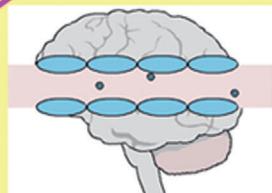


Schleusenvermittelter Transport von Wirkstoffen ins Gehirn

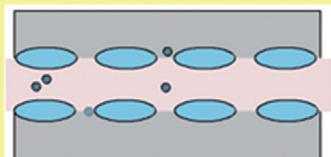
Morteza Malakoutikhah, Meritxell Teixidó* und Ernest Giralt*

Stichwörter:

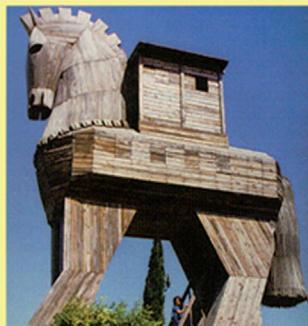
Blut-Hirn-Schranke · Peptide ·
Schleusenvermittelter Transport ·
Wirkstofffreisetzung



Gehirnkapillare



periphere Kapillare



Während des letzten Jahrzehnts wurden im Bereich der Wirkstofffreisetzung wesentliche Fortschritte erzielt. Die Behandlung von Gehirnerkrankungen bleibt aber wegen der Blut-Hirn-Schranke (BHS; blood-brain barrier) noch immer eine große Herausforderung. Diese Struktur schränkt den Zugang von Wirkstoffen zu ihrem Wirkort im Zentralnervensystem stark ein. Es wurden verschiedene Strategien vorgeschlagen, um den Transport von Wirkstoffen über die BHS zu verstärken. In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf einen vektorvermittelten Ansatz, bei dem der Wirkstoff an ein Schleusermolekül gekuppelt wird, das die Fähigkeit hat, die BHS zu überqueren und die Substanz ins Gehirn abzugeben.

1. Einleitung

1.1. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Niedermolekulare Substanzen können die Zwischenräume zwischen den Endothelzellen der peripheren Blutkapillaren leicht passieren (Abbildung 1A). In den Gehirnkapillaren sind zwischen den Endothelzellen dagegen Schlussleisten (tight junctions) ausgebildet, die den parazellulären Transport von Molekülen ins Gehirn verhindern (Abbildung 1B). Außerdem bilden und erhalten die Basalmembran und Gehirnzellen wie Pericyten und Astrocyten, die die Endothelzellen umgeben, eine enzymatische und physikalische Barriere, bekannt als Blut-Hirn-Schranke (BHS). Es gibt etwa 643 km Kapillaren im Gehirn, die eine Fläche von 20 m² bedecken. Die BHS soll das Eindringen von Giftstoffen ins Gehirn verhindern und die Homöostase aufrecht erhalten. Sie bildet aber auch ein wirksames Hindernis gegen einen effizienten Wirkstofftransport ins Zentralnervensystem. Eine weitere Barriere trennt das Blut von der zerebrospinalen Flüssigkeit. Diese spielt bei der Aufnahme von Wirkstoffen allerdings keine wesentliche Rolle, da ihre Oberfläche nur 1/5000 der BHS beträgt.^[1–8]

Das Erreichen des Gehirns und damit die Verfügbarkeit des Wirkstoffs am Wirkort im Gehirn für eine Zeit, die ausreicht, um den biologischen Effekt zu erzielen, ist das Ziel eines jeden Entwicklungsprogramms für ZNS-Medikamente. Dafür ist die Permeation der BHS ein entscheidendes Kriterium, auch wenn andere mechanistische Aspekte wie die Verteilung der Substanz in den Hirnkompartimenten, die Verstoffwechselung, die unspezifische Bindung an Proteine und Lipide von Plasma oder Hirn und die Abtrennung aus der Interstitialflüssigkeit in Blut und Zerebrospinalflüssigkeit nicht vernachlässigt werden sollten.^[8,9]

1.2. Permeationsmechanismen durch die BHS

Verbindungen überqueren die BHS auf aktivem oder passivem Wege (Abbildung 2). Niedermolekulare lipophile Moleküle gelangen durch passive Diffusion ins Gehirn (Abbildung 2 A). Spezifische Transporter in endothelialen Membranen transportieren Nährstoffe wie Glucose und Amino-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8149
2. Chemisches Freisetzungssystem (CDS)	8151
3. Carrier-vermittelter Transport	8153
4. Molekulare Trojanische Pferde	8154
5. Kolloidale Carrier	8156
6. Peptidvektor-vermittelte Strategie	8160
7. Zusammenfassung und Ausblick	8162

säuren in dieses Organ (Carrier-vermittelter Transport, Abbildung 2B). Größere Moleküle dagegen (Peptide und Proteine) werden entweder über einen spezifischen Rezeptor (rezeptorvermittelte Endocytose, Abbildung 2C) oder durch elektrostatische Wechselwirkung mit Endothelmembranen (adsorptionsvermittelte Endocytose, Abbildung 2D) transportiert. Demgegenüber pumpen aktive Efflux-Transporter wie das P-Glycoprotein (P-gp) ihre Substrate aus dem Gehirn und den Endothelzellen der BHS ins Blut zurück (Abbildung 1).^[3,4,10–13]

1.3. Strategien zur Wirkstofffreisetzung im Gehirn

Inzwischen gibt es für einige Hirnerkrankungen zwar wirksame Substanzen, doch wird ihr Einsatz durch das ungünstige Verteilungsgleichgewicht mit dem Gehirn oder die mangelnde Permeation durch die BHS beeinträchtigt. So gelangen z. B. die meisten Chemotherapeutika, die systemisch verabreicht werden, nicht in der für die Tumoren erforderlichen Konzentration ins Gehirn, was eine Erklärung für die hohe Mortalität bei Gehirntumoren sein kann. Man geht zwar davon aus, dass lipophile niedermolekulare Substanzen (Molekulargewicht unter 400 Da), die keine Substrate für aktive Efflux-Transporter sind, die BHS überwinden können. Mehr als 98 % der Substanzen erfüllen diese Bedingungen, um das Gehirn zu erreichen, jedoch nicht. Darüber hinaus gelangen große Moleküle überhaupt nicht bis zum Gehirn.

[*] Dr. M. Malakoutikhah, Dr. M. Teixidó, Prof. E. Giralt
Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona)
Barcelona Science Park, Baldíri Reixac 10, 08028 Barcelona (Spanien)
Fax: (+34) 93-403-7126
E-Mail: meritxell.teixido@irbbarcelona.org
ernest.giralt@irbbarcelona.org
Homepage: <http://www.pcb.ub.es/giralt/html/home.html>
Prof. E. Giralt
Department of Organic Chemistry, University of Barcelona
Martí i Franquès 1–11, Barcelona (Spanien)

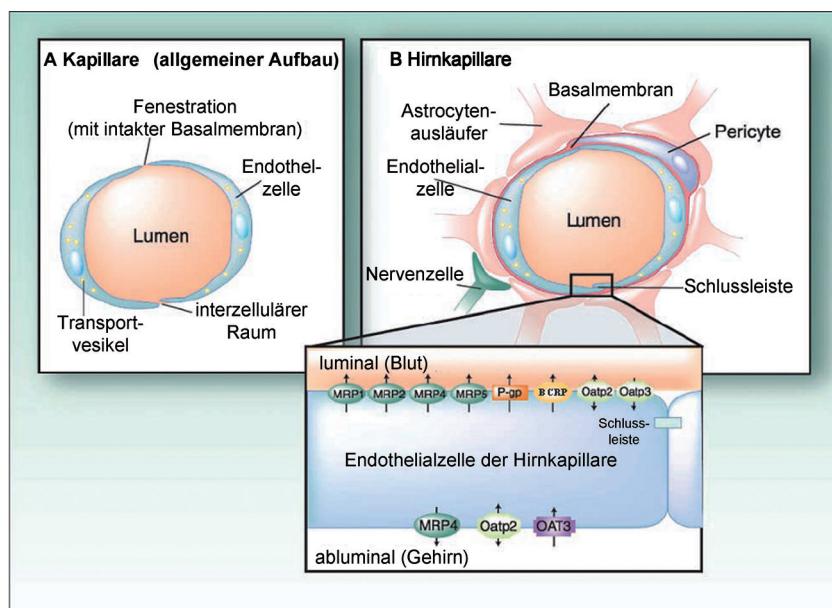


Abbildung 1. Vergleich einer peripheren Kapillare (A) mit einer Hirnkapillare (B). Die BHS wird von den Endothelzellen der Kapillaren und von einer sie umgebenden Basalmembran und perivaskulären Endfüßchen der Astrozyten gebildet. Schließleisten zwischen den zerebralen Endothelzellen bilden eine Diffusionsbarriere, die die Penetration wasserlöslicher Verbindungen einschließlich polarer Wirkstoffe ins Gehirn strikt begrenzt. Die Astrozytausläufer sind vermutlich entscheidend für Induktion und Aufrechterhaltung der Endothel-Barriere. Außerdem umschließen Pericyten die Hirnkapillaren sehr dicht und tragen wohl auch zu Entwicklung, Erhaltung und Regulation der BHS bei. Weil die endotheliale Barriere so dicht ist, ist der parazelluläre Transport von Substanzen unter physiologischen Bedingungen vernachlässigbar. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Lit. [4].



Morteza Malakoutikhah studierte Chemie an der Universität Teheran (B.Sc. 1999) und an der Isfahan University of Technology (M.Sc. in organischer Chemie 2002). 2009 promovierte er bei Prof. Ernest Giralt und Dr. Meritxell Teixidó am Institute of Research in Biomedicine am IRB Barcelona. Seine Doktorarbeit befasste sich mit der Suche nach Peptiden, die als Schleusermoleküle ins Gehirn geeignet sind. Im Anschluss war er 15 Monate lang Postdoc beim Spanish National Research Council (CSIC, Barcelona). Momentan hat er ein Marie-Curie-Stipendium an der Universität Groningen (Niederlande) inne und arbeitet über dynamische kombinatorische Chemie.



Meritxell Teixidó ist Forschungsassistentin in der Design, Synthesis and Structure of Peptides and Proteins Research Group von Prof. Giralt am Institute for Research in Biomedicine (IRB) im Barcelona Science Park in Spanien. Sie promovierte in Chemie an der Universität Barcelona mit der Arbeit „Evolutionary Combinatorial Chemistry, a Novel Tool for SAR Studies on Peptide Transport across the Blood–Brain Barrier“. Sie erhielt den Dr. Bert L. Schram Award (bestes Poster eines Nachwuchswissenschaftlers) beim 29. Europäischen Peptidsymposium (Polen, 2006) und den American Peptide Society Peptide Idol Award beim 20th American Peptide Symposium (Kanada, 2007).

Betrachtet man andererseits, dass etwa 1.5 Milliarden Menschen weltweit unter Gehirnerkrankungen leiden und dass in einer alternden Bevölkerung ein wachsender Bedarf für ZNS-gängige Therapeutika besteht, wird der dringende Bedarf für eine geeignete Strategie deutlich, mit der nichtpermeierende Substanzen im Gehirn freigesetzt werden können.^[14–16] Um die BHS zu überwinden und eine Aufnahme von Wirkstoffen ins Gehirn zu verbessern, wurde versucht, die Blut-Hirn-Schranke zeitweilig zu öffnen, sehr hohe Wirkstoffdosen zu applizieren oder die Substanzen direkt ins Rückenmark zu injizieren. Diese Verfahren sind jedoch invasiv und mit dem Risiko von Infektionen und Toxizität verbunden. Außerdem ist hochqualifiziertes Personal vonnöten. Daneben wurden noch weitere Strategien entwickelt: 1) gemeinsame Verabreichung von Hemmstoffen der aktiven Efflux-Transporter mit Wirkstoffen, die von diesen erkannt werden; allerdings können diese Hemmstoffe schädliche Nebenwirkungen in Gehirn und peripheren Geweben auslösen;^[17–19] 2) fokussierter Ultraschalleinsatz (FUS), der die BHS lokal und reversibel aufbricht;^[20,21] allerdings kann FUS Hirngewebe schädigen;^[22] 3) magnetische Zielführung (magnetic targeting; MT), bei der magnetische Nanopartikel (MNPs) durch ein externes Magnetfeld im Gehirn angereichert und in anderen Organen abgereichert werden. Diese Technik erfordert jedoch eine größere Optimierung der MNP-Eigenschaften und der Parameter des Magnetfelds, um die möglichen toxischen Effekte auf die BHS zu reduzieren.^[23,24] Die Kombination aus FUS und MT erwies sich dabei als effizienter als jeder Ansatz für sich allein.^[25] Eine weitere Option zur Überwindung der BHS ist, die Struktur einer Verbindung so zu modifizieren, dass sie kein Substrat mehr für aktive Efflux-Transporter ist.^[17,26] In anderen Ansätzen wird die Lipophilie eines Wirkstoffs erhöht und damit die passive Permeation verbessert oder man strebt eine Struktur an, die einem Nährstoff ähnelt und so leichter von einem der verschiedenen spezifischen Transportproteine



Ernest Giralt promovierte 1974 an der Universität Barcelona. Nach einer Zeit als Postdoc an der Universität Montpellier kehrte er als Associate Professor nach Barcelona zurück und wurde 1986 zum Full Professor befördert. 2005 wurde er zum Direktor des Chemistry and Molecular Pharmacology Programme am Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) ernannt. Seine Hauptinteressen sind Peptidsynthese, molekulare Erkennung und Strukturbestimmung, insbesondere mit NMR-Spektroskopie.

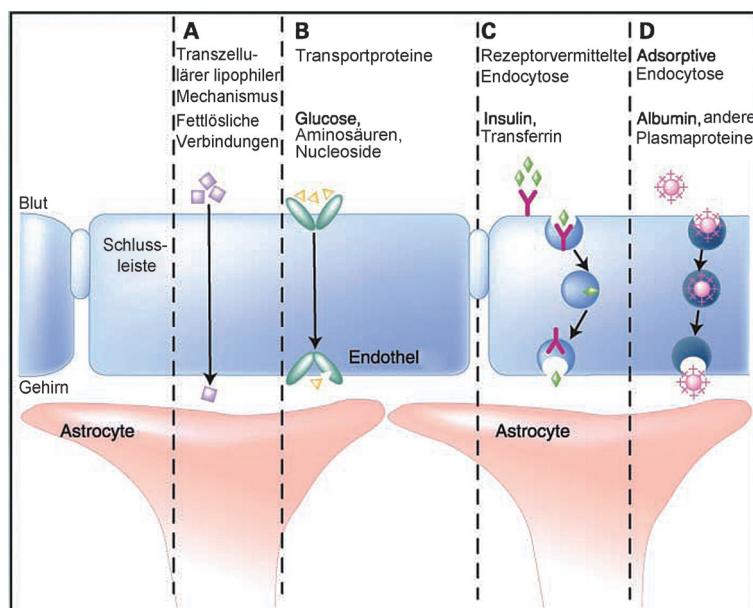


Abbildung 2. Mechanismen, die für den Transport endogener Substanzen über die BHS infrage kommen. A) niedermolekulare, fettlösliche Substrate diffundieren über die Membran, werden allerdings durch Transportproteine auch wieder in den Kreislauf zurückgepumpt. B) Niedermolekulare körpereigene Moleküle wie Aminosäuren, Nucleoside und Glucose werden von Transportproteinen durch die BHS geschleust. C) Endogene größere Moleküle, darunter Insulin und Transferrin, werden von Rezeptoren auf der luminalen Seite des Endothels erkannt und über die Zellschicht transportiert, um dann ins Gehirnparenchym freigesetzt zu werden. D) Körpereigene große Plasmaproteine wie Albumin werden über die BHS mit adsorptionsvermittelter Endozytose transportiert. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Lit. [4].

in der BHS übertragen wird.^[3,10–12,27] Die Modifikation eines Wirkstoffs kann allerdings die Affinität zum Rezeptor im Gehirn beeinträchtigen oder das Molekulargewicht auf über 400 Da steigern. Außerdem kann eine größere Lipophilie die Aufnahme einer Substanz in andere Organe verbessern und so die Konzentration im Blut absenken.^[16] In diesem Zusammenhang stellt sich die Konjugation therapeutischer Moleküle an Verbindungen (Shuttles), die die BHS überqueren und dabei Wirkstoffe ins Gehirn tragen können, als attraktive Alternative dar.^[16,28,29] In manchen Fällen kann die Konjugation die Löslichkeit des Wirkstoffs verbessern oder helfen, aktive Efflux-Transporter zu vermeiden, ohne Lösungsvermittler oder P-gp-Hemmstoffe einzusetzen.^[29,30] Wir

diskutieren im Folgenden einige neue Shuttle-Transporter, die zu diesem Zweck eingesetzt wurden (Tabelle 1).

2. Chemisches Freisetzungssystem (CDS)

Das chemische Freisetzungssystem (chemical delivery system; CDS) war einer der ersten Ansätze, um eine spezifische Wirkstofffreisetzung im Gehirn zu erreichen (Abbildung 3). Das System basiert auf einem Dihydropyridin ($T \leftrightarrow T^+$)-Redoxcarrier, bei dem der Wirkstoff chemisch an das Dihydropyridin gebunden ist (Wirkstoff-T). Nach intravenöser Injektion verteilt sich Wirkstoff-T aufgrund seiner erhöhten Lipophilie in den Körpergeweben einschließlich dem Gehirn. Durch enzymatische Oxidation von Wirkstoff-T entsteht Wirkstoff-T⁺, das wegen der Ladung in der Peripherie schnell durch Niere und Leber ausgeschieden wird. Die gleiche Ladung von Wirkstoff-T⁺ sorgt andererseits dafür, dass die Verbindung im Gehirn „eingeschlossen“ wird und der Wirkstoff selbst durch enzymatische Spaltung langsam und nachhaltig freigesetzt wird.^[31–33]

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) gelangt durch adsorptionsvermittelte Endozytose ins Gehirn;^[34,35] es infiziert das Organ und löst eine AIDS-Enzephalopathie aus. Die Medikamente zur AIDS-Behandlung können jedoch die BHS nicht passieren.^[36,37] Daher ist die Behandlung schwierig, obwohl es therapeutisch wirksame Verbindungen gibt. Zudem kann das Gehirn als Reservoir für HIV-1 dienen. Mit CDS wurde die Zugänglichkeit des Gehirns für Zidovudin (AZT, Abbildung 4A), der ersten Verbindung, die für die AIDS-Behandlung zugelassen wurde, verbessert. Die Verabreichung von AZT-CDS (Abbildung 4B) in Hunden steigerte die Konzentration von AZT im Gehirn um das 1.8- bis 3.3fache verglichen mit freiem AZT. Dabei war die Konzentration von AZT im Gehirn nicht signifikant erhöht; weil AZT-CDS aber die AZT-Konzentration im Blut absenkt, resultiert daraus ein höheres Konzentrationsverhältnis zwischen Gehirn und Blut als bei der Gabe von AZT allein.^[38] Das CDS-Verfahren wurde auch verwendet, um verschiedene Neuropeptide wie Enkephalin, TRH

Tabelle 1: Shuttle-vermittelte Strategien zur Wirkstofffreisetzung im Gehirn.

Strategie	Mechanismus	Wirkstoff	Anwendung	Lit.
chemisches Freisetzungssystem	passive Diffusion	Zidovudin (AZT) Dopamin	AIDA-Enzephalopathie Parkinsonsche Krankheit	[38] [32, 46]
Carrier-vermittelter Transport	Carrier-vermittelter Transport	Nipeicotinsäure (Nip) Ketoprofen	krampflösend entzündungshemmend	[48, 49] [50, 51]
„Trojanische Pferde“	rezeptorvermittelte Endozytose	Anti- β -Antikörper α -L-Iduronidase (IDUA)	Alzheimersche Krankheit Hurler-Pfaundler-Syndrom	[75, 79] [78]
kolloidale Carrier	rezeptorvermittelte Endozytose adsorptionsvermittelte Endozytose	NC-1900 Daunorubicin	Verbesserung der Gedächtnisleistung antitumoral	[102] [107]
Peptidvektor-vermittelt	adsorptionsvermittelte Endozytose rezeptorvermittelte Endozytose	Dalargin Paclitaxel (PAX)	schmerzlindernd antitumoral	[117] [30]

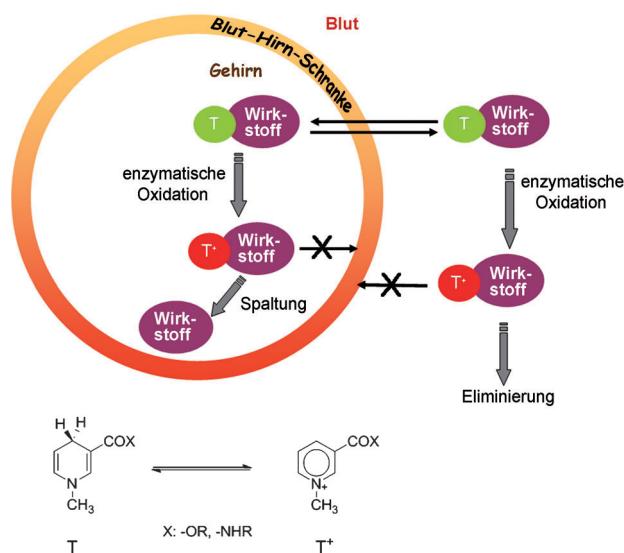


Abbildung 3. Substanztransport ins Gehirn mit einem CDS-Ansatz.

(thyrotropin-releasing hormone) und Kytorphin-Analoga (Tyr-d-Ala-Gly-Phe-d-Leu, Gln-Leu-Pro-Gly und Tyr-Lys) ins Gehirn zu transportieren. In diesem Fall wird ein Dihydropyridin (T) an den N-Terminus des Peptids über eine abstandhaltende Aminosäure (Pro oder/und Ala) konjugiert, und der C-Terminus ist mit einem lipophilen Cholesterylester verankert (Abbildung 4C). Die Cholesterylgruppe dient der Steigerung der Lipophilie und verhindert den Peptidabbau

durch Peptidasen. Der Spacer erleichtert oder kontrolliert die enzymatische Freisetzung der Peptide, wenn sie im Gehirn angekommen sind.^[39–41] Dihydropyridine wurden auch mit Erfolg zur hirnspezifischen Freisetzung verschiedener Verbindungen wie Dopamin,^[32] verschiedener Östrogene^[42] und 4-Aminobuttersäure (GABA) eingesetzt.^[43]

Der Hauptnachteil von Dihydropyridin, der die weitere Entwicklung behindert, ist die mangelnde Lagerstabilität, die durch die Empfindlichkeit der 5,6-Doppelbindung gegen Luftoxidation und/oder Hydratation bedingt ist. Diese Oxidations-/Hydratationsreaktion führt zu 6-Hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyridin, das in vivo nicht der enzymatischen Oxidation zum quartären Pyridiniumsalz unterliegt.^[44,45]

Um dieses Problem zu überwinden, wurden verschiedene Dihydropyridin-Derivate mit höherer Stabilität entwickelt. Carelli et al.^[46] berichteten, dass Tetrahydronaphthalin (Abbildung 4D) für die gehirnspezifische Freisetzung von Dopamin wirksamer als Dihydropyridin ist. N-Ethoxycarbonylmethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäure (Abbildung 4E), gekuppelt an β-Phenethylamin und Tryptamin als Modellsubstanzen (Abbildung 4F) gelangte nach intravenöser Applikation in Ratten ins Gehirn. Die entsprechenden quartären Säuren (Abbildung 4G) wurden innerhalb von 2 h nach der Injektion aus dem Blut eliminiert; im Gehirn wurden die Verbindungen jedoch bis zu 5 h festgehalten.^[45] Foucout et al.^[44] stellten kürzlich ein Carboxy-1,4-dihydrochinolin-Derivat (Abbildung 4H) als neues CDS vor. Das Amido-1,4-dihydrochinolin-Derivat (Abbildung 4I) in Ratzenblut bildete in vitro bis zu 20 min weder das entsprechende

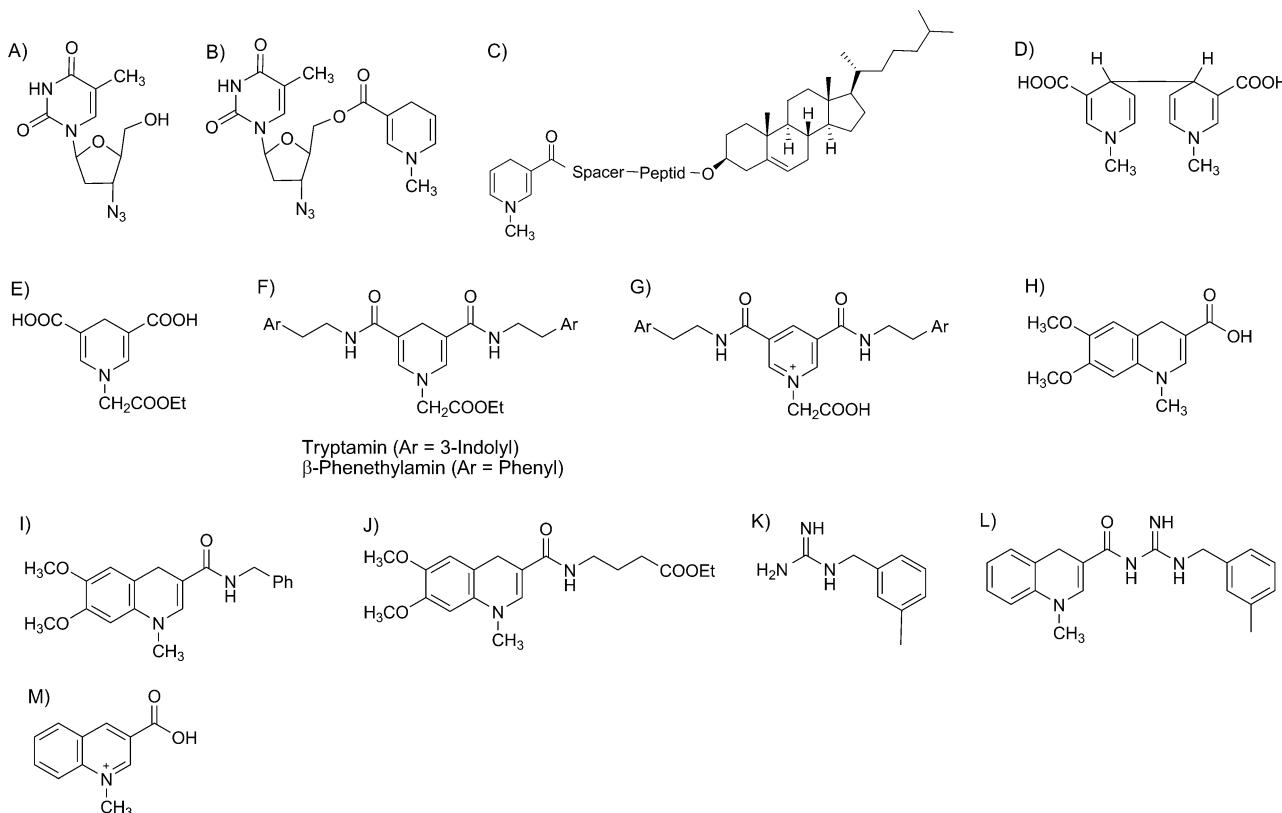


Abbildung 4. Chemische Struktur von Wirkstoffen oder Shuttle-Wirkstoff-Konstrukten für ein CDS.

quartäre Salz noch andere Nebenprodukte; nach intravenöser Injektion wurde es dagegen im Gehirn nachgewiesen (Abbildung 4I), wo es vollständig innerhalb von 5 min in das entsprechende quartäre Salz umgewandelt wurde. Zusätzlich zeigte das 1,4-Dihydrochinolin-Derivat, wenn es an GABA gekuppelt war (Abbildung 4J), eine signifikante zentrale GABAerge Aktivität nach intraperitonealer (i.p.) Verabreichung in Mäusen, während GABA allein diesen Effekt nicht zeigte. Diese Ergebnisse bestätigen die Eigenschaft des Carboxy-1,4-dihydrochinolin-Derivats (Abbildung 4H), Wirkstoffe im Gehirn freizusetzen. MIBG (Abbildung 4K) ist ein Guanidin-Derivat, das als Tumormarker verwendet wird. Es überwindet jedoch nicht die BHS. In einer anderen Untersuchung fanden die Autoren heraus, dass das Konjugat aus MIPG und einem 1,4-Dihydrochinolinrest (Abbildung 4L) nach intravenöser Injektion in Ratten eine mäßige Penetration ins Gehirn zeigte. Während die Konzentration des Konjugats im Gehirn innerhalb von 60 min abnahm, nahm die Menge an quartärem Salz (Abbildung 4M) in der gleichen Zeit zu. Dieser Befund deutet auf die Oxidation des Konjugats im Hirn gefolgt von der enzymatischen Freisetzung von MIBG hin.^[47]

3. Carrier-vermittelter Transport

Substrate für endogene BHS-Carrier können als Schleusen verwendet werden, um niedermolekulare Substanzen im

Gehirn freizusetzen. Es gibt die Vermutung, dass Ascorbinsäure (AA) das Gehirn über den natriumabhängigen Transporter SVCT2 erreicht. In einem zellulären Testsystem zeigte sich, dass mit Ascorbinsäure gekoppelte Nipecotinsäure (Nip, Abbildung 5A; Konjugat Abbildung 5B) die Aufnahme von [¹⁴C]AA konzentrationsabhängig hemmt. Außerdem hatte die intraperitoneale Injektion von Nip-AA in Mäusen krampflösende Wirkung im Gegensatz zu Nip allein.^[48]

Tyrosin, das über den Aminosäuretransporter für große Aminosäuren (large natural amino acid transporter; LAT1) das Gehirn erreicht, kann als Vektor dienen, um Nip ins Hirn zu bringen. Nip wurde mit Tyrosin konjugiert (Abbildung 5C), und eine systemische Verabreichung dieses Konjugats an Mäuse wirkte signifikant und dosisabhängig krampflösend; Nip alleine hatte diesen Effekt nicht.^[49] Daher lässt sich vermuten, dass Nip-AA- und Nip-Tyr-Konjugate aktiv über die BHS transportiert werden können. Gynther et al.^[50] fanden außerdem heraus, dass Ketoprofen nach Konjugation an L-Tyrosin (Abbildung 5D) ein Substrat für LAT1 ist und in Ratten die BHS mithilfe dieses Transporters überquert.

Glucose, die das Gehirn über einen eigenen Transporter (GLUT-1) in der BHS erreicht, wurde ebenfalls als Vektor für die Wirkstofffreisetzung im Gehirn verwendet. Mit einer In-situ-Perfusion des Rattenhirns zeigten Gynther et al.,^[51] dass Ketoprofen und Indomethacin nach Konjugation an Glucose (Abbildung 5E und 5F) die Aufnahme von Glucose durch das Gehirn hemmten. Offenbar haben also die beiden Kon-

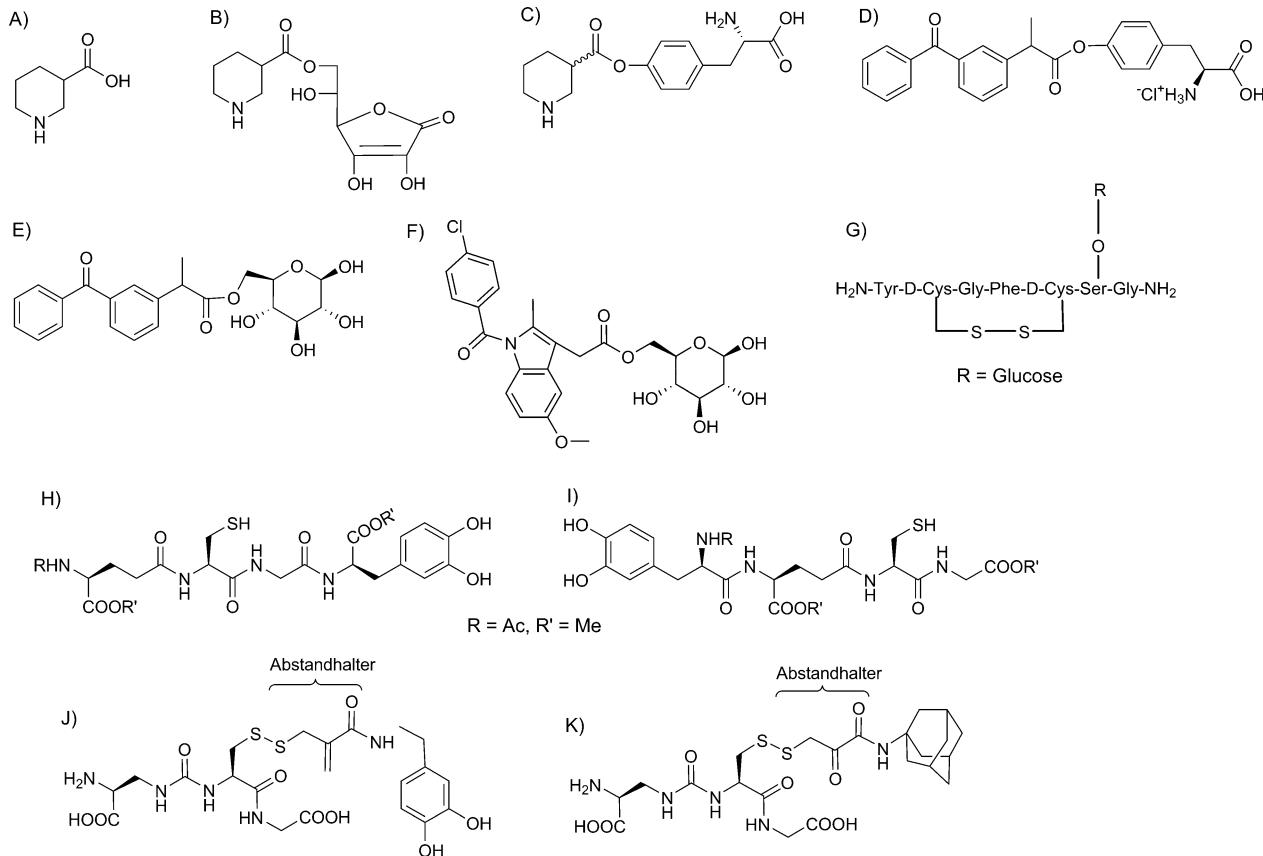


Abbildung 5. Chemische Struktur von Wirkstoffen oder Shuttle-Wirkstoff-Konstrukten für einen Carrier-vermittelten Transport.

jugate eine höhere Bindungsaffinität zu GLUT-1 als Glucose. Außerdem ist die Transportgeschwindigkeit der Konjugate temperaturabhängig, was ebenfalls für die Aufnahme dieser Verbindungen durch GLUT-1 spricht. Egleton et al.^[52] fanden heraus, dass das an Ser⁶ glycosyierte lineare Opioidpeptid-amid Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Ser-NH₂ nach intravenöser Injektion bei Ratten stärker und länger schmerzlindernd wirkt als das nicht glycosyierte Peptid. Die verbesserte analgetische Aktivität des glycosylierten Peptids wurde unterschiedlichen Faktoren zugeschrieben, darunter einer doppelt so hohen Aufnahme ins Gehirn (gemessen über In-situ-Perfusion des Rattengehirns) und eine höhere Stabilität (1.8fach im Plasma und 1.5fach im Gehirn). Die Autoren schlossen jedoch aus, dass die glycosylierten Peptide nicht über GLUT-1 ins Gehirn gelangen, sondern schlügen stattdessen den organischen Anionen-transportierenden Peptidtransporter als Carrier vor. In einer anderen Untersuchung fanden die Autoren, dass die Glycosylierung des cyclischen Opioidpeptids [D-Cys^{2,5},Ser⁶,Gly⁷]-Enkephalin eine stärkere analgetische Reaktion hervorruft, wenn die Glucose axial oder äquatorial zum Peptidrückgrat ausgerichtet ist. Sie beobachteten gleichzeitig bei der In-situ-Perfusion an der Ratte eine bessere Aufnahme ins Gehirn. Die Verbesserung der analgetischen Wirkung röhrt jedoch nicht nur von der Verstärkung der BHS-Permeation her, sondern kann zum Teil auch mit der Bindungsaffinität des Peptids zum μ -Opioidrezeptor (dem primären Rezeptor für Analgetika) im Gehirn zusammenhängen, denn eines der glycosylierten Peptide mit niedrigerer Aufnahme ins Gehirn bei andererseits höherer Bindungsaffinität zeigte einen stärkeren analgetischen Effekt.^[53]

Die Permeation von Dendrimeren, die mit Glucosamin (2-Amino-2-desoxy-D-glucose) konjugiert sind, war in einem zellbasierten BHS-Modell 3.5-mal größer als die der unkonjugierten Dendrimere. Auch die Internalisierung von Dendrimeren in Gliomazellen wurde durch Glycosylierung auf das 8fache erhöht. Glycosyierte Dendrimere, die mit Methotrexat, einem Antitumorwirkstoff, beladen waren, hemmten das Wachstum von Gliomzellen 4.5-mal effektiver. Dies deutet darauf hin, dass die Glycosylierung eine zweifache Rolle bei Wirkstoffen spielt, indem sie die BHS-Permeation und die Aufnahme durch Gliomzellen verbessert. Es sind allerdings noch In-vivo-Untersuchungen erforderlich, um diese Befunde zu bestätigen.^[14] Es konnte auch gezeigt werden, dass glycosylierte Analoga von Dermorphin^[54] (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂), Deltorphin^[54,55] (H-Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂) und [Met⁵]-Enkephalin^[56] (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) bei Mäusen stärker analgetisch wirken als die nichtglycosylierten Ausgangspeptide. Die Autoren folgerten, dass die verstärkte analgetische Reaktion auf glycosylierte Peptide auf einen verbesserten Transport aus dem Blut ins Gehirn, teilweise bedingt durch den Beitrag von GLUT-1, zurückgeführt werden kann. Da Glucosetransporter in allen Geweben exprimiert werden, können glycosylierte Verbindungen entsprechend auch von anderen Organen aufgenommen werden.

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid mit einer ungewöhnlichen Peptidbindung zwischen der Aminogruppe des Cysteins und der Carboxylgruppe der Glutaminsäure-Seitenkette. GSH, das das Gehirn über einen Carrier-vermittelten

Transport erreicht, schützt Proteine gegen Oxidation. L-Dopa wurde über eine Amidbindung an GSH gebunden (Abbildung 5H); die orale Verabreichung der Konjugate an Ratten führte zu einer nachhaltigen Freisetzung von L-Dopa und Dopamin im Gehirn, wodurch die Konzentration dieser beiden Verbindungen gegenüber der Verabreichung einer äquimolaren Dosis Dopamin erhöht wurde.^[57]

More et al.^[58] setzten ein metabolisch stabiles Harnstoffanalogon von GSH als Carrier zur Freisetzung von Dopamin und Adamantamin über MDCK(Madin–Darby canine kidney)-Zellmonoschichten ein. Der GSH-analoge Carrier wurde an Dopamin und Adamantamin über eine Verbindungsgruppe gekuppelt. Die entstehenden Moleküle (Abbildung 5I und J) durchquerten die Zellmonoschicht. Die geringere Transportgeschwindigkeit von GSH durch MDCK-Zellmonoschichten in Gegenwart der Konjugate zeigte, dass der Transport von einem GSH-Transporter vermittelt wurde und keine passive Diffusion war.

Die Kupplung eines Wirkstoffs an ein endogenes Carriersubstrat kann die Affinität des Substrats für seinen Transporter beeinflussen; daher kann die Aufnahme einer Substanz ins Gehirn durch die Aufnahme eines unkonjugierten endogenen Substrates mit einer größeren Affinität beeinträchtigt werden.

4. Molekulare Trojanische Pferde

Endogene Liganden für spezifische BHS-Rezeptoren, auch Trojanische Pferde genannt, haben die Fähigkeit, Wirkstoffe ins Gehirn einzuschleusen.^[16] Das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) ist an der Regulation des zerebralen Blutflusses beteiligt; In-vivo-Untersuchungen ergaben allerdings keinen neuropharmakologischen Effekt, was auf den geringen Transport des Peptids durch die BHS ins Gehirn zurückgeführt wird. Ein VIP-Analogon (Ac-HSDAVFTD-NYTRLRKQ-Nle-AVRRYLNSALN-NH₂, VIPa) wurde mithilfe des Avidin-Biotin-Systems an OX26 gekuppelt, um die Aufnahme des Peptids ins Gehirn zu verbessern (Abbildung 6). Biotin ist ein kleines natürliches Vitamin (H oder

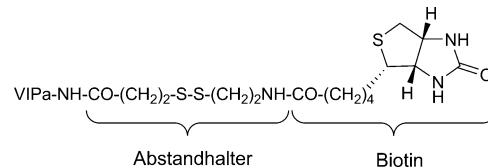


Abbildung 6. Chemische Struktur von biotinyliertem VIPa.

B₇), das mit hoher Affinität an Avidin-Proteine bindet. OX26 ist ein muriner monoklonaler Antikörper (MAb), der die Blut-Hirn-Schranke mithilfe des Transferrin-Rezeptors (TfR) überwindet (Abbildung 7). Nach systemischer Applikation des biotinylierten VIPa, das an Avidin-OX26 gekuppelt war, in Ratten, wurde das Konjugat im Gehirn nachgewiesen und verstärkte den Blutfluss zum Gehirn um 65 %, wohingegen biotinyliertes VIPa alleine die BHS nicht passierte und daher keinen Effekt auf den Blutfluss hatte.^[59]

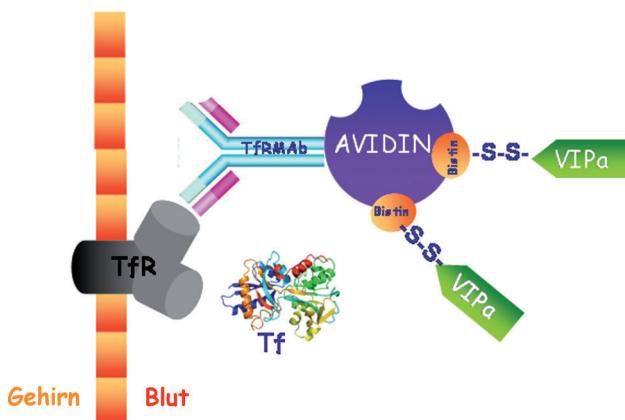
Blut-Hirn-Schranke

Abbildung 7. Durchtritt von biotinyliertem VIPa durch die BHS über einen Transportvektor, der aus einem Konjugat aus Avidin und dem monoklonalen OX26-Anti-Transferrinrezeptor-Antikörper (TfRMab) besteht. Tf, zirkulierendes Transferrin; TfR, BHS-Transferrinrezeptor.

Der dem Gehirn entstammende neurotrope Faktor (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) ist ein potentielles Neuropharmakon für die Behandlung einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen. Ähnlich wie andere Neuropeptide und therapeutische Proteine wird die Substanz kaum über das Endothel der Gehirnkapillaren transportiert. Die Aufnahme von Biotin-PEG²⁰⁰⁰-BDNF, gebunden an OX26/Streptavidin (SA), war 7fach bzw. 2fach höher als diejenige von Biotin-PEG²⁰⁰⁰-BDNF bzw. Morphin (einem neuroaktiven Molekül). Es wurde vermutet, dass diese verbesserte Aufnahme ins Gehirn auf die Verbesserung der BHS-Permeation durch den Transferrin-Rezeptor zurückgeht. Die Konjugation veränderte die biologische Aktivität von BDNF nicht, wie in In-vitro-Tests gezeigt wurde.^[60] Mit OX26/SA wurde auch VIPa ins Rattenhirn transportiert. Die intravenöse Injektion des Konjugats aus VIPA/OX26/SA steigerte bei Ratten die Aufnahme ins Gehirn um mindestens das 10fache und erhöhte den Blutdurchfluss des Organs um 60 %, während unkonjugiertes VIPa den Blutdurchfluss nicht veränderte.^[61] In einer Reihe präklinischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass das endogene humane Polypeptid bFGF (basic fibroblast growth factor) neuroprotektiv wirkt. Da bFGF nur schwer ins Gehirn gelangt, ist eine hohe Dosis erforderlich, um den neuroprotektiven Effekt in diesem Organ auszulösen. In hohen Dosen ruft bFGF in der Peripherie allerdings Nebenwirkungen hervor. Die Konjugation von monobiotinyliertem bFGF (bio-bFGF) an OX26/SA beeinträchtigt die Bindungsaffinität von bFGF für seinen Rezeptor in BHK-21-Zellkulturen nicht. Das bFGF-OX26-Konjugat wurde nicht nur besser ins Gehirn aufgenommen, sondern gelangte im Vergleich zur intravenösen Injektion von bio-bFGF in Ratten auch nur zu einem geringeren Anteil in die peripheren Gewebe.^[62]

Poly(ethylenglycol)-poly(ϵ -caprolacton)(PEG-PCL)-Polymersomen (POs) wurden an OX26 konjugiert (als OX26-PO bezeichnet); die Aufnahme ins Gehirn betrug das 2.6fache der Aufnahme von PO nach intravenöser Injektion

in Ratten. NC-1900, ein Peptid, das aus Vasopressin abgespalten wird, verbessert die Gedächtnisleistung, wenn es Ratten, die unter Scopolamin-induzierter Gedächtnisschwäche leiden, intrazerebroventrikulär injiziert wird. Die Fähigkeit von NC-1900 zur Passage der Blut-Hirn-Schranke ist jedoch gering, was die Verwendbarkeit einschränkt. Um die Möglichkeit zu untersuchen, mit OX26-PO Wirkstoffe ins Gehirn zu transportieren, wurde die Verbindung mit NC-1900 beladen. Während NC-1900 und NC-1900-PO Lernen und Gedächtnisausfälle bei Ratten mit Scopolamin-induzierter Gedächtnisschwäche nicht verbesserten, gelang dies mit der intravenösen Injektion von OX26-PO-NC-1900 bei diesen Tieren.^[63]

Das radioaktiv markierte Peptid EGF (epidermal growth factor) ist ein mögliches Reagens zur bildgebenden Darstellung von Hirntumoren. Das Peptid kann allerdings nicht underivatisiert zu diesem Zweck eingesetzt werden, weil es die BHS nicht überwindet. Um den Transport von EGF ins Gehirn zu verbessern, wurde das biotinylierte Peptid mit OX26/SA über Bis(aminohexanoyl) [(CH₂)₅NHCO-(CH₂)₅NHCO] als Verbindungsgruppe gekuppelt. Dies verhindert die Bindung an den EGF-Rezeptor, wie sich mit In-vitro-Tests nachweisen ließ. Ersetzte man die Verbindungsgruppe durch Poly(ethylenglycol) (PEG) mit einer Molmasse von 3400 Da (PEG³⁴⁰⁰), konnte man damit die Bindungsaffinität von EGF wiederherstellen.^[64] In-vivo-Studien ergaben, dass der Nachweis von Gehirntumoren in Ratten mit EGF nur möglich ist, wenn dieses über einen PEG³⁴⁰⁰-Abstandhalter mit OX26/SA konjugiert ist.^[65]

Radioaktiv markiertes A β ¹⁻⁴⁰ (die ersten 40 Aminosäuren des β -Peptids der Alzheimer-Plaques) kann zur Abbildung der A β -Amyloidfibrillen im Gehirn von Alzheimer-Kranken verwendet werden. Allerdings passiert ¹²⁵I-A β ¹⁻⁴⁰ die BHS nicht in vivo.^[66] Außerdem wird ¹²⁵I-A β ¹⁻⁴⁰ durch den Stoffwechsel schnell aus dem Blut entfernt. Die Aufnahme von monobiotinyliertem ¹²⁵I-A β ¹⁻⁴⁰ im Konjugat mit OX26/SA war nach intravenöser Gabe bei Ratten doppelt so hoch wie die von Morphin, während die Aufnahme von ¹²⁵I-A β ¹⁻⁴⁰ vernachlässigbar war. Außerdem steigerte die Konjugation die metabolische Stabilität von ¹²⁵I-A β ¹⁻⁴⁰ und beeinträchtigte seine Bindung an die Amyloidplaques der Alzheimerschen Demenz nicht.^[67] Mit dem gleichen Freisetzungssystem wurde die Aufnahme einer biotinylierten Polyamid-Nucleinsäure (bio-PNA), einem potentiellen Wirkstoff gegen HIV, nach intravenöser Injektion in Ratten im Vergleich zur unkonjugierten bio-PNA auf das 28fache gesteigert.^[68]

Chitosan-Nanopartikel (NPs) gelangen nach intravenöser Injektion in Mäusen nicht ins Gehirn. Kuppelt man die Partikel aber an OX26, kann man sie dort nachweisen; offenbar ermöglicht OX26 den NPs also die Passage der BHS.^[69] OX26 wurde nach Konjugation an Lipid-Nanokapseln (LNCs) in vitro noch immer vom Transferrin-Rezeptor erkannt; dennoch zeigte das Konjugat LNC-OX26 nur eine 2fach höhere Akkumulation im Gehirn verglichen mit dem unkonjugierten LNC nach intravenöser Injektion in Mäusen. Die Aufnahme des Konjugats ins Gehirn nahm nicht nennenswert zu, möglicherweise wegen der raschen Eliminierung aus dem Blut durch die Leber.^[70] OX26 transportiert auch Loperamid-beladene humane Serumalbumin-Nanopartikel (HSA NPs)

nach intravenöser Injektion in der Maus über die BHS und induziert damit eine signifikante antinociceptive Aktivität.^[71]

Anti-A β -Antikörper verhindern die A β -Aggregation und lösen die A β -Amyloidfibrillen bei der Alzheimer-Demenz auf. Man kann diese Antikörper also als neuen Ansatz für die Behandlung dieser Gehirnerkrankung ansehen.^[72,73] Ein rekombinanter chimärer Maus-/Ratte-MAb gegen den murinen Transferrin-Rezeptor mit der Bezeichnung cTfRMAb passiert die BHS in Mäusen.^[74] Eine Fusion eines Einzelkettenfragments mit der variablen Region gegen A β aus einem monoklonalen Antikörper (ScFv anti-A β) mit cTfRMAb ermöglichte den Übergang über die BHS nach intraperitonealer Injektion in Mäusen, wobei die Bindungsaffinität für das A β -Amyloidpeptid erhalten blieb.^[75] cTfRMAb transportiert auch GDNF (glial-derived neurotrophic factor), ein Neurotrophin, das ähnlich wie BDNF die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert, nach intravenöser Verabreichung in Mäusen ins Gehirn. Andererseits beeinträchtigt die Fusion zwischen GDNF und cTfRMAb die Affinität von GDNF zu seinem Rezeptor nicht.^[76] Die vorher erwähnten MAbs (OX26 und cTfRMAb) können beim Menschen nicht verwendet werden, weil sie nicht mit dem humanen Transferrin-Rezeptor im BHS wechselwirken.^[77] Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass mit OX26 und cTfRMAb noch keine klinischen Studien zur Freisetzung von Wirkstoffen im menschlichen Gehirn bekannt geworden sind. Es wurde allerdings beobachtet, dass ein muriner monoklonaler Antikörper vom humanen Insulinrezeptor (HIR) erkannt wird und dass er auf diesem Weg die BHS überwindet. Daher wurde die Eignung dieses HIRMAb als Schleuser für die Freisetzung einiger Wirkstoffe im Gehirn überprüft.

Boado et al.^[77] konnten nachweisen, dass die Konzentration des Fusionproteins aus BDFN und HIRMAb (BDFN-HIRMAb) nach intravenöser Applikation bei Rhesusaffen mehr als 10fach höher lag als die endogene Konzentration von BDFN im Gehirn. Das Fusionprotein behält auch die Bindungsaffinität zum Rezeptor und die neuroprotektive Aktivität von BDNF. Mucopolysaccharidose Typ I (Hurler-Pfaundler-Syndrom) ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die auch das Gehirn beeinträchtigt. Zur Behandlung gehört auch eine Enzymsatztherapie mit rekombinanter α -L-Iduronidase (IDUA), die allerdings die BHS nicht passiert (Abbildung 8). Die Fusion von IDUA mit TH überquert das Enzym die BHS und die Membran der Gehirnzellen, indem es den IR nutzt, der in beiden Membranen exprimiert wird.

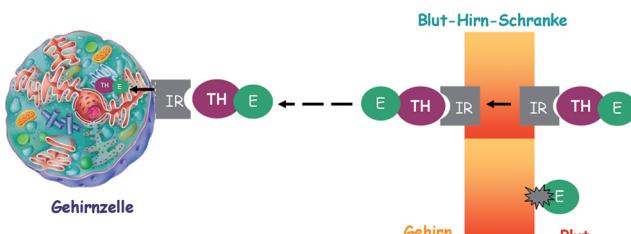


Abbildung 8. Transport eines lysosomalen Enzyms (E) ins Gehirn mit einem chimären MAb gegen den humanen Insulinrezeptor (IR) als molekulares Trojanisches Pferd (TH). Allein überwindet das lysosomale Enzym IDUA die BHS nicht. Nach Fusion von IDUA an TH überquert das Enzym die BHS und die Membran der Gehirnzellen, indem es den IR nutzt, der in beiden Membranen exprimiert wird.

im Rhesusaffen und zeigt auch eine brauchbare Enzymaktivität im Vergleich zu IDUA.^[78] ^{125}I -A β ¹⁻⁴⁰ wurde über SA-Biotin an HIRMAb gekuppelt, ohne dabei die Bindungsaffinität von ^{125}I -A β ¹⁻⁴⁰ für Amyloidplaques der Alzheimerschen Krankheit in vitro zu verändern. Die intravenöse Injektion des konjuguierten ^{125}I -A β ¹⁻⁴⁰ in Affen führte zu einer 10fach höheren Aufnahme im Vergleich zum unkonjuguierten Peptid.^[66]

Der ScFv-anti-A β -MAb wurde mit HIRMAb fusioniert (das entstehende Molekül wurde als Fusionsantikörper bezeichnet). Der anti-A β -MAb passierte beim Rhesusaffen die BHS nicht, während sich der Fusionsantikörper nach intravenöser Injektion im Gehirn verteilt. Dort löste er sogar Amyloidplaques im Gehirn transgener Mäuse auf.^[79] Der humane TNFR (tumor necrosis factor receptor) könnte eine Behandlung gegen Entzündungen in Geweben ermöglichen. Er kann jedoch nicht im Gehirn verwendet werden, weil er die Blut-Hirn-Schranke nicht überwindet. Nach Fusion von TNFR mit HIRMAb (HIRMAb-TNFR-Fusionsprotein) blieb In-vitro-Tests zufolge die Bindungsaffinität zu HIR und die TNFR-Aktivität beibehalten.^[80] Die Aufnahme des Fusionsproteins ins Gehirn von Rhesusaffen nach intravenöser Injektion war 13-mal höher als von TNFR allein.^[81]

Außer im Gehirn wird HIR auch noch in anderen Geweben exprimiert. Ein Wirkstoff, der an HIRMAb gekuppelt ist, könnte also auch von diesen Geweben aufgenommen werden und dort Nebenwirkungen auslösen.^[5]

Die schlechte Aufnahme von Quantenpunkten (quantum dots; QDs) schränkt ihre Verwendung als Agentien für bildgebende Diagnostik und die Behandlung von Gehirnerkrankungen ein. Um QDs ins Gehirn zu bringen, wurden sie mit PEG-Poly(lactat)(PEG-PLA)-NPs eingekapselt und mit Weizenkeimagglutinin dekoriert. Nach intranasaler Applikation bei Mäusen verteilten sich die Konjugate in den Körperegeweben; ein größerer Anteil wurde jedoch im Gehirn wiedergefunden.^[82] Die Konjugation von Transferrin (Tf) an elongierte Quantenpunkte ermöglichte auch deren Transport über ein In-vitro-BHS-Modell mithilfe des Transferrin-Rezeptors.^[83] Lactoferrin (Lf) ist ein Protein der Transferrin-Familie, das als Transporter über die BHS über den Lf-Rezeptor wirkt. Die Konjugation von Lf an PEG-PLA-NPs verstärkt die Akkumulation von NPs im Gehirn von Mäusen nach intravenöser Injektion. Außerdem wirkten Lf-NPs gegenüber den Endothelzellen des Mäusegehirns in einem In-vitro-Test nicht toxisch.^[84]

5. Kolloidale Carrier

Kolloidale Wirkstoffträger wie Liposomen und Nanopartikel wurden für die Freisetzung von Wirkstoffen im Gehirn eingesetzt. Kolloidpartikel werden gut von Leber und Milz aus dem Blut entfernt. Die Modifikation von Kolloidpartikeln mit PEG kann die Stabilität im Blut steigern. Außerdem ist die Konjugation mit spezifischen Transportern wie monoklonalen Antikörpern und Transferrin ein Mittel, um die Aufnahme der Partikel ins Gehirn zu verbessern.^[85,86]

5.1. Nanopartikel

Der Einsatz von NPs zur Wirkstofffreisetzung im Gehirn ist ein interessanter Ansatz, weil diese Partikel eine breite Palette von Substanzen ins ZNS transportieren und sie dort über einen langen Zeitraum abgeben können. Weil NPs so klein sind (200 nm), können sie von Zellen aufgenommen werden. Materialien wie Poly(alkylenyanoacrylate) (PACAs), Polyacetate, Polysaccharide und Copolymeren können zur Herstellung von NPs verwendet werden. Wirkstoffe können eingeschlossen oder an die NPs adsorbiert oder angehängt werden. NPs aus Poly(*n*-butylenyanoacrylat) (PBCA), die mit dem Tensid Polysorbat 80 beschichtet wurden, sind vielfach benutzt worden, um Substanzen ins ZNS zu bringen, die ansonsten die BHS nicht überwinden können.^[85,87]

Um das nicht penetrante Enkephalin-Analogon Dalargin^[88] ins Gehirn zu bringen, kuppelten Kreuter et al.^[89] die Substanz an PBCA-NPs, die mit Polysorbat 80 beschichtet waren. Nach intravenöser Injektion in Mäusen erschienen die mit Polysorbat 80 beschichteten NPs im Gehirn. Auch eine schmerzstillende Wirkung ließ sich mit dem Tail-Flick-Test nachweisen. Demgegenüber hatte eine Kontrolle aus den drei Bestandteilen (Substanz, NPs und Tensid), die unmittelbar vor der intravenösen Injektion gemischt worden waren, keine schmerzstillende Wirkung.

Olivier et al.^[90] fanden heraus, dass die Zugabe von Polysorbat 80 zu dalarginbeladenen PBCA-NPs zur vollständigen Lösung von Dalargin von den NPs führte. Diese Autoren betrachteten daher Dalargin-beladene Polysorbat-80-beschichtete PBCA-NPs als einfache Mischung. Außerdem beobachteten sie, dass PBCA-NPs, gleich, ob sie mit Polysorbat 80 beschichtet waren oder nicht, die Schlussleisten eines In-vitro-BHS-Modells öffnen. Sie berichteten auch, dass die Verabreichung von Polysorbat-80-beschichteten PBCA-NPs in Mäusen manchmal tödlich wirkt. Außerdem induzierten diese NPs einen analgetischen Effekt in den behandelten Tieren. Die Vermutung war daher, dass diese analgetische Wirkung mit der Öffnung der Schlussleisten als Folge der Toxizität der NPs zusammenhing. Im Gegensatz dazu fanden Kreuter et al.,^[91] dass weder eine intravenöse Injektion von freiem Dalargin, gefolgt von einer Injektion von Polysorbat-80-beschichteten PBCA-NPs nach 5 und 30 min noch eine Mischung von Dalargin und Polysorbat-80-beschichteten PBCA-NPs schmerzhemmend wirkten. Demgegenüber wirkten Dalargin-beladene PBCA-NPs, die mit Polysorbat 80 beschichtet waren, stark analgetisch nach intravenöser Injektion in Mäusen. Außerdem ergab eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Endothelzellen aus Rinderhirn-Kapillaren (BBCEs), die mit unbeschichteten und mit Polysorbat-80-beschichteten PBCA-NPs inkubiert worden waren, keine Auffälligkeiten in der Zellmorphologie oder den Schlussleisten. Dies weist darauf hin, dass Polysorbat-80-beschichtete PBCA-NPs die Integrität der BHS nicht stören.

Die intravenöse Applikation von Polysorbat-80-beschichteten PBCA-NPs, die mit einem NMDA(*N*-Methyl-d-aspartat)-Rezeptorantagonisten, MRZ 2/576 (8-Chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-*b*]chinolin-5-oxid-cholinsalz), beladen waren, rief in Mäusen eine längere

krampflösende Wirkung hervor als freies MRZ 2/576. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Polysorbat-80-beschichtete PBCA-NPs MRZ 2/576 ins Gehirn transportieren und über einen längeren Zeitraum freisetzen.^[92] Auch die Konzentration von Tacrin (Abbildung 9A) und Rivastigmin

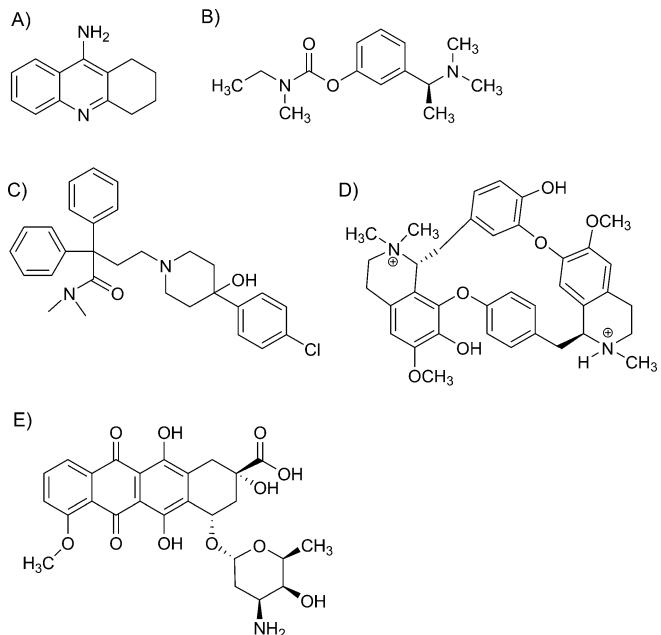


Abbildung 9. Chemische Struktur von Wirkstoffen für kolloidale Carrier.

(Abbildung 9B < xfig9), beides Wirkstoffe gegen Alzheimer'sche Demenz, stieg in Rattengehirnen auf das 4fache, wenn sie auf diese NPs geladen wurden.^[87,93] Die NPs transportierten auch Doxorubicin nach intravenöser Injektion ins Rattengehirn, während Doxorubicin allein die BHS nicht überwinden kann.^[94] Andere Untersuchungen ergaben, dass diese Partikel auch Loperamid (Abbildung 9C < xfig9) und Tubocurarin (ein quartäres Ammoniumsalz, Abbildung 9D), die ebenfalls die BHS nicht passieren können, nach intravenöser Injektion in Mäusen und Ratten transportieren.^[95,96]

Berücksichtigt man, dass PBCA-NPs auch wenn sie mit Polysorbat 80 beschichtet sind, leicht von Leber, Milz und Lunge abgefangen werden können, könnte eine Langzeitanwendung in diesen Organen toxische Effekte verursachen. Außerdem sind weitere Untersuchungen nötig, um die Wirkung von PBCA-NPs auf das Gehirn zu untersuchen, weil der schnelle Abbau des PBCA-Polymers toxische Bruchstücke freisetzen kann.^[90]

Von den verschiedenen Mechanismen, die die Permeation von Polysorbat-80-beschichteten NPs über die BHS erklären können, scheint die Endozytose der bedeutendste zu sein. Die NPs adsorbieren die Apolipoproteine B und E nach der Injektion aus dem Blut und ahmen so Lipoproteinpartikel nach, die von Endothelzellen der Gehirnkapillaren durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden können.^[97] Dieser Mechanismus wird von Untersuchungen gestützt, nach denen NPs aus humanem Serumalbumin (HSA), die mit Apolipoprotein E (ApoE) gekuppelt waren, nach intravenö-

ser Injektion im Gehirn von Mäusen nachgewiesen werden konnten, nicht jedoch PEGylierte Albumin-NPs.^[98] Weiterhin induzierten Loperamid-beladene HSA-NPs, die über Avidin/Biotin an ApoE3 gekuppelt waren, nach intravenöser Injektion in Mäusen eine antinociceptive Antwort. Im Gegenteil dazu hatten Loperamid-beladene HSA-NPs und freies Loperamid keinen nennenswerten analgetischen Effekt.^[99] Außerdem können HSA-NPs, die kovalent an ApoE3, A-I und B-100 über PEG als Verbindungsgruppe gekuppelt sind, Loperamid ins Mausgehirn transportieren.^[100] In-vitro-Tests ergaben, dass im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 und 2 mg mL⁻¹ weder HSA-NPs noch HSA-NPs-ApoE einen toxischen Effekt auf Endothelzellen des Mäusegehirns haben.^[98]

Kationisches Rinderserumalbumin (CBSA) durchquerte nach Konjugation an PEG-PLA-NPs (CBSA-NPs) die BHS in vivo besser als natives BSA nach Konjugation an PEG-PLA-NPs.^[101] NC-1900 war nach Beladung auf CBSA-NPs 4-mal so stabil im Plasma im Vergleich zu freiem NC-1900. Außerdem verbesserten NC-1900-beladene CBSA-NPs nach intravenöser Injektion in Mäusen signifikant die Gedächtnisleistung, während NC-1900 diesen Effekt nicht auslöste.^[102] Kationisches humanes Serumalbumin (CHSA) transportierte Leu-Enkephalin über die BHS von Mäusen nach intraperitonealer Applikation und löste einen analgetischen Effekt aus, was mit dem Tail-Flick-Test bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu wirkte HSA-Fmoc-Leu-Enkephalin nicht antinociceptiv.^[103] PLA-Polymeren mit niedriger Toxizität werden als sicher für die Anwendung beim Menschen betrachtet. Beim Test der Endothelzellen der Hirnkapillaren (BCECs) mit MTT ergab sich, dass 80 % der Zellen mit 0.1 mg mL⁻¹ CBSA, 1 mg mL⁻¹ CBSA-NPs oder 1.5 mg mL⁻¹ NPs überleben. Demgegenüber sank die Überlebensrate mit 1 mg mL⁻¹ CBSA auf 50 %. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der toxische Effekt, den CBSA auf die Zellen hat, durch die Kupplung an NPs abgemildert wird.^[101]

Poly(D,L-lactid-co-glycolid)-NPs (PLGA-NPs) gelangen nicht ins Mäusegehirn; wenn allerdings trimethyliertes Chitosan (TMC) kovalent an diese NPs gekuppelt wurde, wurden die entstandenen Moleküle (TCM/PLGA-NPs) in dieses Organ aufgenommen. Zudem wurde durch Injektion von Coenzym Q₁₀ (Co-Q₁₀), eingeschlossen in TCM/PLGA-NPs in einem transgenen Mausmodell die Verringerung der Gedächtnisschwäche und die Hemmung der Ablagerung von β-Amyloidfibrillen im Gehirn induziert. Freies Q₁₀ und Q₁₀-beladene PLGA dagegen reduzierten die Gedächtnisschwäche kaum. Weil TMC ein kationisches Polysaccharid ist, schlossen die Autoren, dass es die BHS durch adsorptionsvermittelte Endozytose überquert; allerdings wirken TMC, PLGA-NPs und TMC/PLGA-NPs leicht toxisch auf Zellen, wie in MTT-Tests nachgewiesen wurde.^[104]

Hombach et al.^[105] berichteten, dass MDCK-Zellen nach Behandlung mit Chitosanlösung oder Chitosanpartikeln einen deutlich geringeren transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER, transepithelial electric resistance) im Vergleich zu unbehandelten Zellen aufwiesen. Der reduzierte TEER kann dadurch hervorgerufen werden, dass Chitosanlösung oder -partikel eine Öffnung der Schlussleisten verursachen. Während jedoch Chitosanlösung eine geringe Toxi-

zität gegenüber MDCK-Zellen und geringe Hämolysen verursacht, sind Chitosanpartikel erheblich toxischer.

Injiziert man hohle Chitosan-Polyacrylsäure-NPs (PAA) nach Beladung mit Doxorubicin intravenös in Mäuse, findet man Doxorubicin in verschiedenen Organen einschließlich des Gehirns wieder, während freies Doxorubicin nach intravenöser Injektion nicht ins Gehirn gelangt. Die Behandlung von Zellen mit Chitosankonzentrationen oberhalb von 0.1 mg mL⁻¹ ergab Überlebensraten von ca. 60 %. Demgegenüber hatten Chitosan-PAA-Nanokügelchen keinen toxischen Effekt.^[106]

5.2. Liposomen

Liposomen sind kleine Bläschen aus biokompatiblen und biologisch abbaubaren Phospholipid-Doppelschichten, die ein wässriges Kompartiment einschließen.^[85] Liposomen, die mit dem Chemotherapeutikum Daunorubicin beladen waren, wurden mit Transferrin und gleichzeitig mit *p*-Aminophenyl-α-D-mannopyranosid (MAN) konjugiert, das die BHS mittels GLUT-1 überquert. Transportuntersuchungen an Endothelzellen von Mäusehirnkapillaren (BMVECs, brain microvascular endothelial cells) bestätigten, dass diese Konjugate besser transportiert werden als freies Daunorubicin, Daunorubicin-Liposomen und Daunorubicin-Liposomen nach Kupplung an MAN oder Transferrin. Die intravenöse Applikation bei Ratten, die C6-Gliomazellen trugen, stützten die In-vitro-Ergebnisse, denn die Überlebenszeit der Ratten betrug nach Behandlung mit freiem Daunorubicin 19 Tage und mit Daunorubicin-Liposomen, Daunorubicin-MAN-Liposomen und Daunorubicin-Transferrin-Liposomen 18 Tage; sie unterschied sich damit nicht signifikant. Ratten, die Daunorubicin-Liposomen, die mit MAN und Transferrin konjugiert waren, erhielten, überlebten länger (22 Tage).^[107] Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn man Epirubicin-beladene Liposomen mit Tamoxifen (TAM) und Transferrin (Tf) funktionalisiert. Die Liposomen waren mit Epirubicin, einem möglichen Antitumorwirkstoff, der sich von Doxorubicin ableitet, beladen und mit Tamoxifen und Transferrin konjugiert. TAM wurde in die liposomale Doppelschicht eingebracht, weil man davon ausgeht, dass es den Efflux von Epirubicin aus Gehirn und Gehirntumorzellen verhindert. Liposomen, die mit TAM und Tf modifiziert waren, erwiesen sich als effizientere Carrier von Epirubicin durch die mikrovaskulären Endothelzellen des Rattengehirns (BMEC) im Vergleich zu unmodifizierten Liposomen und Liposomen, die nur mit TAM oder Tf modifiziert waren. Die Ergebnisse aus In-vivo-Untersuchungen stimmten mit denen der In-vitro-Experimente überein: Ratten mit Gliomazellen überlebten nach Applikation von Epirubicin-beladenen Liposomen, die mit TAM und Tf modifiziert waren, länger (23 Tage) als Tiere, die nur TAM- (18 Tage) oder Tf- (19 Tage) modifizierte Epirubicin-Liposomen erhielten. Mit unmodifizierten Liposomen (17 Tage) oder freiem Epirubicin (15 Tage) überlebten die Tiere noch kürzer. Außerdem hatten Epirubicin-beladene, TAM- und Tf-modifizierte Liposomen die stärkste Hemmwirkung auf das Tumorvolumen. Vermutlich erhöht die Liposomenmodifikation mit TAM und Tf nicht nur die

Konzentration von Epirubicin im Gehirn, sondern dirigiert den Wirkstoff auch noch zu den Tumorzellen.^[108]

Die schlechte Permeation des Nervenwachstumsfaktors NGF über die BHS schränkt seine klinische Verwendbarkeit ein. Die Verkapselung mit Liposomen verbesserte seine Fähigkeit, die BHS in einem In-vitro-Modell und in vivo in Ratten zu überwinden. Eine bessere In-vitro- und In-vivo-Permeation konnte erzielt werden, wenn die Liposomen mit RMP-7 chemisch modifiziert oder physikalisch mit dieser Verbindung gemischt wurden. RMP-7, ein Ligand des B₂-Rezeptors in der BHS, ist ein Analogon des endogenen Peptids Bradykinin. Es gibt Hinweise, dass RMP-7 die Aufnahme von Substanzen ins Gehirn verbessert, indem es die Schlussleisten öffnet. Der Ansatz wurde daher als invasiv betrachtet, und die klinischen Phase-III-Studien wurden ausgesetzt. In dieser Untersuchung fanden die Autoren allerdings heraus, dass zwar Liposomen mit NGF, die physikalisch mit RMP-7 gemischt worden waren, nach 14 Tagen in Ratten eine Sterblichkeit von 33% verursacht hatten, dass aber Ratten, denen mit RMP-7 konjugierte NGF-Liposomen verabreicht worden waren, keine erhöhte Sterblichkeit zeigten.^[109]

Die Verkapselung von Topotecan, einer möglichen Antitumor-Verbindung, in Liposomen verbesserte die Permeation über BMVECs nur leicht. Demgegenüber zeigten Topotecan-Liposomen, in deren Lipiddoppelschicht TAM eingebaut war und die mit WGA konjugiert waren, eine verbesserte Permeation über BMVECs als die nichtmodifizierten Liposomen. Nach intravenöser Verabreichung dieser Liposomen in Ratten mit einem Hirntumor verlängerte sich deren Überlebenszeit durch Gabe der TAM- und WAG-modifizierten Liposomen um 6 Tage im Vergleich zu nichtmodifizierten Liposomen. Die Autoren schlossen daraus, dass die verbesserte Freisetzung im Gehirn mit der Efflux-Hemmung in der BHS durch TAM und verbessertem Transport über die BHS durch adsorptionsvermittelte Endocytose mittels WGA zusammenhängt.^[110]

Die schlechte Gehirngängigkeit von freiem Daunomycin, einem Chemotherapeutikum (Abbildung 9E), und von Liposomen hängt mit ihrer schnellen Entfernung aus dem Blut zusammen. Die PEGylierung der Liposomen verlangsamt diese Eliminierung aus dem Plasma deutlich. Dieser Effekt ging jedoch auf Kosten der Aufnahme ins Gehirn. Im Gegensatz dazu verursachte eine Kupplung der PEG-Liposomen mit OX26 eine 5fach höhere Eliminierungsrate aus dem Plasma. Gleichzeitig wiesen diese OX26-konjugierten PEG-Liposomen einen besseren Übergang ins Gehirn auf als freies Daunomycin, Liposomen und PEG-modifizierte Liposomen.^[111]

Prokationische Liposomen (PCLs) sind im Blut stabiler als kationische Liposomen (CLs), weil sie bei physiologischem pH-Wert neutral oder negativ geladen sind; PCLs können allerdings durch Enzyme der BCECs in CLs umgewandelt werden und so die BHS durch adsorptionsvermittelte Endocytose überwinden. Der Permeationskoeffizient von PCLs, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Coumarin-6 beladen waren, durch BCECs war 6.8-mal größer als der von konventionellen Coumarin-6-beladenen Liposomen, während PCLs die Konzentration von Coumarin-6 im Gehirn nach

intravenöser Injektion in Mäusen im Vergleich zu konventionellen Liposomen nicht erhöhten. Um eine bessere Aufnahme von Coumarin-6 ins Gehirn zu erhalten, wurden die PCLs mit Lf modifiziert. Lf-modifizierte PCLs verstärkten die Aufnahme von Coumarin-6 ins Gehirn jedoch nur um den Faktor 2.3, was nicht als effiziente Freisetzung des Wirkstoffs im Gehirn gewertet werden kann. Die Autoren vermuteten, dass der gesteigerte Transport von Lf-modifizierten PCLs ins Gehirn mit dem unidirektionalen Transfer über die Lf-Rezeptoren durch die BHS zusammenhängt; außerdem wurden PCLs, die über Lf in Kontakt mit BCECs gebracht wurden, in positiv geladene Liposomen umgewandelt und durch adsorptionsvermittelte Endocytose aufgenommen. Toxizitätsuntersuchungen mit MTT-Tests ergaben eine über 80%ige Lebensfähigkeit von BCECs, die mit PCLs oder Lf-PCLs mit einer Gesamtlipidkonzentration im Bereich von 40 bis 320 µM behandelt wurden. Diese Lebensfähigkeit lag deutlich höher als bei CLs.^[112]

Man geht davon aus, dass die BHS für phagocytotische Zellen des Immunsystems wie Monocyten und Neutrophile permeabel ist. Daher sind diese phagocytotischen Zellen Kandidaten für Carrier für die Wirkstofffreisetzung im Gehirn. Da die Liposomen von diesen Zellen im Blutkreislauf erkannt und phagocytiert werden, kann der entsprechende Wirkstoff in Liposomen eingekapselt werden. Er muss dann jedoch im Lysosom der phagocytierenden Zellen stabil sein, damit er freigesetzt werden kann, wenn sich die Zelle im Gehirn befindet. Serotonin (5-Hydroxytryptamin) ist ein Neurotransmitter, der nicht zum Gehirn durchdringt. Wenn Serotonin in Liposomen eingeschlossen wurde, war seine Konzentration im Gehirn doppelt so hoch wie die des freien Wirkstoffs in Lösung nach intravenöser Injektion in Ratten. Die Inkubation von Liposomen mit humanen Monocyten und Neutrophilen führte zur Akkumulation von Liposomen in diesen Zellen; Liposomen wurden auch in zirkulierenden Monocyten und Neutrophilen im Blut nach intravenöser Injektion in Kaninchen nachgewiesen. Die intravenöse Injektion von Alendronat-Liposomen in Kaninchen erhöhte die Zahl der Neutrophilen und eliminierte die zirkulierenden Monocyten, weshalb es in der Folge zu einer Hemmung der Aufnahme ins Gehirn kam. Die Autoren folgerten daraus, dass die Zunahme der Serotoninaufnahme ins Gehirn an den Liposomentransport hauptsächlich durch Monocyten gebunden ist. Da die Aufnahme von Serotonin nur verdoppelt wird, ist der klinische Wert dieses Ansatzes begrenzt. Über einen gesteigerten Transport von Immunzellen durch die BHS bei verschiedenen Gehirnerkrankungen wie Multipler Sklerose und Alzheimer-Demenz wurde berichtet. Daher könnten Monocyten und Neutrophile bei gehirnassoziierten Entzündungserkrankungen effizienter sein.^[113] Ferulasäure (FA, 4-Hydroxy-3-methoxyimtsäure) ist eine wichtige aktive Komponente traditioneller chinesischer Medizin, die für die Behandlung neurovaskulärer und kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt wurde. Die Verwendung für Gehirnerkrankungen scheitert jedoch an der schlechten Aufnahme der Verbindung ins Gehirn. Die intravenöse Injektion von FA-beladenen Liposomen in Ratten mit Gehirnentzündung steigerte die Aufnahme auf das Doppelte im Vergleich zur Applikation freier gelöster FA. Gleichzeitig stieg auch die

Konzentration von FA in Leber und Milz signifikant an. Wenn FA-beladene Liposomen mit RGD (dem Tripeptid Arg-Gly-Asp) beschichtet wurden, nahm die FA-Konzentration im Gehirn auf das 3- und 6fache gegenüber unbeschichteten FA-beladenen Liposomen und FA-Lösung zu. Während andererseits die FA-Konzentration in Leber und Milz im Vergleich zu unbeschichteten Liposomen abnahm, war sie noch immer höher als bei Verwendung von FA-Lösung. Außerdem zeigten In-vitro-Untersuchungen eine bessere Aufnahme RGD-beschichteter Liposomen durch Monocyten und Neutrophile. Dies weist darauf hin, dass RGD-beschichtete und unbeschichtete Liposomen, beladen mit FA, durch diese phagocytotischen Zellen im Gehirn freigesetzt werden. Die bessere Aufnahme von FA, wenn sie in RGD-beschichtete Liposomen verpackt wurde, lässt sich darauf zurückführen, dass das RGD-Peptid ein Substrat für Rezeptoren ist, die sich auf Monocyten und Neutrophilen befinden und so die Endozytose von RGD-beschichteten Liposomen durch die genannten Zellen erleichtert.^[114]

Da ein einzelnes Liposom >10000 Wirkstoffmoleküle tragen kann, erhöht der Einsatz solcher Vesikel, die an spezifische Transporter gekuppelt sind, die Kapazität dieser Transporter um bis zu vier Größenordnungen. Andererseits können Liposomenpräparationen die eingeschlossenen Verbindungen wieder verlieren, sodass sie nur kurz nach der Herstellung eingesetzt werden sollten. Wenn inzwischen auch schon einige Liposomen-Formulierungen von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen wurden, zielt doch keine von ihnen auf das Gehirn.^[86,111,115]

6. Peptidvektor-vermittelte Strategie

Der andere Ansatz zur Freisetzung von Neuropharmaka ist der Einsatz kleiner Peptide, die Zellmembranen effizient durchqueren, z.B. Pegelin und Penetratin mit 18 bzw. 16 Aminosäuren. SynB1 und Pegelin (RGGRRLSYSRRRFSTSTGR; Molmasse 2099 Da) leiten sich von natürlichen Peptiden, den Protegrinen, ab. Sie haben eine amphipathische Struktur, bei der die positiv geladenen und die hydrophoben Reste in der Sequenz voneinander getrennt vorliegen. Ersetzt man die vier Cysteinreste durch Serinreste, erhält man lineare Peptide (Pegelin). Penetratinpeptide [wie D-Penetratin (rqi-kiwfqnrrmkwkk), Molmasse 2245 Da] leiten sich von dem Transkriptionsfaktor Antennapedia ab. Das Potenzial dieses Ansatzes als effizientes Transportsystem, um Wirkstoffe über die BHS zu bringen, wurde in Tiermodellen gezeigt.^[29]

Rousselle et al.^[29] setzten SynB1 und D-Penetratin zum Wirkstofftransport ins Gehirn ein. Als Modellsystem koppelten sie den Antitumorwirkstoff Doxorubicin über eine chemische Verbindungsgruppe an diese Peptide (Abbildung 10A und B) und untersuchten seine Fähigkeit, die BHS zu überqueren, mit der In-situ-Perfusionstechnik am Rattengehirn. Die Aufnahme von Doxorubicin ins Gehirn ist normalerweise sehr gering wegen des effizienten Effluxes durch die P-Glycoproteinpumpe (P-gp) in der BHS. Die Bindung von Doxorubicin an einen Vektor steigerte die ins Gehirnparenchym transportierte Menge auf das 20fache. Solche Vektoren sind nicht-invasiv, weil keine Öffnung der

Schlussleisten beobachtet wird. Die Steigerung der Substanzaufnahme ins Gehirn wurde auch nach intravenöse Injektion bei Mäusen beobachtet. Außerdem reichert sich freies Doxorubicin stärker in Geweben wie Herz, Lunge, Nieren als im Gehirn an, was verschiedene Nebenwirkungen hervorrufen kann. Vektorgebundenes Doxorubicin dagegen wies langsamere Aufnahme in diese Gewebe im Vergleich zum Gehirn auf, was folglich die Nebenwirkungen dieser Substanz mildern könnte.

Die Kapazität von SynB1, das Antibiotikum Benzylpenicillin (B-Pc) im Gehirn freizusetzen, wurde mit der In-situ-Gehirnperfusion am Rattenhirn evaluiert. Die Effizienz von β-Lactam-Antibiotika zur Behandlung von Gehirninfektionen ist wegen der schlechten Permeation über die BHS gering. Die Aufnahme von B-Pc ins Gehirn wurde durch die Kupplung an den SynB1-Vektor über eine Glycolamidester-Verbindungsgruppe stark verbessert (Abbildung 10C). Dies zeigt die Effizienz von SynB1 als potenzieller Transporter für Wirkstoffe ins Gehirn.^[116]

Mit der In-situ-Perfusion des Rattengehirns wurde nachgewiesen, dass Dalargin nur schlecht vom Gehirn aufgenommen wird; wenn die Substanz allerdings an SynB1 oder SynB3 (RRLSYSRRRF, Molmasse 1395 Da) über eine Disulfid-Brücke gebunden wurde (Abbildung 10D), verbesserte sich die Aufnahme spürbar. Der analgetische Effekt wurde mit dem Hot-Plate-Test und anschließender Verabreichung von freiem oder vektorgebundenem Dalargin überprüft. Während im ersten Fall nur geringe analgetische Aktivität sichtbar wurde, führte die Konjugation von Dalargin an SynB1 und SynB3 zu einer deutlichen Zunahme der analgetischen Aktivität sofort nach der intravenösen Injektion.^[117]

M6G, ein aktiver Metabolit von Morphin, hat bei intracerebroventrikulärer Injektion eine 100fach höhere analgetische Wirkung als Morphin. Da es jedoch schlechter als Morphin die Blut-Hirn-Schranke passiert, ist die schmerzlindernde Wirkung nach systemischer Gabe mit derjenigen von Morphin vergleichbar. Temsamani et al.^[118] zeigten mit In-situ-Hirnperfusion an der Ratte, dass die Konjugation von M6G an SynB3 über eine Disulfid-Brücke die Aufnahme von M6G ins Gehirn signifikant steigerte. Die Konjugation verbesserte auch die analgetische Aktivität von M6G, wie sich mit dem Tail-Flick- und dem Hot-Plate-Test zeigen ließ und bestätigte so die verstärkte Aufnahme von vektorgebundenem M6G ins Gehirn. Nimmt man an, dass konjugiertes M6G in vitro eine höhere Affinität zu den μ-Rezeptoren hat als freies M6G, braucht dieses nicht aus dem Konjugat freigesetzt zu werden, um — im Gehirn angelangt — die pharmakologische Aktivität zu entfalten.

Das Chemotherapeutikum Paclitaxel (PAX) ist zur Behandlung verschiedener Krebsarten verwendet worden, darunter malignes Gliom und Hirnmetastasen. PAX passiert allerdings die BHS nur schlecht, wahrscheinlich, weil es ein Substrat für die P-gp ist. Sein Nutzen für die Behandlung von Hirntumoren ist daher begrenzt. Um die Aufnahme von PAX ins Gehirn zu verbessern, koppelten Blanc et al.^[30] die Verbindung an SynB3 über eine Succinat-Brücke (Abbildung 10E) und untersuchten die Aufnahme ins Gehirn mit In-situ-Perfusion des Mäusegehirns. Die Freisetzung von konjugiertem PAX lag 27-mal höher verglichen mit freiem

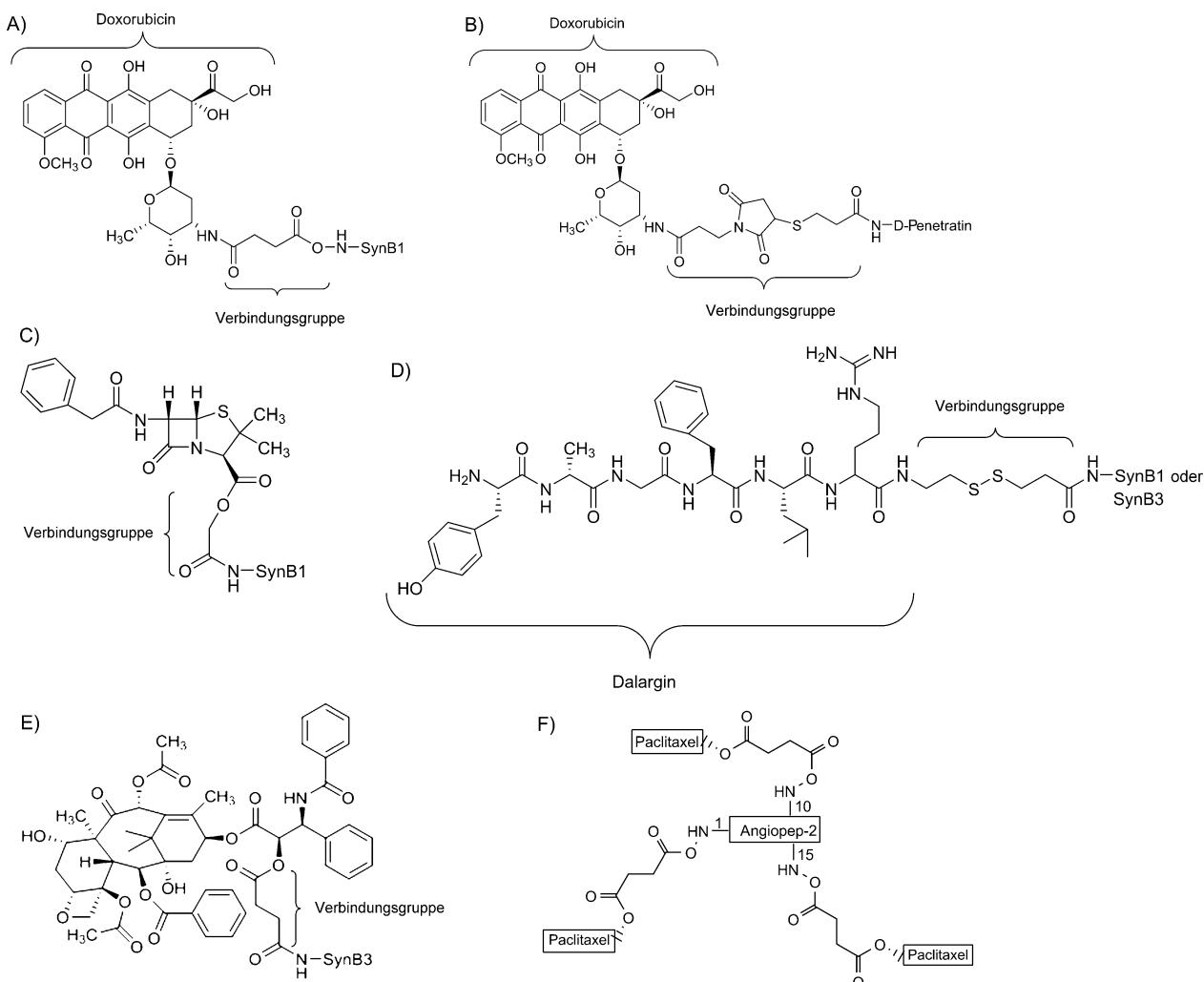


Abbildung 10. Chemische Struktur von Wirkstoffen oder Shuttle-Wirkstoff-Konstrukten für eine Peptidvektor-vermittelte Strategie.

PAX, und konjugiertes PAX erlangte *in vitro* auch die Cytotoxizität von PAX. Das Konjugat umging die P-gp-Pumpe, was die höhere Konzentration im Gehirn erklärt. PAX wird mit einem Hilfsstoff (Cremophor EL) verabreicht, um die Wasserlöslichkeit zu verbessern. Die Kupplung von PAX mit SynB3 verbesserte die Löslichkeit ebenfalls um mehr als das 1000fache. Das kann den Lösungsvermittler überflüssig machen und die Nebenwirkungen von PAX vermindern. Der Mechanismus, nach dem die vektorgebundenen B-Pc, PAX, M6G und Dalargin zum Gehirn durchdringen, ist noch unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass vektorgebundenes Doxorubicin mit SynB1 und SynB3 das Organ über einen Weg erreichen, an dem auch adsorptionsvermittelte Endozytose beteiligt ist.^[119]

Ein 11 Aminosäuren langes Peptid aus dem HIV-transaktivierenden Transkriptor-Protein (TAT) (als TAT-Peptid bezeichnet) wurde an die 116 kD große β-Galactosidase (β-Gal) fusioniert. Nach intraperitonealer Injektion des TAT-β-Gal-Fusionsproteins in Mäusen konnte man in Geweben wie Leber, Niere, Herz, Lunge und Gehirn starke β-Gal-Aktivität nachweisen, während man im Gehirn keine Aktivität fand, wenn β-Gal alleine injiziert worden war. Diese Ergebnisse

demonstrieren die Fähigkeit des TAT-Peptids, β-Gal ins Gehirn zu dirigieren, ohne die Integrität der BHS zu beeinträchtigen.^[120] Ritonavir ist eine der Verbindungen, die von der FDA zur Behandlung einer HIV-Infektion zugelassen wurden. Ritonavir wird allerdings von der P-gp-Pumpe erkannt, sodass es nicht ins Gehirn gelangt. Durch Einkapseln von Ritonavir entweder in Poly(L-lactid)-NPs oder in TAT-konjugierte NPs wurde die Effluxwirkung von P-gp umgangen und die Permeabilität in MDCK-MDR1- und MDCK-Wildtyp-Zelllinien gesteigert. Nach zweiwöchiger Ritonavir-Behandlung hatten die Mäuse eine 800fach höhere Konzentration der Substanz im Gehirn, wenn die Applikation als TAT-konjugierte NPs erfolgte, als wenn freies Ritonavir verabreicht wurde, und eine 7fach höhere Konzentration verglichen mit unkonjugierten NPs. TAT-konjugierte NPs überwinden nicht nur die BHS, sondern verstärken auch die Aufnahme und unterstützen die Zurückhaltung der Verbindung im ZNS. All diese Eigenschaften sind von großer Bedeutung für die therapeutische Wirksamkeit antiretroviraler Wirkstoffe.^[36]

Poly(D,L-lactid-co-glycolid)(PLGA)-NPs können die BHS nicht überwinden; konjugiert man sie allerdings mit dem

glycosylierten Heptapeptid H₂N-Gly-L-Phe-D-Thr-Gly-L-Phe-L-Leu-L-Ser(O-β-D-Glucose)-CONH₂ (g7), können sie in Ratten die BHS passieren.^[121] In einer Untersuchung wurden g7-NPs mit Loperamid beladen, um ihre Kapazität als Wirkstoffüberträger ins ZNS festzustellen. Untersuchungen zur Schmerzdämpfung mit dem Hot-Plate-Test ergaben, dass die intravenöse Injektion Loperamid-beladener g7-NPs in Ratten eine analgetische Wirkung auslöste aufgrund der ZNS-Opioid-Aktivität, die über Loperamid vermittelt wurde. Die Autoren folgerten, dass dieser Wirkstoff, einmal in NPs eingebettet, über die Blut-Hirn-Schranke geschleust und dann von den Partikeln freigesetzt wird. Im Gegensatz dazu waren Kontrollgruppen, darunter Loperamid-Lösung oder g7-NPs, unwirksam. Die Autoren spekulierten über einen adsorptionsvermittelten Endocytosemechanismus, der die Überwindung der BHS durch g7-NPs erklärt. Dazu bestätigten auch Verteilungsstudien mit Rhodamin-123-beladenen g7-NPs die Lokalisierung von g7-NPs im ZNS.^[122,123]

Aprotinin, ein 6500 Da großes Protein, überwindet die BHS noch besser als Transferrin. Mit der In-situ-Hirnperfusion fanden Demeule et al.^[124] heraus, dass ein Peptid mit 19 Aminosäuren, Angiopep-2, das aus der Kunitz-Domäne von Aprotinin abgeleitet ist, das Gehirn besser penetriert als Aprotinin. Die Autoren schlossen daraus, dass Angiopep-2 die BHS durch receptorvermittelte Endocytose überwindet. Als Nächstes testeten sie die Fähigkeit des Peptids, Wirkstoffe ins Gehirn zu schleusen. PAX wurde an das Peptid konjugiert (Abbildung 10F; unter der Bezeichnung ANG1005), und seine Aufnahme ins Gehirn wurde mit In-situ-Gehirnperfusion gemessen. Die Aufnahme von ANG1005 war 5-mal größer als die von freiem PAX. Geht man davon aus, dass jedes Molekül ANG1005 drei Moleküle PAX trägt, kann die Aufnahme von PAX bis auf das 15fache ansteigen. Das Konjugat umgeht auch P-gp in der BHS, ist hinreichend toxisch gegenüber der Glioma-Zelllinie im Vergleich zu freiem PAX und verlängert die Überlebenszeit von Mäusen mit intracerebralen Tumoren.^[125] In einer anderen Untersuchung von Thomas et al.^[126] mit der In-situ-Gehirnperfusion bei Ratten ergab sich, dass der Übergang von ANG1005 im Gehirn 10-mal höher war als der von freiem PAX. Die Penetration von Doxorubicin und dem Antitumorwirkstoff Etoposid ins Gehirn von Mäusen wurde durch Konjugation mit Angiopep-2 verdoppelt bzw. auf das 13fache angehoben. Die Konjugate wurden nicht durch P-gp wieder herausgepumpt, wiesen aber in vitro eine ähnliche Cytotoxizität auf wie unkonjugiertes Doxorubicin und Etoposid.^[127]

Eine Einschränkung für den Gebrauch von Peptiden als Träger für Wirkstoffe ist die Instabilität im Blut. Außerdem überqueren die oben besprochenen Peptide die BHS wahrscheinlich über adsorptionsvermittelte Endocytose. Dieser Transportweg kann aber gesättigt werden. Um diese Hürden zu überwinden, könnte eine Option sein, stabile N-methylierte Peptide zu verwenden, die das Gehirn über nicht sättigbare passive Diffusion erreichen und so niedermolekulare Substanzen einschleusen können. Giralt fand mit seiner Arbeitsgruppe vor kurzem heraus, dass kleine cyclische N-methylierte und N-MePhe-reiche Peptide niedermolekulare Wirkstoffe wie Dopamin, Baicalin, Levodopa, Nip, GABA oder 5-Aminolävulinsäure (ALA) in In-vitro-BHS-Modellen

wie PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) und BBMECs (bovine brain microvessel endothelial cells) übertragen können. Die untersuchten Wirkstoffe decken eine große strukturelle Vielfalt ab, darunter lineare, cyclische und aromatische Verbindungen. Die Wirkstoffe, die für bestimmte Hirnerkrankungen gedacht sind, können kaum alleine die BHS überwinden. Während sie alleine die PAMPA-Barriere nicht penetrieren, können sie von den erwähnten Peptiden über diese künstliche Membran und auch durch BBMECs geschleust werden.^[128–130]

7. Zusammenfassung und Ausblick

Wirkstoffe, die in Suchprogrammen für ZNS-wirksame Substanzen gefunden wurden, müssen einige Hürden überwinden, um effizient gegen Gehirnerkrankungen zu sein. Sie dürfen nur langsam verstoffwechselt werden und nur wenig an Plasmaproteine binden, sie müssen die BHS überqueren, um ihren Wirkort zu erreichen (BHS-Permeation) und sich genügend im Gehirn als freie (ungebundene) Komponenten verteilen. Um solche Substanzen daher in wirksame und effiziente Therapeutika umzuwandeln, ist ein geeigneter Ansatz zur Freisetzung von Wirkstoffen im Gehirn notwendig. In diesem Aufsatz haben wir eine Reihe von Strategien beschrieben, mit denen die BHS-Permeation wirksamer Substanzen erhöht werden soll. Der schleuservermittelte Transport ist neben anderen ein interessanter und vielversprechender Ansatz, der viel Aufmerksamkeit erregt hat und der für verschiedene Substanzen evaluiert wurde. Die Schleusermoleküle sind Verbindungen, die die BHS durchdringen und dabei Wirkstoffe mit ins Gehirn nehmen können. Der Ansatz kann nach dem Typ des Schleusermoleküls in verschiedene Gruppen unterteilt werden: 1) chemische Freisetzungssysteme: Dihydropyridin und seine Derivate können für die selektive Freisetzung von Wirkstoffen im Gehirn genutzt werden; 2) Carrier-vermittelter Transport: die Substrate für die Carrier auf der BHS (wie beispielsweise Transporter für große natürliche Aminosäuren oder Glucose) können die Wirkstoffe durch die BHS schleusen; 3) molekulare Trojansche Pferde: endogene Verbindungen wie Antikörper oder Proteine, die Liganden für Rezeptoren auf der BHS sind und die großen Moleküle ins Gehirn transportieren können; 4) Nanopartikel-Vektoren: Nanopartikel, die eine große Zahl von Molekülen tragen können und die sie langsam und über eine lange Zeit freisetzen können; 5) Liposomen: in Kombination mit einigen spezifischen BHS-Transportern können sie ein System mit hoher Transportkapazität bilden; 6) Peptidschleuservermittelter Transport: viele Peptide gelangen ins Gehirn und können daher als neue und vielversprechende Schleusen angesehen werden.

Der Einsatz von Schleusermolekülen kann eine geeignete Lösung für das Problem der Blut-Hirn-Schranke bieten. Wenn man hier neue Methoden entwickelt, muss besonderes Augenmerk auf die Verbindung zwischen Wirkstoff und Schleusermolekül gelegt werden. Einmal im Gehirn angekommen, müssen die trägegebundenen Wirkstoffe freigesetzt werden, um die biologische Aktivität zu entfalten. Die Bindung muss daher im Blutkreislauf stabil und im Gehirn

spaltbar sein. Außerdem müssen die Wirkstoffe nach der Spaltung ihre Affinität für die Zielrezeptoren zurückgewinnen. In manchen Fällen können die Konjugate aus Träger und Wirkstoff aber auch noch Substrate für die Zielrezeptoren sein, sodass eine Freisetzung aus dem Konjugat nicht notwendig ist.^[118]

Fast alle Strategien, die in diesem Aufsatz diskutiert wurden, sind nicht spezifisch für das Gehirn, sondern können Substanzen auch in peripheren Geweben freisetzen; diese können dort toxisch sein und Nebenwirkungen auslösen. Um hier mögliche Probleme zu vermeiden, wird ein geeigneter Ansatz für die selektive Freisetzung benötigt.

Es besteht zwar ein dringender Bedarf für ZNS-Wirkstoffe, es sind aber nur wenige wirksame Substanzen kommerziell verfügbar. Um einen wachsenden Markt mit neuen ZNS-Therapeutika zu versorgen, sollten zusätzliche Anstrengungen unternommen werden, die auf Freisetzung und Verteilung von Substanzen in den Gehirnkompartimenten gerichtet sind.

Abkürzungen

AA	Ascorbinsäure
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom
Apo	Apolipoprotein
AZT	Zidovudin
BCEC	Endothelzelle der Gehirnkapillaren
BCSFB	Blut-Zerebrospinalflüssigkeits-Barriere
BDNF	gehirnstämmiger neurotropher Faktor
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
β-Gal	β-Galactosidase
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMVEC	mikrovaskuläre Endothelzelle des Gehirns
B-Pc	Benzylpenicillin
CBSA	kationisches Rinderserumalbumin
CDS	chemisches Freisetzungssystem
CL	kationisches Liposom
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FA	Ferulasäure
FDA	Food and Drug Administration
FUS	fokussierter Ultraschall
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDNF	gliastämmiger neurotropher Faktor
GLUT-1	Glucosetransporter
GSH	Glutathion
HIR	humaner Insulinrezeptor
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HAS	humanes Serumalbumin
ICF	Interzellulärflüssigkeit
IDUA	α-L-Iduronidase
LAT1	Transporter für große natürliche Aminosäuren
Lf	Lactoferrin
LNCs	Lipid-Nanokapseln
MAb	monoklonaler Antikörper
MAN	p-Aminophenyl-α-D-mannopyranosid
MDCK	Madin-Darby-Hundenierenzellen

M6G	ein aktiver Morphinmetabolit
MNP	magnetisches Nanopartikel
MT	magnetische Zielsteuerung
NGF	Nervenwachstumsfaktor
Nip	Nipecotinsäure
NP	Nanopartikel
PAX	Paclitaxel
PBCA	Poly(<i>n</i> -butylcyanoaryl)
PCL	prokationisches Liposom
P-pg	P-Glycoprotein
QD	Quantenpunkt
TAM	Tamoxifen
TAT	transaktivierender Transkriptor
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TMC	trimethyliertes Chitosan
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
WGA	Weizenkeimagglutinin
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch MCINN-FEDER (Bio2008-00799), das Generalitat de Catalunya (XRB and 2009SGR-1005) und CONSOLIDER-INGENIO 2010 unterstützt. Wir danken Tanya Yates für Hilfe mit dem Manuskript.

Eingegangen am 19. Oktober 2010,
veränderte Fassung am 17. Januar 2011
Online veröffentlicht am 30. Juni 2011
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] K. A. Witt, T. J. Gillespie, J. D. Huber, R. D. Eggleton, T. P. Davis, *Peptides* **2001**, 22, 2329.
- [2] M. S. Alavijeh, M. Chishty, M. Z. Qaiser, A. M. Palmer, *NeuroRx* **2005**, 2, 554.
- [3] R. D. Eggleton, T. P. Davis, *Peptides* **1997**, 18, 1431.
- [4] J. F. Deeken, W. Loscher, *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 1663.
- [5] W. M. Pardridge, *Pharm. Sci. Technol. Today* **1999**, 2, 49.
- [6] A. G. de Boer, P. J. Gaillard, *Clin. Pharmacokinet.* **2007**, 46, 553.
- [7] H. Kusuhara, Y. Sugiyama, *Drug Discovery Today* **2001**, 6, 150.
- [8] E. H. Kerns, L. Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, Elsevier, Amsterdam, **2008**, S. 122–128.
- [9] M. Hammarlund-Udenaes, M. Friden, S. Syvanen, A. Gupta, *Pharm. Res.* **2008**, 25, 1737.
- [10] J. Temsamani, J. M. Scherrmann, A. R. Rees, M. Kaczorek, *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, 3, 155.
- [11] J. M. Scherrmann, *Vasc. Pharmacol.* **2002**, 38, 349.
- [12] N. J. Abbott, I. A. Romero, *Mol. Med.* **1996**, 2, 106.
- [13] W. M. Pardridge, *Drug Discovery Today* **2007**, 12, 54.
- [14] R. S. Dhanikula, A. Argaw, J. Bouchard, P. Hildgen, *Mol. Pharm.* **2008**, 5, 105.
- [15] P. Blasi, S. Giovagnoli, A. Schoubben, M. Ricci, C. Rossi, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 454.
- [16] W. M. Pardridge, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 494.
- [17] D. J. Begley, *Curr. Pharm. Des.* **2004**, 10, 1295.
- [18] M. Hubensack, C. Müller, P. Höcherl, S. Fellner, T. Spruss, G. Bernhardt, A. Buschauer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2008**, 134, 597.

- [19] B. D. Anderson, M. J. May, S. Jordan, L. Song, M. J. Roberts, M. Leggas, *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 653.
- [20] H. Liu, M. Hua, P. Chen, P. Chu, C. Pan, H. Yang, C. Huang, J. Wang, T. Yen, K. Wei, *Radiology* **2010**, *255*, 415.
- [21] F. Wang, Y. Cheng, J. Mei, Y. Song, Y. Yang, Y. Liu, Z. Wang, *J. Ultrasound Med.* **2009**, *28*, 1501.
- [22] K. Hynynen, N. McDannold, N. A. Sheikov, F. A. Jolesz, N. Vykhodtseva, *NeuroImage* **2005**, *24*, 12.
- [23] P. Stepp, F. Thomas, P. R. Lockman, H. Chen, A. J. Rosengart, *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1591.
- [24] B. Wilson, M. K. Samanta, K. Santhi, K. P. S. Kumar, M. Ramasamy, B. Suresh, *J. Neurosci. Methods* **2009**, *177*, 427.
- [25] H. Liu, M. Hua, H. Yang, C. Huang, P. Chu, J. Wu, I. Tseng, J. Wang, T. Yen, P. Chen, K. Wei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15205.
- [26] A. Rice, Y. Liu, M. L. Michaelis, R. H. Himes, G. I. Georg, K. L. Audus, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 832.
- [27] L. Nieto, A. Mascaraque, F. Miller, F. Glacial, C. R. Martinez, M. Kaiser, R. Brun, C. Dardonville, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 485.
- [28] J. Temsamani, P. Vidal, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 1012.
- [29] C. Rousselle, P. Clair, J. M. Lefauconnier, M. Kaczorek, J. M. Scherrmann, J. Temsamani, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 679.
- [30] E. Blanc, C. Bonnafous, P. Merida, S. Cistenino, P. Clair, J. M. Scherrmann, J. Temsamani, *Anti-Cancer Drugs* **2004**, *15*, 947.
- [31] L. Prokai, K. Prokai-Tatrai, N. Bodor, *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 367.
- [32] N. Bodor, H. H. Farag, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 528.
- [33] J. W. Simpkins, N. Bodor, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1994**, *14*, 243.
- [34] W. A. Banks, V. Akerstrom, A. J. Kastin, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 533.
- [35] W. A. Banks, A. J. Kastin, V. Akerstrom, *Life Sci.* **1997**, *61*, 119.
- [36] K. S. Rao, M. K. Reddy, J. L. Horning, V. Labhsetwar, *Biomaterials* **2008**, *29*, 4429.
- [37] W. M. Pardridge, *Arch. Neurol.* **2002**, *59*, 35.
- [38] M. E. Brewster, W. R. Anderson, A. I. Webb, L. M. Pablo, D. Meinsma, D. Moreno, H. Derendorf, N. Bodor, E. Pop, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 122.
- [39] L. Prokai, K. Prokai-Tatrai, X. Ouyang, H. S. Kim, W. M. Wu, A. Zharikova, N. Bodor, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4563.
- [40] K. Prokai-Tatrai, L. Prokai, N. Bodor, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4775.
- [41] P. Chen, N. Bodor, W. M. Wu, L. Prokai, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3773.
- [42] M. E. Brewster, K. S. Estes, N. Bodor, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 244.
- [43] W. R. Anderson, J. W. Simpkins, P. A. Woodard, D. Winwood, W. C. Stern, N. Bodor, *Psychopharmacology* **1987**, *92*, 157.
- [44] L. Foucout, F. Gouraud, M. Dhilly, P. Bohn, G. Dupas, J. Costenini, A. Abbas, F. Marsais, L. Barre, V. Levacher, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3666.
- [45] M. Sheha, A. Al-Tayeb, H. El-Sherif, H. Farag, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1865.
- [46] V. Carelli, F. Liberatore, L. Scipione, M. Impicciatore, E. Barocelli, M. Cardellini, G. Giorgioni, *J. Controlled Release* **1996**, *42*, 209.
- [47] F. Gouraud, G. Mercey, M. Ibazizene, O. Tirel, J. Henry, V. Levacher, C. Perrio, L. Barre, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1281.
- [48] S. Manfredini, B. Pavan, S. Vertuani, M. Scaglianti, D. Compagnone, C. Biondi, A. Scatturin, S. Tanganelli, L. Ferraro, P. Prasad, A. Dalpiaz, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 559.
- [49] F. P. Bonina, L. Arenare, F. Palagiano, A. Sajja, F. Nava, D. Trombetta, P. Caprariis, *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 561.
- [50] M. Gynther, K. Laine, J. Ropponen, J. Leppanen, A. Mannila, T. Nevalainen, J. Savolainen, T. Jarvinen, J. Rautio, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 932.
- [51] M. Gynther, J. Ropponen, K. Laine, J. Leppanen, P. Haapakoski, L. Peura, T. Jarvinen, J. Rautio, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3348.
- [52] R. D. Eglington, S. A. Mitchell, J. D. Huber, M. M. Palian, T. P. Davis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 967.
- [53] R. D. Eglington, S. A. Mitchell, J. D. Huber, J. Janders, D. Stropova, R. Polt, H. I. Yamamura, V. J. Hruby, T. P. Davis, *Brain Res.* **2000**, *881*, 37.
- [54] R. Tomatis, M. Marastoni, G. Balboni, R. Guerrini, A. Capasso, L. Sorrentino, V. Santagada, G. Caliendo, L. H. Lazarus, S. Salvadori, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2948.
- [55] L. Negri, R. Lattanzi, F. Tabacco, L. Orru, C. Severini, B. Scolaro, R. Rocchi, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 400.
- [56] R. Polt, F. Porreca, L. Z. Szabo, E. J. Bilsky, P. Davis, T. J. Abbruscato, T. P. Davis, R. Horvath, H. I. Yamamura, V. J. Hruby, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7114.
- [57] F. Pinnen, I. Cacciatore, C. Cornacchia, P. Sozio, A. Iannitelli, M. Costa, L. Pecci, C. Nasuti, F. Cantalamessa, A. Di Stefano, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2506.
- [58] S. S. More, R. Vince, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4581.
- [59] U. Bickel, T. Yoshikawa, E. M. Landaw, K. F. Faull, W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2618.
- [60] W. M. Pardridge, D. Wu, T. Sakan, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 576.
- [61] D. Wu, W. M. Pardridge, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 77.
- [62] D. Wu, B. W. Song, H. V. Vinters, W. M. Pardridge, *J. Drug Targeting* **2002**, *10*, 239.
- [63] Z. Pang, W. Lu, H. Gao, K. Hu, J. Chen, C. Zhang, X. Gao, X. Jiang, C. Zhu, *J. Controlled Release* **2008**, *128*, 120.
- [64] Y. Deguchi, A. Kurihara, W. M. Pardridge, *Bioconjugate chem.* **1999**, *10*, 32.
- [65] A. Kurihara, Y. Deguchi, W. M. Pardridge, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 502.
- [66] D. Wu, W. M. Pardridge, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 1804.
- [67] Y. Saito, J. Buciak, J. Yang, W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10227.
- [68] W. M. Pardridge, R. J. Boado, Y. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5592.
- [69] Y. Aktas, M. Yemisci, K. Andrieux, R. N. Gursoy, M. J. Alonso, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quiñoa, R. Rigueria, M. F. Sargon, H. H. Celik, A. S. Demir, A. A. Hmcal, T. Dalkara, Y. Capan, P. Couvreur, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1503.
- [70] A. Béduneau, F. Hindré, A. Clavreul, J. C. Leroux, P. Saulnier, J. P. Benoit, *J. Controlled Release* **2008**, *126*, 44.
- [71] K. Ulbrich, T. Hekmatara, E. Herbert, J. Kreuter, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 251.
- [72] R. M. Nitsch, C. Hock, *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 415.
- [73] S. Yue, Y. Li, X. Wang, H. Bai, J. Xia, L. Jiang, Y. Ji, L. Fan, Z. He, Q. Chen, *Life Sci.* **2008**, *82*, 1249.
- [74] R. J. Boado, Y. Zhang, Y. Wang, W. M. Pardridge, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1251.
- [75] R. J. Boado, Q. H. Zhou, J. Z. Lu, E. K. W. Hui, W. M. Pardridge, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 237.
- [76] Q. H. Zhou, R. J. Boado, J. Z. Lu, E. K. W. Hui, W. M. Pardridge, *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 566.
- [77] R. J. Boado, Y. Zhang, Y. Zhang, Y. W. M. Pardridge, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 1376.
- [78] R. J. Boado, Y. Zhang, Y. Zhang, Y. C. Xia, W. Wang, W. M. Pardridge, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 475.
- [79] R. J. Boado, Y. Zhang, Y. Zhang, C. F. Xia, W. M. Pardridge, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 447.
- [80] E. K. Hui, R. J. Boado, W. M. Pardridge, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1536.
- [81] R. J. Boado, E. K. Hui, J. Z. Lua, Q. H. Zhou, W. M. Pardridge, *J. Biotechnol.* **2010**, *146*, 84.
- [82] X. Gao, J. Chen, J. Chen, B. Wu, H. Chen, X. Jiang, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2189.

- [83] G. Xu, K. T. Yong, I. Roy, S. D. Mahajan, H. Ding, S. A. Schwartz, P. N. Prasad, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1179.
- [84] K. Hu, J. Li, Y. Shen, W. Lu, X. Gao, Q. Zhang, X. Jiang, *J. Controlled Release* **2009**, *134*, 55.
- [85] E. Garcia-Garcia, K. Andrieux, S. Gil, P. Couvreur, *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 274.
- [86] L. Costantino, G. Tosi, B. Ruozi, L. Bondioli, M. A. Vandelli, F. Forni, *Prog. Brain Res.* **2009**, *180*, 35.
- [87] B. Wilson, M. K. Samanta, K. Santhi, K. P. S. Kumar, N. Paramakrishnan, S. Suresh, *Brain Res.* **2008**, *1200*, 159.
- [88] U. Schroeder, H. Schroeder, B. A. Sabel, *Life Sci.* **2000**, *66*, 495.
- [89] J. Kreuter, R. N. Alyautdin, D. A. Kharkevich, A. A. Ivanov, *Brain Res.* **1995**, *674*, 171.
- [90] J. C. Olivier, L. Fenart, R. Chauvet, C. Pariat, R. Cecchelli, W. Couet, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1836.
- [91] J. Kreuter, P. Ramge, V. Petrov, S. Hamm, S. E. Gelperina, B. Engelhardt, R. Alyautdin, H. V. Briesen, D. J. Begley, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 409.
- [92] A. Friese, E. Seiller, G. Quack, B. Lorenz, J. Kreuter, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *49*, 103.
- [93] B. Wilson, M. K. Samanta, K. Santhi, K. P. S. Kumar, N. Paramakrishnan, B. Suresh, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 75.
- [94] A. E. Gulyaev, S. E. Gelperina, I. N. Skidan, A. S. Antropov, G. Y. Kivman, J. Kreuter, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1564.
- [95] R. N. Alyautdin, V. E. Petrov, K. Langer, A. Berthold, D. A. Kharkevich, J. Kreuter, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 325.
- [96] R. N. Alyautdin, E. B. Tezikov, P. Ramge, D. A. Kharkevich, D. J. Begley, J. Kreuter, *J. Microencapsul.* **1998**, *15*, 67.
- [97] J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov, P. Ramge, K. Cychutek, C. Koch-Brandi, R. Alyautdin, *J. Drug Targeting* **2002**, *10*, 317.
- [98] A. Zensi, D. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, S. Wagner, C. Büchel, H. V. Briesen, J. Kreuter, *J. Controlled Release* **2009**, *137*, 78.
- [99] K. Michaelis, M. M. Hoffmann, S. Dreis, E. Herbert, R. N. Alyautdin, M. Michaelis, J. Kreuter, K. Langer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 1246.
- [100] J. Kreuter, T. Hekmatara, S. Dreis, T. Vogel, S. Gelperina, K. Langer, *J. Controlled Release* **2007**, *118*, 54.
- [101] W. Lu, Y. Zhang, Y. Z. Tan, K. L. Hu, X. G. Jiang, S. K. Fu, *J. Controlled Release* **2005**, *107*, 428.
- [102] Y. L. Xie, W. Lu, X. G. Jiang, *Behav. Brain Res.* **2006**, *173*, 76.
- [103] Y. Shechter, E. Heldman, K. Sasson, T. Bachar, M. Popov, M. Fridkin, *CS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 399.
- [104] Z. H. Wang, Z. Y. Wang, C. S. Sun, C. Y. Wang, T. Y. Jiang, S. L. Wang, *Biomaterial* **2010**, *31*, 908.
- [105] J. Hombach, A. Bernkop-Schnürch, *Int. J. Pharm.* **2009**, *376*, 104.
- [106] Y. Hu, Y. Ding, D. Ding, M. Sun, L. Zhang, X. Jiang, C. Yang, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1069.
- [107] X. Ying, H. Wen, W. L. Lu, J. Du, J. Guo, W. Tian, Y. Men, Y. Zhang, R. J. Li, T. Y. Yang, D. W. Shang, J. N. Lou, L. R. Zhang, Q. Zhang, *J. Controlled Release* **2010**, *141*, 183.
- [108] W. Tian, X. Ying, J. Du, J. Guo, Y. Men, Y. Zhang, R. Li, H. Yao, J. Lou, L. Zhang, W. Lu, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41*, 232.
- [109] Y. Xie, L. Ye, X. Zhang, W. Cui, J. Lou, T. Nagai, X. Hou, *J. Controlled Release* **2005**, *105*, 106.
- [110] J. Du, W. L. Lu, X. Ying, Y. Liu, P. Du, W. Tian, Y. Men, J. Guo, Y. Zhang, R. J. Li, J. Zhou, J. N. Lou, J. C. Wang, X. Zhang, Q. Zhang, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 905.
- [111] J. Huwyler, D. Wu, W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14164.
- [112] H. Chen, L. Tang, Y. Qin, Y. Yin, J. Tang, W. Tang, X. Sun, Z. Zhang, J. Liu, Q. He, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 94.
- [113] E. Afergan, H. Epstein, R. Dahan, N. Koroukhov, K. Rohekar, H. D. Danenberg, G. Golomb, *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 84.
- [114] J. Qin, D. Chen, H. Hu, M. Qiao, X. Zhao, B. Chen, *Yakugaku Zasshi* **2007**, *127*, 1497.
- [115] A. Schnyder, J. Huwyler, *NeuroRx* **2005**, *2*, 99.
- [116] C. Rousselle, P. Clair, J. Temsamani, J. M. Scherrmann, *J. Drug Targeting* **2002**, *10*, 309.
- [117] C. Rousselle, P. Clair, M. Smirnova, Y. Kolesnikov, G. W. Pasternak, S. Gac-Breton, A. R. P. Rees, J. M. Scherrmann, J. Temsamani, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 371.
- [118] J. Temsamani, C. Bonnafous, C. Rousselle, Y. Fraisse, P. Clair, L. A. Graniar, A. R. Rees, M. Kaczorek, J. M. Scherrmann, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 712.
- [119] C. Rousselle, M. Smirnova, P. Clair, J. M. Lefauconnier, A. Chavanie, B. Calas, J. M. Scherrmann, J. Temsamani, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 124.
- [120] S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. D. Dowdy, *Science* **1999**, *285*, 1569.
- [121] L. Costantino, F. Gandolfi, G. Tosi, F. Rivasi, M. A. Vandelli, F. Forni, *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 84.
- [122] G. Tosi, L. Costantino, F. Rivasi, E. Leo, A. V. Vergoni, R. Tacchi, A. Bertolini, M. A. Vandelli, F. Forni, *J. Controlled Release* **2007**, *122*, 1.
- [123] A. V. Vergoni, G. Tosi, R. Tacchi, M. A. Vandelli, A. Bertolini, L. Costantino, *Nanomedicine: NBM* **2009**, *5*, 369.
- [124] M. Demeule, A. Regina, C. Che, J. Poirier, T. Nguyen, R. Gabathuler, J. P. Castaigne, R. Beliveau, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 1064.
- [125] A. Régina, M. Demeule, C. Che, I. Lavallee, J. Poirier, R. Gabathuler, R. Beliveau, J. P. Castaigne, *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 185.
- [126] F. C. Thomas, K. Taskar, V. Rudraraju, S. Goda, H. R. Thorsheim, J. A. Gaasch, R. K. Mittapalli, D. Palmieri, P. S. Steeg, P. R. Lockman, Q. R. Smith, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 2486.
- [127] C. Che, G. Yang, C. Thiot, M. C. Lacoste, J. C. Currie, M. Demeule, A. Regina, R. Beliveau, J. P. Castaigne, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2814.
- [128] M. Teixidó, E. Zurita, M. Malakoutikhah, T. Tarrago, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11802.
- [129] M. Malakoutikhah, M. Teixido, E. Giralt, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4881.
- [130] M. Malakoutikhah, R. Prades, M. Teixido, E. Giralt, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2354.