an den Knickpunkten der durch LS und Kalorimetrie^[10,15] erhaltenen Kurven gegen die Lipidkonzentration ergibt ein einfaches Phasendiagramm (Abbildung 4).^[16,17] Die zwei Ge-

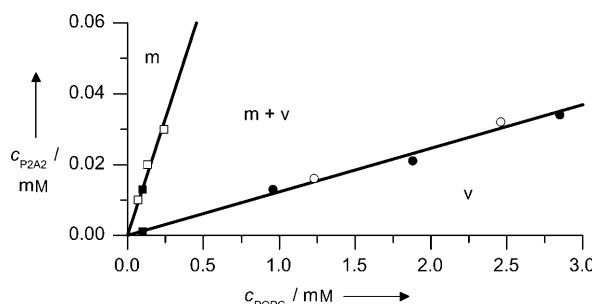


Abbildung 4. Phasendiagramm von verdünnten wässrigen P2A2/POPC-Mischungen. Die Daten wurden Solubilisierungs- (ausgefüllte Symbole) und Rekonstitutionsexperimenten (offene Symbole) mit Lichtstreuung (Quadrat) oder Titrationskalorimetrie (Kreise)^[10] entnommen. Die Regressionsgeraden trennen das micellare (m) und das vesikuläre (v) Areal vom Übergangsbereich (m + v) ab.^[17]

raden mit den Steigungen $R_e^{\text{sat}} = 0.012$ und $R_e^{\text{sol}} = 0.13$ trennen drei Areale voneinander ab, die dem micellaren, dem vesikulären und dem Übergangsbereich zuzuordnen sind.^[18] Nach unserer Kenntnis ist P2A2 das bei weitem effizienteste Tensid, indem es etwa sieben Lipidmoleküle pro Lipopeptid solubilisieren kann, also 50-mal mehr als andere mit zwei Fettsäuren versehene Lipopeptide.^[8] Der Verteilungskoeffizient von P2A2 von Vesikeln (v) zu Micellen (m) beträgt $P_{\text{P2A2}}^{\text{m/v}} = 10$ und spiegelt die Bevorzugung des micellaren Zustands durch das Lipopeptid wider. Mit $P_{\text{POPC}}^{\text{m/v}} = 0.9$ zeigt POPC hingegen nur eine schwache Bevorzugung von Membranen, was darauf hindeutet, dass das Lipid in Micellen nahezu ebenso gut wie in Liposomen eingebaut werden kann, und die Eignung von P2A2 als micellarem Träger mit membranähnlicher Umgebung untermauert.

Besonders wichtig ist, dass die gut definierten Grenzen im Phasendiagramm (Abbildung 4) die direkte Kontrolle des Aggregatzustands von P2A2/POPC-Mischungen durch Einstellen der Konzentrationen der Komponenten ermöglichen. So stehen außer micellaren auch liposomale Strukturen als supramolekulare Träger zur Verfügung, und mit P2A2 dotierte Vesikel haben im Vergleich zu anderen hydrophobierten A2-Derivaten verbesserte Eigenschaften hinsichtlich hoher Lipidaffinität, stabiler Verankerung in der Doppelschicht und niedriger Membranpermeabilisierung.^[19] Erste Untersuchungen mit konfokaler Laserrastermikroskopie zeigten effiziente Internalisierung von Micellen eines fluoreszenzmarkierten P2A2-Derivats (P2fA2) in Hirnkapillar-Endothelzellen der Maus (Abbildung 5). Darüber hinaus könnte aus der langsamem Solubilisierungskinetik^[10] die Anwendung von Nicht-Gleichgewichts-Formulierungen abgeleitet werden, die sich allmählich von P2A2-übersättigten Vesikeln in gemischte Micellen umwandeln. Dies ist besonders bemerkenswert im Hinblick auf die wachsende Bedeutung verzögerter und langanhaltender Arzneimittelfreisetzung aus Abgabesystemen.^[20]

Wir haben gezeigt, dass ein neuartiges Lipopeptid, das aus einem zielspezifischen Peptidvektor und zwei benachbarten Fettsäureketten besteht, ein vielversprechender Kandidat für die Solubilisierung hydrophober Arzneimittel in lipidreichen, membranmimetischen Nanotransportern ist. Wegen ihrer geringen Größe weisen diese supramolekularen Träger viele



Abbildung 5. Konfokale Laserrastermikroskopie zur Internalisierung eines Carboxyfluorescein-markierten P2A2-Derivats (P2fA2) in immobilisierte b.End3-Hirnkapillar-Endothelzellen der Maus. Nach Inkubation mit 1 µM P2fA2 für 30 min bei 37°C zeigte diese repräsentative Zelle ein gepunktetes intrazelluläres Fluoreszenzmuster, das auf einen überwiegend endocytotischen Aufnahmemechanismus hinweist. Membranintegrität und Lebensfähigkeit der Zelle wurden durch Trypanblaufärbung bestätigt.^[12]

Vorteile anderer Micellen auf,^[2] während die Bioaktivität des Peptidrests dank der Umgebung, die durch die Palmitoylschwänze einer Doppelschicht ähnlich ist, erhalten bleibt. Diese einzigartigen Eigenschaften und die solide physiko-chemische Charakterisierung machen den kolloidalen Zustand von P2A2/Lipid-Systemen leicht kontrollierbar und liefern vielseitige Formulierungen für In-vitro-Experimente, die in der Tat schnelle zelluläre Internalisierung nachgewiesen haben. Die einfache Synthese und die gute Löslichkeit von P2A2 sollten detailliertere Strukturuntersuchungen ermöglichen und könnten sich auch für andere Gebiete, wie die Rekonstitution von Membranproteinen,^[8,9] als nützlich erweisen. Schließlich muss die Peptidsequenz nicht auf das zellpenetrierende A2 beschränkt bleiben, sondern könnte an ein breites Spektrum von Liganden für mannigfaltige biologische Ziele anpassbar sein. Weitere Untersuchungen werden ausgeführt, um den Aufnahmemechanismus aufzuklären und den in dieser Arbeit vorgestellten Ansatz auf ähnliche chimäre Lipopeptide auszuweiten.

Eingegangen am 10. Februar 2005,
veränderte Fassung am 12. April 2005
Online veröffentlicht am 20. Juli 2005

Stichwörter: Lipopeptide · Membranen · Micellen · Selbstorganisation · Wirkstoff-Freisetzung

- [1] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, 297, 967–973; H. Dou, M. Jiang, H. Peng, D. Chen, Y. Hong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 115, 1554–1557; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1516–1519; R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 347–360; J. Kreuter, *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, **1994**; R. Langer, *Science* **2001**, 293, 58–59; D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos, *Science* **1995**, 267, 1275–1276; M. A. Moses, H. Brem, R. Langer, *Cancer Cell* **2003**, 4, 337–341; P. C. Rensen, R. L. de Vruet, J. Kuiper, M. K. Bijsterbosch, E. A. Biessen, T. J. van Berkel, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 47, 251–276.
- [2] Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4788–4791; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4640–4643; R. Haag, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 280–284; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 278–282; Y. Kakizawa, K. Kataoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 203–222; K. Kataoka, T.

- Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G. S. Kwon, *J. Controlled Release* **2000**, *64*, 143–153; K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113–131; M. Krämer, J. F. Stumbé, H. Türk, S. Krause, A. Komp, L. Delineau, S. Prokhorova, H. Kautz, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4426–4431; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4252–4256; N. Nasongkla, X. Shuai, H. Ai, B. D. Weinberg, J. Pink, D. A. Boothman, J. Gao, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6483–6487; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6323–6327; R. Savic, L. Luo, A. Eisenberg, D. Maysinger, *Science* **2003**, *300*, 615–618; V. P. Torchilin, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2549–2559; J. V. Weaver, Y. Tang, S. Liu, P. D. Iddon, R. Grigg, N. C. Billingham, S. P. Armes, R. Hunter, S. P. Rannard, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1413–1416; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1389–1392.
- [3] T. L. Innerarity, R. E. Pitas, R. W. Mahley, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4186–4190; K. H. Weisgraber, *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 249–302.
- [4] L. Nobs, F. Buchegger, R. Gurny, E. Allemann, *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1980–1992; M. Zaio, K. S. Arnold, Y. M. Newhouse, T. L. Innerarity, K. H. Weisgraber, M. L. Segall, M. C. Phillips, S. Lund-Katz, *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1087–1095.
- [5] Im gesamten Text bezieht sich der Ausdruck „Micelle“ auf Aggregate kolloidaler Größe, ohne Annahmen bezüglich deren Form oder Zusammensetzung zu machen.
- [6] C. A. Dyer, L. K. Curtiss, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22803–22806; C. A. Dyer, R. S. Smith, L. K. Curtiss, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15009–15015; C. A. Dyer, D. P. Cistola, G. C. Parry, L. K. Curtiss, *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 80–88; M. P. Mims, A. T. Darnule, R. W. Tovar, H. J. Pownall, D. A. Sparrow, J. T. Sparrow, D. P. Via, L. C. Smith, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20539–20547.
- [7] I. Sauer, I. R. Dunay, K. Weisgraber, M. Bienert, M. Dathe, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2021–2029.
- [8] C. L. McGregor, L. Chen, N. C. Pomroy, P. Hwang, S. Go, A. Chakrabarty, G. G. Privé, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 171–176.
- [9] C. R. Sanders, A. K. Hoffmann, D. N. Gray, M. H. Keyes, C. D. Ellis, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 423–426.
- [10] Für Details siehe Hintergrundinformationen.
- [11] Der Einfachheit halber ist der Peptidrest als ideale α -Helix dargestellt, obwohl Circulardichroismus-Spektroskopie gezeigt hat, dass die Helicität vom Aggregatzustand abhängt und 50% nie überschreitet.
- [12] Daten nicht gezeigt.
- [13] M. Almgren, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 146–163; P. Garidel, A. Hildebrand, R. Neubert, A. Blume, *Langmuir* **2000**, *16*, 5267–5275; M. Janich, J. Lange, H. Graener, R. Neubert, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 5957–5962; A. Jover, F. Meijide, E. R. Núñez, J. V. Tato, M. Mosquera, *Langmuir* **1997**, *13*, 161–164.
- [14] S. Paula, W. Süs, J. Tuchtenhagen, A. Blume, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11742–11751.
- [15] H. Heerklotz, J. Seelig, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 69–85; H. Heerklotz, G. Lantzsch, H. Binder, G. Klose, A. Blume, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *235*, 517–520.
- [16] H. Heerklotz, G. Lantzsch, H. Binder, G. Klose, A. Blume, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 6764–6774.
- [17] Vesikel-Micellen-Koexistenz ist das einfachste, aber nicht das einzige Modell, das eine konsistente Interpretation bietet, und andere Szenarien könnten in Betracht gezogen werden, z. B. ein Übergang von Vesikeln zu scheibenförmigen Doppelschichten oder Bicellen bei R_e^{sal} , gefolgt von allmählichem Schrumpfen aufgrund weiterer Erhöhung von c_{P2A2} . R_e^{sol} wäre dann kein thermodynamisch sinnvoller Parameter, sondern vielmehr ein willkürlich definierter Schwellenwert, bei dem die Doppelschichtscheiben mithilfe der I -Werte in ihrer Größe kaum von reinen P2A2-Micellen unterscheidbar werden.
- [18] D. Lichtenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *821*, 470–478.
- [19] I. Sauer, H. Nikolenko, S. Keller, K. Abu Ajaj, M. Bienert, M. Dathe, eingereicht.
- [20] S. Mantripragada, *Prog. Lipid Res.* **2002**, *41*, 392–406; M. P. Ramprasad, G. M. Anantharamaiah, D. W. Garber, N. V. Katre, *J. Controlled Release* **2002**, *79*, 207–218.