

# 1. Einleitung und Motivation

## 1.1 Wofür bedarf es eines Arzneimitteltransportsystems?

Arzneimitteltransportsysteme („drug delivery systems“, DDS) werden intensiv beforscht, insbesondere für die Krebstherapie, wo sie häufig unter der Bezeichnung „Nanomedizin“ beschrieben werden. Eine Untersuchung vom Dezember 2014 zeigte [1], dass es 57.944 Publikationen zum Schlagwort „cancer nanoparticles“ zum damaligen Zeitpunkt gab, denen allerdings nur 1.381 klinische Studien zum gleichnamigen Forschungsgebiet gegenüberstehen. Diese Zahlen haben sich bis Januar 2021 auf 73.151 und 1.787 aktualisiert (eigene Recherche). Der Anteil von 2,4 % an klinischen Studien im Verhältnis zu den gesamten wissenschaftlichen Publikationen auf diesem Gebiet ist jedoch exakt gleich geblieben und zeigt, dass sich die Entwicklung häufig noch in einem sehr grundlegenden Stadium befindet. Vor diesem Hintergrund ist die Frage relevant, welche Möglichkeiten und Chancen Arzneimitteltransportsysteme zur Verbesserung medizinischer Anwendungen in Diagnostik, Therapie, Vakzination und Prävention bieten könnten? Die Möglichkeiten und Chancen erklären sich aus den aktuellen Schwierigkeiten vieler pharmazeutischer Wirkstoffe in ihrer direkten Anwendung ohne Transportsystem:

**Tabelle 1.1: Häufige Anwendungsprobleme vieler pharmazeutischer Wirkstoffe bei direkter Applikation ohne Arzneimitteltransportsystem**

<b>Problemstellung:</b>	<b>Problemgebiet:</b>
1. Geringe Löslichkeit und dementsprechend geringe Bioverfügbarkeit	Thermodynamik
2. Geringe Stabilität des nicht an einen Arzneiträger gebundenen Wirkstoffs und sein vorzeitiger Abbau im Blut	Pharmakokinetik
3. Verursachung immunologischer Abwehrreaktionen aufgrund einer möglichen Immunogenität eines Biopharmazeutikums	Immunologie
4. Geringe Erreichung des Zielorgans oder -gewebes	Pharmakokinetik
5. Schwerwiegende toxische Nebenwirkungen vieler Wirkstoffe bei diffuser Verteilung im Körper und Anreicherung in gesunden und empfindlichen Organen wie der Niere [2], der Leber [3], dem Herzmuskel etc.	Pharmakodynamik

Das Transportsystem muss daher sehr spezifisch konzipiert werden, um die genannten Dosis- oder Wirkungseinschränkungen eines Arzneistoffes zu überwinden. Arzneimitteltransportsysteme werden präpariert für die Zielerreichung auf verschiedensten Größenmaßstäben:










**Tabelle 1.2: Unterschiedliche Stufen der Zielerreichung für Arzneimitteltransportsysteme:**

<b>Spezifikation der Zielerreichung</b>	<b>Lokalisation</b>
• Passive Zielerreichung („passive targeting“) des erkrankten Körperteils aufgrund der Diffusionseigenschaften („enhanced permeability and retention effect“, EPR)	Blutzirkulation
• Aktive Zielerreichung („active targeting“) des erkrankten Körperteils durch geeignete Bindungen, d.h. Liganden oder Antikörper	Organ
• Akkumulation im Gewebe des Zielorgans	Gewebe
• Kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen	Interzellularraum
• Zelluläre Aufnahme	Intrazellularraum
• Ausführung der therapeutischen oder diagnostischen Wirkung	Organismus

## 1.2 Welche Arzneimittel-Transportsysteme gibt es?

Die aktuell entwickelten oder angewendeten Transportsysteme lassen sich in fünf Kategorien einteilen:

**Tabelle 1.3: Übersicht über die bis heute entwickelten Arzneimittel-Transportsysteme nach [1] und [4]:**

Nanopartikel-Kategorie	Arzneimitteltransportsystem	Veranschaulichung	Zugelassene Arzneimittel
Konjugate	Antikörper-Wirkstoff-Konjugate		Adcetris®, Kadcylla®, Zevalin®
	Polymer-Wirkstoff-Konjugate		
	Polymer-Protein-Konjugate		Oncaspar®, Zinostatin stimalamer®
Lipid-Nanoträger	Lang-zirkulierende, geschützte Liposomen		DaunoXome®, DepoCyt®, Doxil®/Caelyx®, Marqibo®, Me-pact®, Myocet®
	Feste Lipidnanopartikel		In klinischer oder prä-klinischer Erprobung
Polymer-Nano-träger	Polymere Nanopartikel		
	Polymersomen		
	Polymere Mizellen		
	Polymere Hydrogele		
	Dendrimere		
Anorganische Nanopartikel	Siliziumdioxid-Nanopartikel Metallische Nanopartikel Kohlenstoffnanoröhren Fullerene		In klinischer oder prä-klinischer Erprobung
Virale Nanopartikel	Virale Nanopartikel		In klinischer oder prä-klinischer Erprobung
	Virusartige Partikel		

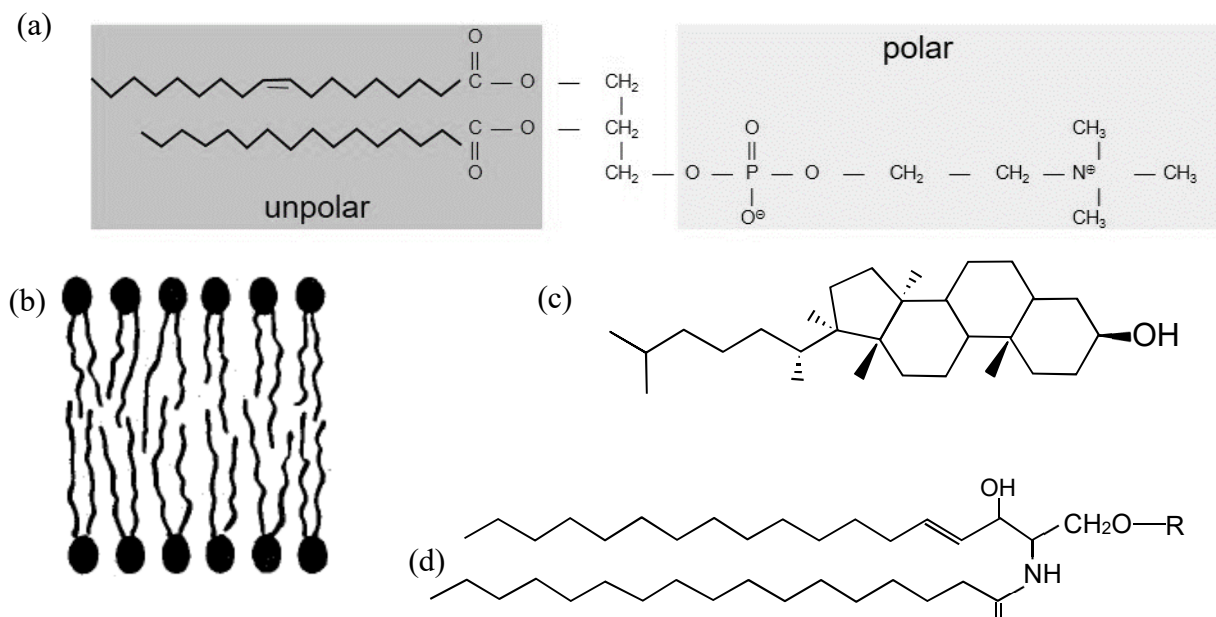
Die Übersicht zeigt, dass bisher nur wenige Arzneimittel-Transportsysteme Zulassungsstatus erreicht haben, wobei die meisten zugelassenen Präparate Liposomen sind. Darüber hinaus befinden sich sehr viele neuartige liposomale Formulierungen derzeit in klinischer Erprobung [1,

4]. Hieraus ergibt sich die besondere Bedeutung von Lipiden für den Transport von Arzneimitteln. Daher sollen in den beiden folgenden Einleitungskapiteln die physiologischen Funktionen von Lipidschichten in einer Literaturübersicht beleuchtet werden, um Aufschluss über ihre Potenziale für die pharmazeutische Verfahrenstechnik zu erhalten, die anhand eigener Forschungsarbeiten in den anschließenden Kapiteln dargestellt wird.

## 1.3 Welche Bedeutung haben Lipidschichten in der Physiologie?

### 1.3.1 Aufbau von Zellmembranen

Die Grundlage zum Verständnis des Aufbaus tierischer und humaner Zellmembranen legten Gorter & Grendel (1925) [5]. Sie entdeckten, dass die in Aceton aufgelösten Membranen roter Blutkörperchen mit der durch Langmuir (1917) entwickelten Technik der Ausbreitung von grenzflächenaktiven Substanzen als monomolekulare Schichten in guter Genauigkeit die doppelte Fläche der intakten Erythrozyten einnahmen. Dadurch entstand die Hypothese, dass biologische Membranen bimolekulare Lipidschichten sind, die aus amphiphilen Lipiden aufgebaut sind und vor allem aus Phospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterol bestehen, siehe Abb. 1.1.

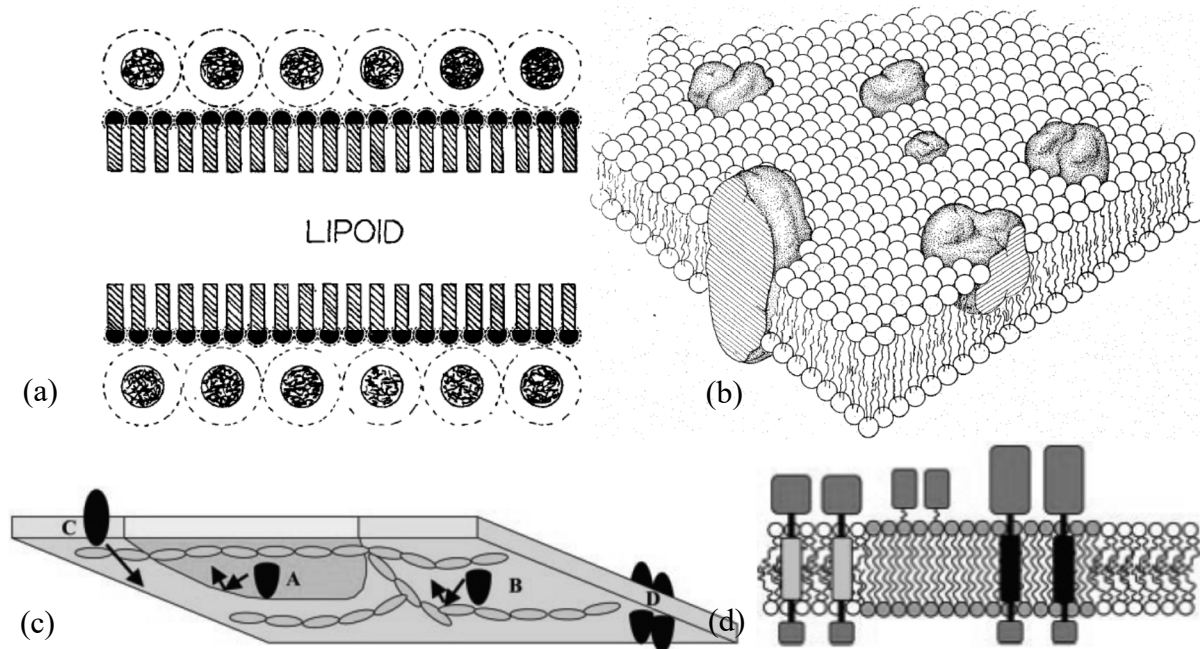


**Abbildung 1.1: Chemisch-physikalischer Aufbau wesentlicher Membranlipide und Bschicht-Struktur einer biologischen Membran. (a) Struktur des Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholins (POPC) als Beispiel eines Phospholipids mit einer polaren Cholin-Kopfgruppe und zwei unpolaren Fettsäuren, der monounsättigten Palmitinsäure und der gesättigten Ölsäure, die durch Esterbindungen mit Glycerol verbunden sind; (b) Modell einer Lipid-Doppelschicht nach Singer & Nicolson (1972) [6] (Abdruck mit Genehmigung der AAAS); (c) Cholesterol; (d) Allgemeine Struktur von Sphingolipiden, R = Wasserstoff: Ceramide, R = Phosphocholin: Sphingomyeline; R = Saccharid: Glycosphingolipide.**

In der Folgezeit wurde von Danielli & Davson (1935) [7] ein Modell vorgeschlagen, bei dem die Membran-assoziierten Proteine in Schichten auf der Außen- und Innenseite der Lipid-Membranen angelagert sind, siehe Abb. 1.2 (a). Erst Singer & Nicolson (1972) [6] konnten, gestützt durch experimentelle Befunde und thermodynamische Argumente, das bis heute akzeptierte Modell eines flüssigen Mosaiks vorschlagen, bei dem sich die Proteine inselartig in einer viskosen zweidimensionalen Schicht durch Diffusion bewegen.

Das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson (1972) wurde in den letzten 30 Jahren durch weitere experimentelle Befunde ergänzt und präzisiert, aber nicht grundlegend verändert. Die Erweiterung des Singer-Nicolson-Modells bezieht sich auf folgende experimentell nachgewiesenen Eigenschaften [8]:

- (i) die Zell-Rezeptoren (Proteine) verteilen sich auf der Zellmembran in nicht-zufälligen Mustern auf unterschiedlichen hierarchischen Ebenen;



**Abbildung 1.2: Historischer Überblick über die Modellvorstellungen zur Einlagerung von Proteinen in die Lipidmembranen von Säugetieren. (a) Sandwich-Modell nach Danielli & Davson (1935) [7], demzufolge sich die Membran-assoziierten Proteine in Schichten auf der Außen- und Innenseite der Lipid-Membranen anlagern. (b) Modell eines flüssigen Mosaiks nach Singer & Nicolson (1972) [6] (Abdruck mit Genehmigung der AAAS), das ein inselartiges Schwimmen der Proteine in einer viskosen zweidimensionalen Schicht annimmt. (c) und (d) Erweiterung des Modells des flüssigen Mosaiks durch viele Autoren (zusammengefasst durch Vereb et al. 2003 [8], Copyright (2003) National Academy of Sciences, U.S.A.). (c) Ansicht einer Zellmembran von der Innenseite der Zelle, wodurch das Zytoskelett (graue Ketten) sichtbar ist und die Phospholipid-Bischicht in flüssig-ungeordnete Bereiche (hellgrün) und flüssig-geordnete Bereiche, sogenannte Domänen (hellblau), unterteilt ist. Die in den Domänen verankerten Proteine sind energetisch innerhalb dieser Bereiche gebunden (A in (c)). Abhängig von der Membranpenetration der Proteine kann die Diffusion durch das Zytoskelett limitiert (B in (c)) oder unlimitiert (C in (c)) sein. (d) Die höhere Ordnung der Fettsäuren innerhalb der Lipid-Domänen (mit grünen Kopfgruppen), bindet bestimmte Proteine energetisch, die dann nur innerhalb der Domänen frei diffundieren können.**

- (ii) zwischen Elementen des Zytoskeletts und den Bereichen der Signalübertragung der Zellmembran wirken quasi-permanente molekulare Kontakte;
- (iii) die barrierefreien Diffusionsbewegungen der Membranproteine sind wesentlich kürzer als dies bei uneingeschränkter Diffusion der Fall wäre;
- (iv) die Domänen-Struktur der Lipidkomponenten der Membran separiert und lokalisiert die Membranproteine;

- (v) die Beteiligung der membranintegralen Proteine an der Erhaltung der Domänen-Struktur der Membranen zeigt, dass Proteine genauso wichtig sind wie Lipide für die Strukturierung der Membranen;
- (vi) die dynamische Reorganisation der Proteine in den Membrandomänen ermöglicht zielgerichtete zelluläre Reaktionen und ist beschränkt auf Protein/Lipid- und Protein/Protein-Interaktionen.

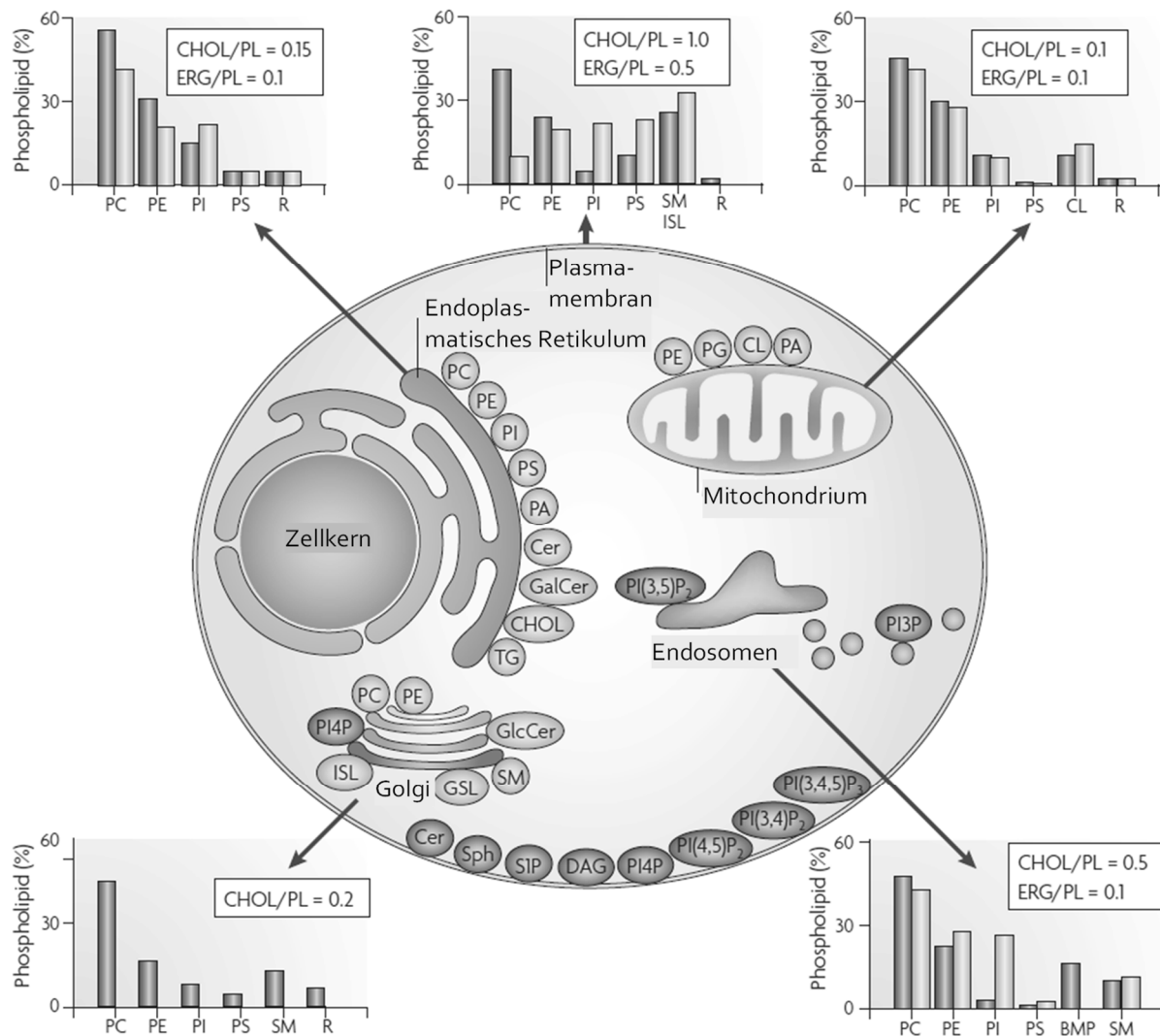
### **1.3.2 Lipidsynthese, -komposition und Asymmetrie biologischer Membranen**

Abbildung 1.3 zeigt die Bildung aller Membranlipide in einer typischen Säugetierzelle und die charakteristischen Unterschiede zu Hefen als Vertreter eukaryotischer Zellen unterhalb des Tierreiches [9].

Die meisten Membranlipide werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, aber auch der Golgi-Apparat und die Mitochondrien bilden bestimmte Membranlipide. Der Transport von Membranlipiden geschieht durch die Bildung sogenannter Membranvesikel (lat. vesicula „Bläschen“), die von der bildenden Membran durch Ausstülpung abgegeben und der empfangenden durch Fusion aufgenommen werden. Innerhalb der Membranen der Zellorganellen geschieht der Transport durch Diffusion.

Während im ER die Lipide der Außen- und Innenseite der Membran-Bischoicht noch symmetrisch angeordnet sind, ist die Verteilung bei allen anderen Membranen asymmetrisch [9]. Insbesondere Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) sind auf der Innenseite stark erhöht angereichert, was durch einen energieintensiven enzymatischen Prozess aktiv entgegen der nivellierenden Wirkung der Diffusion aufrechterhalten wird. Die Membranasymmetrie erfüllt zwei wesentliche Funktionen der biologischen Membranen: Die verstärkte Anwesenheit von PE auf den Innenseiten ermöglicht Membrankrümmungen, während das negativ geladene PS ein Indikator für die Vitalität der Zelle ist. Erhöht sich der Anteil des PS auf der Außenseite, so führt dies zum Abbau der Zelle, z.B. durch Phagozytose [9].

Die Zusammensetzung der Membranen aus vielen verschiedenen Lipiden ist in den Balkendiagrammen von Abbildung 1.3 gezeigt, die auch den Anteil des Cholesterols im Verhältnis zur Gesamtmenge der Phospholipide angeben. Die Plasmamembran hat die höchsten relativen Gehalte an Cholesterol und Sphingomyelin. Dies bewirkt eine starke Erhöhung der Flächendichte, d.h. Reduktion der molekularen Fläche von ca.  $70 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  bei reinen Phospholipiden auf ca.  $45 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ , bei äquimolaren Mischungen von Cholesterol und Phospholipiden [10]. Cholesterol belegt eine molekulare Fläche von ca.  $27 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  [11], Sphingomyelin von ca.  $52 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  [10]. Die erhöhte Flächendichte der Lipidmischungen geht mit einer erhöhten mechanischen Festigkeit einher.



**Abbildung 1.3: Übersicht über die Synthese der Lipide im Endoplasmatischen Retikulum, dem Mitochondrium und dem Golgi-Apparat einer typischen Säugetierzelle [9] (Abdruck mit Genehmigung von Springer Nature). Die Komposition der Plasmamembran sowie der Membranen der Zellorganellen sind in den Balkendiagrammen gezeigt, wobei die dunkelblauen Balken die Lipid-Verteilung in Säugetiermembranen und die hellblauen die in Hefe zeigen. Die roten Kreise zeigen die lokalen Signal- und Erkennungsfunktionen spezifischer Lipide, die mit Ausnahme der Ceramide (Cer) weniger als 1 % der gesamten Phospholipide ausmachen.**

**Abkürzungen:** Cholesterol (CHOL); Ergosterol (ERG, nur bei Hefen und Pflanzen, nicht bei Säugetieren); Phospholipide (PL); Phosphatidylcholin (PC); Phosphatidylethanolamin (PE); Phosphatidylinositol (PI); Phosphatidylserin (PS); Phosphatidylsäuren (PA); Cardiolipin (CL); Sphingomyelin (SM); Phosphatidylglycerol (PG); Glucosyl- oder Galactosyl-Ceramide (GlcCer / GalCer); Triglyceride (TG); Phosphatidylinositol-(x,y)-bisphosphate (PI(x,y)P<sub>2</sub>); Phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P); Restliche Lipide (R); Sphingosine (Sph); Sphingosine-1-phosphate (S1P)

### 1.3.3 Funktionen der Lipid-Membranen in der Evolution des Lebens

Lipid-Membranen sind grundlegend mit den evolutiven Anfängen des Lebens verbunden, wie Lombard et al. (2012) [12] in einer Übersicht zeigen. Sie sind eines der drei konstitutiven Prinzipien des Lebens:

1. der Abtrennung von Funktions- und Prozessräumen durch **Membranen**, sowohl gegenüber der Umgebung als auch im Inneren eines Organismus,
2. der Bewahrung von Gestaltmerkmalen durch die **Gene** und
3. der Entwicklung eines chemischen und energetischen Metabolismus, insbesondere durch die **Mitochondrien** (sowie dem **endoplasmatischen Retikulum** und dem Golgi-Apparat), wodurch die Autonomie eines Lebewesens gegenüber seiner Umgebung ermöglicht wird.

Innerhalb dieser drei konstitutiven Prinzipien stehen die Membranen vermittelnd zwischen den beiden anderen Prinzipien. Denn die dynamischen Funktionen der Membrangrenzen sind in allen Prozessen der beiden anderen Prinzipien *permanent* erforderlich, während die beiden anderen Prinzipien nur *diskontinuierlich*, d.h. zyklisch, die Prozesse einer Zelle beeinflussen. Die Membranen sind damit am stärksten mit den gegenwartsbezogenen Prozessen des Organismus verknüpft, während die Gene den größten Bezug zu seiner Abstammung (Vergangenheit) haben und die Metabolismen am meisten mit seinem Zukunftspotential verbunden sind.

Das Paradigma Virchows (1858): „*Omnis cellula e cellula*“ [13] („Jede Zelle geht aus einer Zelle hervor“) ist im Wesentlichen eine Beschreibung der Ursprünglichkeit der Bildung von Membrangrenzen. Seine Formulierung fällt in die Zeit, in der das Evolutionsprinzip durch Darwin in eine breite wissenschaftliche Diskussion gebracht wurde.

Die Fähigkeit, Phospholipide zu bilden, wird bereits dem „Letzten allgemeinen gemeinsamen Vorfahr“ („Last Universal Common Ancestor“, LUCA) zugesprochen [12]. Die Hypothesen zu dieser universellen Wurzel des Vererbungsstammbaums gehen davon aus, dass diese Urform vor ca. 3,5 Milliarden Jahren gelebt hat. Dabei vereinte dieser Urvorfahr offensichtlich in sich die Fähigkeit, die membranbildenden Phospholipide sowohl mit Isoprenen als auch mit Phospholipiden bilden zu können. Heute bilden die häufig in sehr extremen Umgebungsbedingungen lebenden Archaeen („Urbakterien“) ihre Membranen mit Isoprenen. Bei diesen vereinigen sich die beiden Monoschichten einer Membran-Bischicht durch chemische Bindung zwischen den beiden Isoprenketten zu einer einlagigen Molekülschicht mit entsprechend höherer Temperatur- und pH-Stabilität. Bei Bakterien und Eukaryoten (Zellkern tragende Ein- und Mehrzeller) dagegen werden die Membranen immer durch Phospholipide mit Fettsäuren gebildet, was darauf hindeutet, dass für die Evolution mehrzelliger, höher organisierter Lebewesen die größere Instabilität der mit Fettsäuren gebildeten Phospholipide eine Voraussetzung für ihre Plastizität und Metamorphose-Fähigkeit ist.

Die Dynamik der Lipidschichten am Beispiel der Humanphysiologie soll im nächsten Kapitel im Überblick betrachtet werden. Dadurch soll gezeigt werden, welches Zusammenspiel von Dynamik und Strukturbildung auch für Lipidschichten bei der Erzeugung von Arzneimittel-Transportsystemen möglich ist. Zusätzlich vermitteln die betrachteten Beispiele die Möglichkeiten der Interaktion zwischen dem Arzneimittel-Transportsystem und dem menschlichen Organismus nach der Arzneimittelgabe.