

Beyine İlaç Taşınması: Truva Atı Teknolojisi

Received : 02.05.2013
Revised : 22.10.2013
Accepted : 04.02.2014

Selin S. Doğan*, Seçil Toktaş*, Yılmaz Çapan*°

Giriş

Santral sinir sistemi (SSS) üzerine etkili ilaçların geliştirilmesinde engel teşkil eden en önemli faktör, kan dolaşımındaki zararlı maddelerin beyine girişini önleyen fizyolojik bir bariyer olan kan-beyin engelidir (KBE).

Nörodejeneratif hastalıklar ve kanserin tedavisinde kullanılan etkin maddelerle, bu hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli bir yere sahip olan görüntüleme tekniklerinin etkili bir biçimde kullanılabilmesi için KBE'yi geçecek özel sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Beyine ilaç taşınmasında kullanılan stratejiler invazif ve noninvazif yöntemler olmak üzere iki grupta toplanabilir. İnvazif yöntemlerin beyin üzerindeki potansiyel toksik etkileri ve hasta uyuncu açısından sorun teşkil etmeleri, son yıllarda yapılan araştırmaların noninvazif yöntemler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmaktadır. Kolloidal taşıyıcı sistemler, SSS hastalıklarında kullanılan, var olan ve yeni geliştirilen moleküllerin beyindeki hedeflerine taşınmasında umut vaat eden yollardan biridir. Bu derleme, mevcut problemlerin ortadan kaldırılması için geliştirilen ve beyine ilaç hedeflendirmede kullanılan nanopartiküler sistemlerin, bu sistemlerin hedeflendirilmesinde kullanılan yaklaşımların ve uygulamaların gözden geçirilmesi niteliğindedir.

Beyine ilaç hedeflendirme stratejileri olarak kullanılan yöntemlerin, farklı özelliklere sahip ilaç moleküllerine başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Beyine aktif olarak hedeflendirmede lipozomlar, polimerik miseller, polimerik ve lipid nanopartiküller nanotaşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır¹. Bu sistemlerden en çok kullanılanları lipozomlar ve nanopartiküllerdir².

* Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye, Ankara

° Yazışma yapılacak yazar: E-posta: ycapan@hacettepe.edu.tr

Nano boyuttaki ilaçlar, genel olarak 500 nm'den küçük ilaç taşıyıcı sistemler olarak tanımlanmaktadır. Bu sistemlerin geliştirilmesinde temel amaç, medikal ve farmasötik açılardan iyileştirilmiş yaklaşımlarla, düşük biyoyararlanım ve istenmeyen farmakokinetik özelliklere çözüm getirmektir³.

Kolloidal sistemlerin kullanılma nedenleri; istenen hücre ve dokuya spesifik olarak ilaç taşınmasını artırmak, biyolojik membranlardan ilaç geçişini artırarak bu moleküllerin biyoyararlanımlarının iyileşmesini sağlamak ve ilaç moleküllerini enzim aktivitesinden korumak olarak sıralanabilir. Ayrıca kolloidal sistemler, molekülün fizikokimyasal özelliklerini maskeleyerek KBE'den geçişini kolaylaştırmaktadır².

Sistemik olarak uygulanacak kolloidal sistemlerin sahip olması gereken temel özellikler¹;

- Biyolojik olarak parçalanabilir olması,
- Biyolojik olarak uyumlu olması,
- İmmünojenik olmaması,
- Kanda uygun fiziksel dayanıklılığa sahip olması olarak özetlenebilir.

Lipozomlar

Lipozomlar, fosfolipid membran tarafından tamamen çevrilmiş sulu bir içeriğe sahip taşıyıcı sistemler olarak tanımlanmaktadır. Lipozomlar, farmasötik alanda geleneksel olarak düşük çözünürlükteki ilaç moleküllerinin oral ve parenteral uygulamalarına olanak sağlamaktadır. Hazırlanan lipozomların sistemik dolaşımında kalma sürelerini uzatmak amacıyla yüzeyleri polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmektedir⁴. PEG ile lipozomların sistemik plazma klerenslerinin konvansiyonel lipozomlara göre 200 kat düşük olduğu gözlenmiştir¹.

Lipozomlar, molekülleri degradasyondan koruma, etki bölgesine hedeflendirme, yan etki ve toksisiteyi azaltma gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak düşük yükleme kapasiteleri, kan bileşenlerinin varlığında suda çözünen ilaç moleküllerinin yapıdan sızması ve düşük fiziksel stabilite gibi özellikleri nedeniyle uygulamaları sınırlıdır⁵.

MAB'lerle konjuge edilerek uygulanan ve immünolipozom olarak adlandırılan sistemler de ilaç hedeflendirmede kullanılan stratejilerdendir¹.

Nanopartiküller

Nanopartiküller, 10-1000 nm arasında değişen büyüklüklerde partiküler dispersiyonlar ya da katı partiküler olarak tanımlanmaktadır. İlaç hedeflendirmede tercih edilen sistemler genellikle 50-300 nm arasındaki boyutlardadır⁶. Etkin maddeler nanopartikülün matriksinde çözünmüş, nanopartiküle hapsedilmiş ya da nanopartikül yüzeyine bağlanmış şekillerde bulunabilir⁵.

Nano boyuttaki materyaller genellikle aynı özellikteki büyük moleküllerden daha farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Bu özellikler, değiştirilmiş manyetik, elektriksel ve optik özellikler, artırılmış yapısal bütünlük ya da değiştirilmiş kimyasal ve biyolojik aktivitedir. Bu sebeple nanopartiküler sistemler, değişik tipte ilaç moleküllerinin fiziksel açıdan değiştirilmesi ve farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin iyileştirilmesi açısından kullanılan yaklaşımlardandır. Bu sistemler, *in vivo* ortamda sistemik dolaşımında ilaç moleküllerini korumak, seçilmiş bölgelere ilaç hedeflendirmek ve etkin maddenin etki yerinde kontrollü ve uzatılmış hızda salıverilmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Polimerik nanopartiküller, doğal veya sentetik polimerlerle hazırlanabilirler.

Matriks maddesi seçiminde;

- Elde edilmek istenen partikül büyüklüğü,
- İlacın fizikokimyasal özellikleri (stabilite ve suda çözünürlük gibi)
- Yüzey özellikleri (yük ve geçirgenlik gibi)
- Biyoparçalanabilirlik, biyouyumluluk ve toksisite derecesi
- İstenen salım profili
- Son ürünün antijenik özellikleri dikkate alınması gereken parametrelerdir⁵.

Nanopartikül hazırlamada en çok tercih edilen polimerler polibütilsiyanoakrilat (PBCA), polilaktik asit (PLA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'dir⁶.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında en çok kullanılan yöntemler ise;

- Polimer yapılarının dispersiyonu (emülsiyon-çözücü buharlaştırma, emülsiyon-düfüzyon vb. yöntemler),
- Monomerlerin polimerizasyonu,
- Hidrofilik polimerlerin iyonik jelasyonu ya da koaservasyonu olarak sayılabilir⁵.

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ve yüzey özellikleri kolayca değiştirilerek, parenteral uygulama sonrası, etki bölgesine pasif veya aktif olarak hedeflendirilmeleri sağlanabilir.
2. İlaçların organlara dağılımı ve klerensleri, taşınmaları ve hedef organlarda birikme düzeyleri değiştirilerek kontrol altına alınıp uzatılabilir. Böylece ilacın terapötik etkinliği artırılıp yan etkileri azaltılabilir. Düşük dozlarda da etkili tedavi sağlanabilir.
3. Matriks maddelerin seçimine göre kontrollü salım sağlanıp, partiküllerin degradasyon karakteristikleri değiştirilebilir. Etkin maddeler kimyasal reaksiyon olmaksızın sistemlere yüklenebildiğinden aktivite korunmuş olur.
4. Nanopartiküllerin yüzeyine ligandlar bağlanarak ya da manyetik çekim sağlanarak ilaç hedeflendirmesi yapılabilir.
5. Bu sistemler oral, nasal, paranteral, intra-oküler vb. değişik yollardan uygulanabilmektedir.

Genel olarak nanopartiküller küçük boyutları ve bağlı hareketlilikleri sayesinde mikropartiküllere oranla daha yüksek hücre içine alım ve daha geniş biyolojik hedeflendirme özelliklerine sahiptirler⁵.

İntravenöz uygulama sonrası nanopartiküller, kandan retikülo endotelial sistem (RES) tarafından hızla uzaklaştırılır. Bu nanopartiküller özellikle akciğer (%60-90) ve dalakta (%2-10), bir miktar da kemik iliğinde toplanmaktadır. Bu sebeple nanopartiküllerin yüzey özellikleri PEG ve farklı sürfaktanlarla değiştirilerek etkin maddelerin beyine hedeflendirilmeleri sağlanabilmektedir⁷.

Sürfaktan kaplı nanopartiküllerle ilgili çalışmalarda en çok üzerinde durulan sistemler polisorbit 80 (Tween 80) kaplı nanopartiküler sistemlerdir. Ancak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda KBE'yi geçtiği gösterilen bu sistemlerin taşınma mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Farklı mekanizmalar ortaya atılmış olsa da pek çok çalışma taşınmanın endositozla gerçekleştiği üzerinde birleşmektedir. Tween 80 kaplı nanopartiküllerin kan dolaşımındaki apolipoprotein E/B moleküllerini yüzeye çektiği ve böylece düşük dansiteli lipoprotein (LDL) moleküllerini taklit ederek beyin kapillerlerindeki endotel tabakasında bulunan taşıyıcı sistem aracılığıyla reseptör aracılı endositoza uğradığı düşünülmektedir. Ancak Tween 80 kullanılan çalışmalarda polimer olarak PBCA kullanılması, biyodegradasyon sonrası toksik olduğu düşünülen bileşikler oluşması nedeniyle tartışılan bir konudur^{1,8,9}.

Nanopartiküler Sistemlerin Beyine Hedeflendirilmesinde Kullanılan Teknolojiler

Truva Atı (Molecular Trojan Horse -MTH) Teknolojisi

Reseptör aracılı taşıyıcı (RAT) sistemlerinin keşfi, bu reseptörlere hedeflendirilmek üzere hazırlanan Truva Atı / *Molecular Trojan Horse (MTH)* teknolojiyle (şekil 10) büyük moleküllü ilaçların taşınmasına olanak sağlamıştır. Rekombinant proteinler, monoklonal antikolar, antisens ilaçlar, siRNA ve nonviral gen ilaçlar bu teknolojinin uygulanabildiği biyoteknoloji ürünü ilaç moleküllerine örnek olarak verilebilir¹⁰.

Peptid yapıda moleküller, endojen peptidler ve reseptöre spesifik peptidomimetik monoklonal antikolar; nanopartiküller, lipozomlar ve beyine hedeflendirilmek istenen moleküller için MTH görevi görerek KBE'yi geçebilecek sistemler elde edilmesine olanak sağlamaktadır^{11,12}.

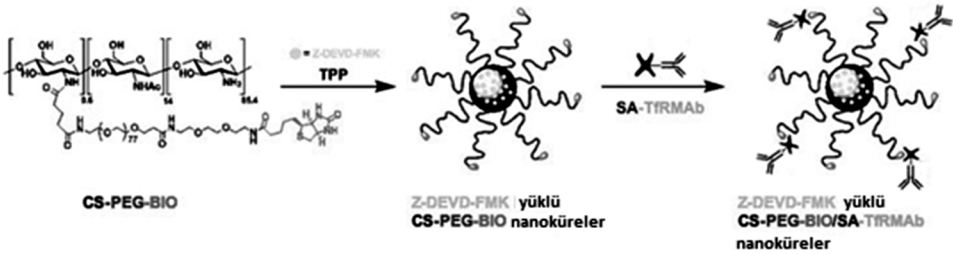
Reseptöre spesifik MAb kullanılan MTH teknolojileri türe özgüdür. Sıçanlarda beyine ilaç hedeflendirme, sıçan TfR'sine özgü OX26 murin MAb ile sağlanırken, OX26 MAb farelerde aktif değildir. Bu sebeple farelerde beyine hedeflendirme çalışmaları, fare TfR'si için sıçan 8D3 MAb'si ile gerçekleştirilmektedir¹³.

Lee ve ark.¹⁴ yaptıkları çalışmada üç farklı MAb (OX26, 8D3, R17) kullanılarak, farede beyine ilaç hedeflendirilmesinde MAb'lerin spesifik etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda sıçan TfR'sine hedeflendirilen fare OX26 MAb'sinin *in vivo* olarak fare beynine geçemediği görülmüştür. Fare TfR'sine hedeflendirilen 8D3 ve R17 sıçan MAb'lerinin ise etkili olarak beyine taşındığı tespit edilmiştir. Ancak 8D3 ve R17'nin organ seçicilikleri birbirinden farklıdır. 8D3 karaciğer ve dalak tarafından da alınmasına rağmen, R17 bu organlar tarafından alınmayarak fare beynine spesifik olarak taşınmaktadır¹⁴.

Biyoteknolojik yöntemlerle tasarlanmış TfRMAB insanda KBE'yi geçebilmek için kullanılabilir. Ancak bilinen en etkili MTH insan insülin reseptörüne hedeflendirilen MAb kullanılarak hazırlanmaktadır. İnsan insülin reseptörüne (HIR) uygun murin monoklonal antikoru, Rhesus cinsi maymunda da etkilidir. Ancak murin HIRMAB'si immünolojik reaksiyonlar sebebiyle insanda direkt olarak kullanılmadığından şimerik ve insana uygulanabilir formda HIRMAB üretimi için biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır¹². Türlerle özgü mAb ve reseptör arası bu etkileşimler nedeniyle klinik öncesi çalışmalar ve insan üzerinde yapılacak çalışmalarda iki farklı MTH kullanılması gerekmektedir¹⁵.

Kemirgenlerde MTH olarak TfRMAB'nin tercih edilmesinin nedeni, fare ve sıçanlarda ilaç taşınmasında MTH olarak kullanılabilir, insülin reseptörüne spesifik, bilinen bir MAb bulunmamasıdır¹². Sıçan TfR'sine spesifik OX26 murin MAb'si, ilaç hedeflendirme stratejisi olarak en çok kullanılan şimerik peptidlerden biridir¹. OX26, transferrin reseptörü üzerinde bulunan ve transferrinin bağlandığı bölgeden farklı olan ekstraselüler bir bölgeden bağlanmaktadır. Bu sebeple MAb'nin bağlanması, endojen transferrinle herhangi bir girişime neden olmamaktadır¹⁶.

Aktaş ve ark.¹⁸ fare TfR'sine (CD71) spesifik MAb ile konjuge edilmiş, kas-paz inhibitörü *N*-benziloksikarbonil-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluorometil keton (Z-DEVD-FMK) taşıyan kitosan-PEG nanopartiküllerinin beyine hedeflendirilmesi üzerinde çalışmıştır (şekil 1). Z-DEVD-FMK, tek başına KBE'yi geçemediğinden, serebral iskemi sonrası görülen nöronal hücre ölümlerini engellemekte yetersiz kalmaktadır. İstenilen nörolojik korumanın sağlanabilmesi için taşıyıcı bir sisteme ihtiyaç duyulmuştur. Avidin-biyotin teknolojisi kullanılarak elde edilen, PEG ile konjuge edilmiş kitosan nanopartiküllerinin geliştirilip, sistemin spesifik MAb ile TfR'ye hedeflendirilmesi sayesinde, i.v. uygulama sonrası beyin intravasküler kompartmanında önemli miktarda nanopartikül tespit edilmiştir^{17,18}.

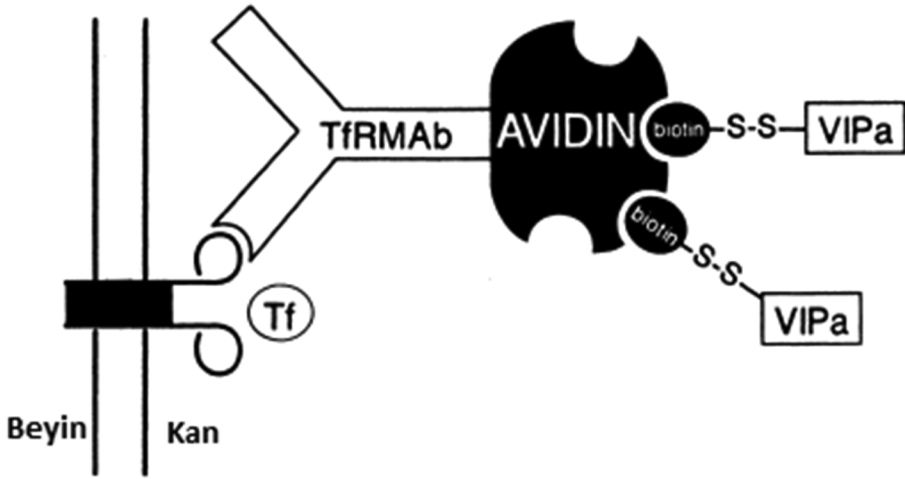


Şekil 1

Beyine hedeflendirme için geliştirilmiş monoklonal antikor bağlı kitosan-PEG nanopartiküllerinin şematik gösterimi¹⁷.

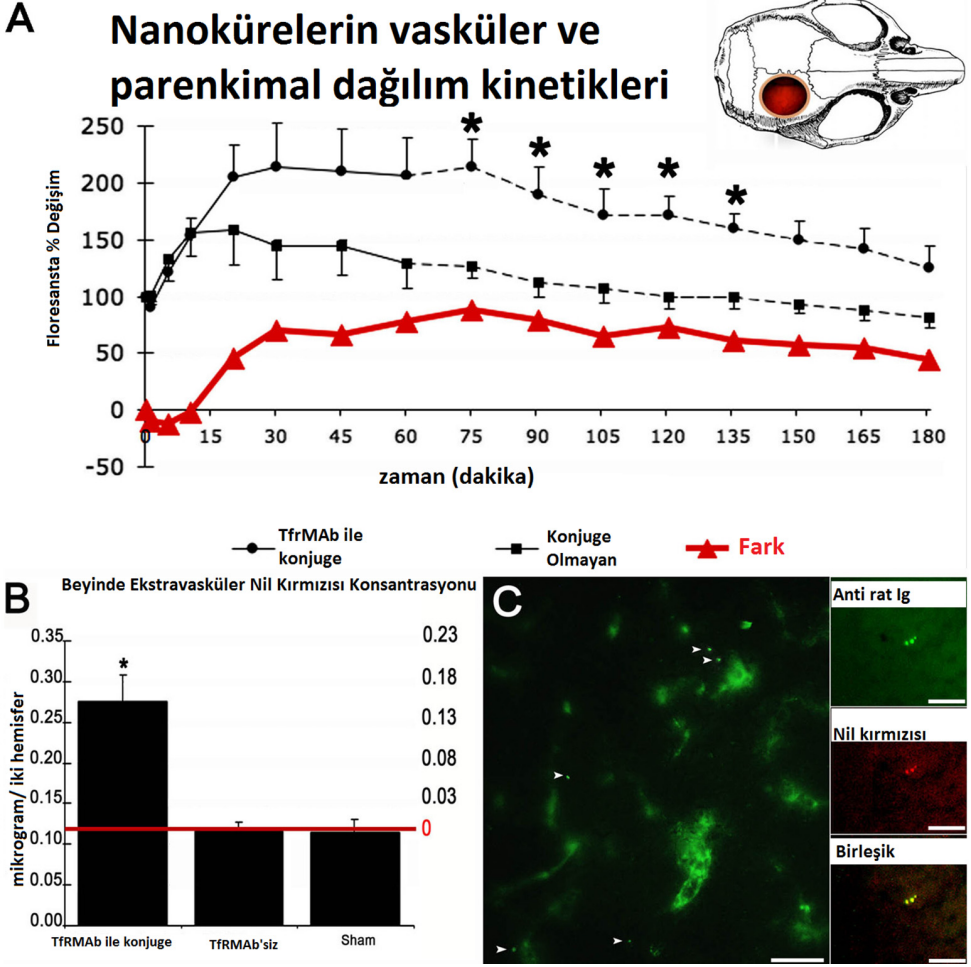
Karataş ve ark.¹⁸ nörolojik koruma sağlayan bir kaspaz-3 inhibitörü olan Z-DVD-FMK taşıyan, PEGile kitosan nanoküreleri hazırlayarak sistemin KBE'den geçtiğini göstermişlerdir. Nanoküreler serebral damar ağında bulunan tip I TfR'ye spesifik MAb'lerle beyine hedeflendirilmiş olup, sistemin karaciğer ve dalak tarafından ölçülebilir düzeylerde alınmadan beyine geçtiği intravitreal mikroskobiyile tespit edilmiştir. Tip 1 TfR'ler beyin kapiller endotelinde fazla miktarda bulunduğundan, nanoküreler RAT sistemi yardımıyla transitoza uğrayarak KBE'yi geçmektedir (şekil 3). Ayrıca PEGile kitosan nanokürelere, tip 1 TfR'ye spesifik MAb'lerin avidin-biyotin köprüsüyle bağlandığı sistem katyonik özellikte olduğundan, negatif yüklü beyin endotel hücreleriyle daha kolay etkileşime girmektedir¹⁸.

Kan-Beyin Engeli



Şekil 2

Beyine ilaç hedeflendirmede vektör olarak kullanılan avidine bağlı TfRMAB ile TfR arasındaki konjugasyonun şematik gösterimi¹⁶.



Şekil 3

A. Nanopartiküllerin sistemik uygulamayı takiben beyin parenkimasına taşınması görülmekte olup nanopartiküllerin enjeksiyonu takip eden 3 saat içinde beyinde görüntülenen floresans değişimini göstermektedir. İki dağılım arasındaki fark parenkimada bulunan nanokürelerin neden olduğu floresans değişimi olup zamana bağlı olarak nanokürelerin beyine geçişini temsil etmektedir.

B. Beyin parenkimasındaki nil kırmızısı konsantrasyonu beyin homojenizatlarında yapılan 549 nm'deki spektrofotometrik ölçümlerin sonucunda elde edilmiştir. Sadece doku zemin girişimini belirten yatay kırmızı çizginin üzerindeki değerler dikkate alınmıştır ($p < 0.05$)

C. Enjeksiyondan 1 saat sonra elde edilen beyin kesitlerine yapılan floresan mikroskopisi analizleri. Yapılan analizler sonucunda nanopartiküllerin beyin parenkimasına geçişi gösterilmiştir 18.

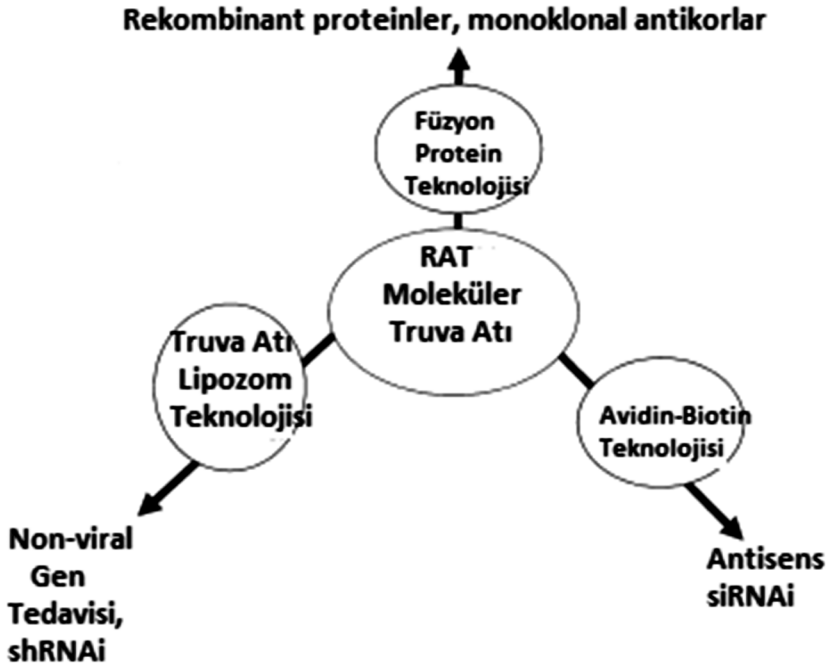
MAB temelli MTH teknolojileri büyük moleküllü ilaçların KBE'yi geçmesini sağlamanın yanı sıra molekülün plazma farmakokinetik özelliklerini de iyileştirmektedir. İlaç molekülünün MAB temelli MTH yardımıyla uygulanması AUC değerinde artmayla sonuçlanmaktadır.

KBE MTH'leri büyük molekülü ilaçların taşınmasında 3 farklı teknolojiyle (şekil 4) uygulanmaktadır¹⁹:

Füzyon Protein (FP) Teknolojisi: Rekombinant proteinler, monoklonal antikor temelli terapötiklerin taşınmasında kullanılmaktadır.

Avidin-Biyotin (AB) Teknolojisi: Oligopeptid, siRNA ve antisens ajanların hedeflendirilmesinde kullanılmaktadır. MTH ve avidinden oluşan bir füzyon protein, etkin maddenin monobiyotinlenmesine paralel olarak elde edilmektedir.

Truva Atı Lipozom /Trojan Horse Liposom (THL) Teknolojisi: Non-viral plazmid DNA molekülleri KBE'yi geçebilmek için MTH ile konjuge lipozomlarla formüle edilmektedir.



Şekil 4

RAT Moleküler Truva Atı teknolojileri. MTH'ler beyine taşınması planlanan etkin maddelerin özelliklerine göre 3 gruba ayrılmaktadır. Rekombinant proteinler ve monoklonal antikorlar füzyon protein teknolojisiyle beyine taşınmaktadır. Peptidler, antisens ve siRNA molekülleri, molekülün monobiyotinlenmesine paralel olarak avidin ve Truva atının birleşmesiyle oluşan füzyon proteinlerin formüle edildiği avidin-biyotin teknolojisiyle taşınmaktadır. Plazmid DNA'lar ise Truva atı lipozom teknolojisiyle KBE'yi geçmektedir¹⁹.

Katyonic taşıma peptidleri de terapötik etkiye sahip proteinlerin membranlardan geçişlerini artırmada kullanılan bir yoldur. Ancak *in vivo* olarak uygulandıklarında kan dolaşımından hızlı bir şekilde temizlenmekte ve oldukça düşük plazma AUC'sine neden olmaktadır. Beyine ilaç taşıma potansiyeli, plazma AUC değeriyle doğrudan bağlantılı bir parametre olduğundan bu sistem *in vivo* olarak etkili bir strateji değildir²⁰.

Hedeflendirilmiş Taşıyıcı Sistemlerin SSS'de Kullanım Alanları

Kanser

Polimerler, tümör inhibisyonunda kullanılan ajanların taşınmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Viral taşıyıcı sistemlere göre daha az immünojenik özellik göstermeleri ve rutin tedavide uygulanabilir olmaları bu nedenler arasında gösterilebilir²¹.

Son yıllarda, antikanser ajanların taşıyıcı sistemler yardımıyla tümör yapısına direkt olarak hedeflendirilmesi ve böylece sağlıklı hücrelerin etkilenmesinin önlenmesi amacıyla MAb'ler kullanılarak elde edilen taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır²¹.

MTH sistemleri ile görüntüleme sayesinde beyin tümörlerinde erken teşhisin sağlanmasının yanı sıra bu sistemlerin kullanımları ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır.

Zhang ve ark.²² beyin kanseri tedavisinde kullanılmak üzere epidermal büyüme hormonu reseptörü (*epidermal growth factor receptor-EGFR*) antisens mRNA kodlayan plazmid DNA'yı, PEG ile immunolipozomla formüle etmiştir. 8D3 MAb ile fare TıR'sine ve 83-14 MAb ile HIR'ye hedeflendirilmiş immunolipozomlar, intrakranial insan beyin kanserinde hayatta kalım süresini %100 artırmıştır. 8D3 MAb, farede oluşturulan deneysel beyin kanseri modelinde tümör damar ağının geçmeyi sağlarken, 83-14 MAb de insan beyin kanseri hücresinin plazma ve nükleer membranından geçişi sağlamıştır²².

Zhang ve ark.'nın yaptıkları başka bir çalışmada, insan EGFR mRNA'sı fare TıR'si için 8D3 MAb ve HIR için 83-14 MAb ile hedeflendirilen immunolipozomlar aracılığıyla intravenöz uygulanmıştır. İnsan beyin gliyomlarının fareye implante edildiği deneysel modelde, ileri derece intrakranial beyin kanseri olan farede hayatta kalım süresinde %88 oranında artış gözlenmiştir²³.

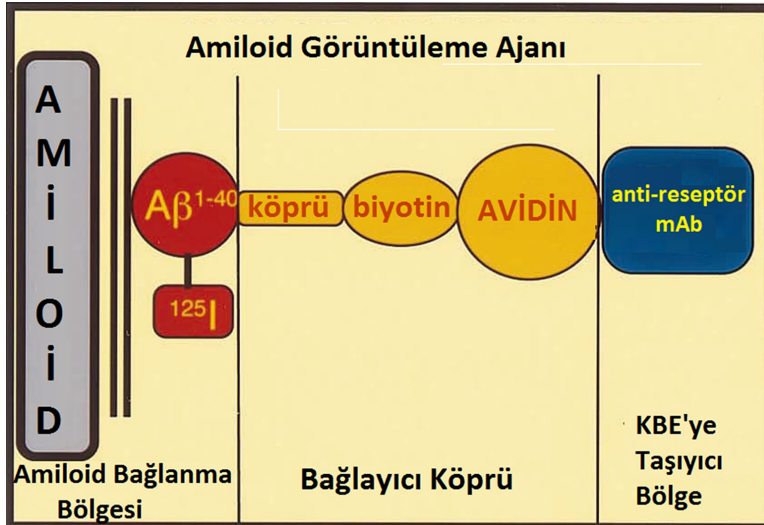
Görüntüleme

Peptid yapılı radyofarmasötikler diagnostik ajanlar olarak KBE'yi geçecek şekilde yeniden formüle edilmektedirler.

SSS görüntülemeye yakın zamana kadar kullanılan ajanlar genellikle farklı 6-8 monoaminerjik veya aminoasiderjik nöroiletim sisteminden birini hedefleyen küçük moleküllerdir. Ancak çok sayıda peptiderjik nöroiletim sistemi bulunduğundan, peptid yapılı radyofarmasötiklerin geliştirilmesi nörolojik görüntülemeyle teşhisin artmasına yardımcı olmaktadır. Bu aşamada karşılaşılan en belirgin sorun ise bu moleküllerin KBE'yi geçememeleridir. Bu sorunu aşmak için de MTH teknolojileri kullanılmaktadır¹⁰.

$A\beta^{1-40}$, Alzheimer Hastalığı'nda beyinde oluşan amiloid plakları görüntülemeye kullanılan 40 aminoasitlik bir peptiddir. Transgenik farelerde beyindeki amiloid plaklar, Tfr-MAb ile konjuge edilmiş $A\beta^{1-40}$ 'in *in vivo* intravenöz uygulaması sonrası görüntülenmiştir (Şekil 5)²⁴.

Amiloid plakların görüntülenmesi ile ilgili diğer bir çalışmada, [(125) I]-N-biotinil- $A\beta(1-40)$ peptidin HIRMAb-avidin (AV) füzyon proteini ile konjugasyonu sonrası amiloid plaklara bağlanma özelliğindeki değişiklik incelenmiştir. Çalışma sonunda serbest ve konjuge peptidin otopsi ile alınmış beyin dokularında mevcut olan amiloid plaklara aynı oranda bağlandığı gösterilmiştir. Antikorla hedeflendirilmiş peptid radyofarmasötiklerin büyük moleküllü nörolojik görüntüleme ajanları olarak KBE'ye penetrasyonda kullanılması için ileri çalışmaların sürdürülmesi gerektiği bildirilmiştir²⁵.



Şekil 5

3 temel bölgeden oluşan amiloid görüntüleme ajanı: (a) amiloid bağlanma bölgesi [¹²⁵I]- $A\beta^{1-40}$, (b) 14 atomlu bir taşıyıcı, biyotin ve avidin analogundan oluşmuş taşıyıcı köprü, (c) KBE hedeflendirmesinde görevli, insan insülin reseptörüne bağlanma için 83-14 murin MAb veya sıçan transferin reseptörüne bağlanma için OX26 murin MAb²⁶.

Beyin kanserinde, beyin dokusunda yüksek miktarlarda epidermal büyüme hormonu reseptörü (*epidermal growth factor receptor-EGFR*) ekspresyonu gerçekleşmektedir. MTH ile konjuge edilerek intravenöz yolla uygulanan peptid yapılı EGF radyofarmasötüğü sayesinde intrakranial beyin kanserinin erken dönemde teşhisi sağlanmaktadır²⁷.

Beyindeki gen ekspresyonunu görüntülemek amacıyla spesifik gen sıralamasına sahip antisens radyofarmasötik moleküller ile hedeflendirilmede de MTH teknolojisi kullanılmaktadır.

Deneyisel beyin gliyomlarında kaveolin (CAV)-1 α geni ekspresyonu artarken gliyal fibriler asidik protein (GFAP) geni azalmaktadır. Görüntüleme için uygun özellikte bir radyofarmasötik olan peptid nükleik asit (PNA), biyotin-streptavidin köprüsüyle sıçan transferrin reseptörüne spesifik mürin OX26 monoklonal antikoruna bağlanarak *in vivo* uygulama için stabil bir kompleks elde edilir. CAV spesifik PNA, TfR-MAb ile konjuge edildiğinde beyinde görüntüleme sağlanmaktadır²⁸.

İnme

İnme, gelişmiş ülkelerde ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında koroner arter hastalığı ve kanserden sonra üçüncü sırada gelen ciddi bir sağlık problemidir¹⁸.

KBE, iskemi sonrası nörolojik korumanın sağlanabileceği ilk 6 saat boyunca geçirgen olmayan sıkı yapısını bozulmadan korumaktadır. Bu sebeple nörolojik koruma sağlayan ajanların KBE'yi geçebilmesini sağlayacak taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır¹⁹.

İnvazif olmayan yöntemlerle de infarkt haciminde azalma sağlanabileceğini, sıçanlarda orta serebral arter oklüzyonu (*middle cerebral artery occlusion - MCAO*) ile oluşturulmuş bölgesel beyin iskemisi tedavisinde nörolojik koruma özelliğine sahip nörotropik faktör BDNF'nin TfRMAB ile konjuge edilerek i.v. uygulanmasıyla gösterilmiştir²⁹.

Normal şartlarda KBE'yi geçemeyen bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'nin OX26 TfRMAB ile konjuge edilmesiyle elde edilen MTH sisteminin sıçanlarda iskemiden sonra i.v. uygulanması sonucu, kalıcı MCAO modelinde infarkt haciminde %80 azalma sağladığı gözlenmiştir³⁰.

Akut inmede yeni bir tedavi yaklaşımı sunan eritropoietin (EPO), fare TfR'sine özgü şimerik monoklonal antikor ile konjuge edilerek yeni bir füzyon protein (cTfRMAB-EPO) elde edilmiştir. Kalıcı MCAO inme modeli oluşturulmuş farede 1mg/kg i.v. dozda uygulanan cTfRMAB-EPO sonrası hemisferik infarkt haciminde %81, nöronal hasarda %78 azalma gözlenmiştir³¹.

Eritropoietin, aynı zamanda deneysel Parkinson hastalığında intraserebral enjeksiyon ile uygulandığında nörolojik koruma sağlamaktadır. Tek başına KBE'yi geçemediğinden sistemik uygulama ile etki gösteremeyen eritropoietin, şimerik TfRMAb-EPO füzyon proteini olarak uygulanmıştır. 3 haftalık tekrarlı i.v. uygulama sonrası farelerde striyatal iyileşmenin kantitatif ölçüsü olan tirozin hidroksilaz (TH) enzimi aktivitesinde %306 artış sağlamıştır. Beyine penetre olabilen özellikteki EPO füzyon proteininin i.v. uygulama sonrası Parkinson hastalığında nörolojik koruma sağladığı gösterilmiştir³².

Akut deneysel iskemik inme sırasında beyinde sentezlenen proinflamatuvar bir sitokin olan tümör nekroz faktörü (TNF- α), nöronal apoptozu indükleyerek hasar oluşturmaktadır. Büyük yapıları nedeniyle KBE'yi geçemeyen TNF- α inhibitörleri (TNFIs), şimerik cTfRMAb-TNFR füzyon proteinleri şeklinde farelere i.v. uygulandığında beynin farklı bölgelerindeki nöral hasarda %42 - %54 arası azalma gözlenmiştir³³.

Tartışma ve Sonuç

nano boyutlu taşıyıcı sistemlerle gerçekleştirilen pasif ve aktif hedeflendirme yaklaşımları, santral sinir sistemini etkileyen nörodejeneratif hastalıklar ve kanser tedavisinde kullanılan ve tek başına KBE'yi geçme özelliğine sahip olmayan ilaç moleküllerinin beyindeki hedef bölgelere taşınması amacıyla geliştirilen yöntemlerdir.

Nanopartiküler sistemlerin beyine hedeflendirilmesinde kullanılan yöntemlerden Truva atı teknolojisi, son yıllarda araştırmalara en çok konu olan alanların başında gelmektedir. Reseptör aracılı taşıyıcı (RAT) sistemlerin keşfi, bu reseptörlere hedeflendirilmek üzere hazırlanan Truva Atı / Molecular Trojan Horse (MTH) teknolojisiyle büyük molekülü ilaçların taşınmasına olanak sağlamaktadır. Güncel çalışmaların üzerinde yoğunlaştığı bu sistemler rekombinant proteinler, monoklonal antikorlar, peptidler, antisens ve siRNA molekülleri, plazmid DNA'lar gibi büyük moleküller bu sistemler sayesinde beyinde hedef bölgelere taşınabilmektedir. Bu sayede kanser, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıkların tedavisinde umut vaad eden gelişmeler kaydedilmekte ve santral sinir sistemi hastalıklarının teşhisinde kullanılan teknolojiler geliştirilmektedir.

Özet

Beyine İlaç Taşınmasında Kullanılan Taşıyıcı Sistemler, Ankara, 2013. KBE, beyni toksik ve zararlı bileşiklerden koruyarak homeostazı sağlayan, aynı zamanda pek çok etkin maddenin beyindeki hedef bölgelere ulaşmasını kısıtlayan en önemli faktördür. Tedaviyi sınırlayan bu fizyolojik bariyerin sebep olduğu engeli ortadan kaldırmak, ancak geliştirilen yeni stratejilerle mümkün olmaktadır. Nano boyutlu kolloidal sistemler, santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde pasif ve aktif hedeflendirme yoluyla umut vaat eden yaklaşımlar olarak yer almaktadır. Bu yaklaşımlar arasında reseptör aracılı taşıyıcı (RAT) sistemler dikkat çekmektedir. Reseptörlere hedeflendirilmek üzere geliştirilen Truva Atı / Molecular Trojan Horse (MTH) teknolojisi sayesinde büyük molekülü ilaçların beyine taşınmasına olanak sağlanmıştır. Hedeflendirilmiş taşıyıcı sistemlerin SSS'de kullanımları ile ilgili araştırmalar, günümüzde beyin kanseri, inme, Alzheimer, Parkinson, beyin travması gibi hastalıklar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmanın amacı, kolloidal sistemlerin hedeflendirilmesinde kullanılan yaklaşımların ve güncel çalışmaların değerlendirilmesi ile yeni stratejilerin belirlenmesine olanak sağlamaktır.

Anahtar kelimeler: İlaç hedeflendirme, kan-beyin engeli, nanopartiküler sistemler, Truva atı

Summary

Delivery Systems for Brain Drug Targeting, Ankara, 2013. Blood-brain barrier is the main factor which maintains homeostasis by protecting brain from toxic and harmful compounds, but it also represents the main limiting factor for a number of drug molecules to reach the aimed areas in brain. The only way to overcome this treatment-limiting obstacle could be reached by the help of new strategies. Nanoscale colloidal systems are promising strategies in the treatment of central nervous system (CNS) diseases by passive and active targeting. Receptor mediated transport systems (RMT) are in the spotlight of targeting strategies. By the help of Molecular Trojan Technology, which is developed for receptor targeting, large molecule drugs will be transported to brain. Nowadays, research interest in targeted delivery systems in the treatment of CNS disorders has been focused on brain cancer, stroke, Alzheimer's disease, Parkinson disease. Therefore, the aim of this present review is to evaluate the targeting approaches of colloidal systems and current studies for the development of new strategies.

Keywords: Drug targeting, blood-brain barrier, nanoparticulate systems, Trojan horse

KAYNAKLAR

1. Beduneau, A., Saulnier, P., Benoit, J.P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*, 28 (33), 4947-4967 (2007).
2. Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Couvreur, P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *Int J Pharm*, 298 (2), 274-292 (2005).
3. Harikrishna Devalapally, A.C., Mansoor M. Amiji. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (10), 2547-2565 (2007).
4. Schnyder, A., Huwyler, J. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx*, 2 (1), 99-107 (2005).
5. VJ Mohanraj, Y.C. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (1), 561-573 (2006).
6. Newton, H.B. Advances in strategies to improve drug delivery to brain tumors. *Expert Rev Neurother*, 6 (10), 1495-1509 (2006).
7. K. Ringe, C.M.W., B. A. Sabe. Nanoparticle Drug Delivery to the Brain. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 91-104 (2004).
8. Mittal, G., Carswell, H., Brett, R., Currie, S., Kumar, M.N. Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. *J Control Release* (2010).
9. Kreuter, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 47 (1), 65-81 (2001).
10. Pardridge, W.M. Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery. *Curr Opin Pharmacol*, 6 (5), 494-500 (2006).
11. Pardridge, W.M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2 (1), 3-14 (2005).
12. Pardridge, W.M. Re-engineering biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses. *Bioconjug Chem*, 19 (7), 1327-1338 (2008).
13. Pardridge, W.M. Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier. *Arch Neurol*, 59 (1), 35-40 (2002).
14. Hwa Jeong Lee, B.E., Jayne Lesley, Ulrich Bickel, William M. Pardridge. Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 292 (3), 1048-1052 (2000).
15. Pardridge, W.M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, 12 (1-2), 54-61 (2007).
16. Bickel, U., Yoshikawa, T., Pardridge, W.M. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 46 (1-3), 247-279 (2001).
17. Yesim Aktas, M.Y., Karine Andrieux, R. Neslihan Gursoy, Maria Jose Alonso, Eduardo Fernandez-Megia, R.N.-C., Emilio Quinoa, Ricardo Riguera, Mustafa F. Sargon, H.H.C., Ayhan S. Demir, A. Atilla Hıncal, Turgay Dalkara, Yılmaz Capan, P.C. Development and Brain Delivery of Chitosan-PEG Nanoparticles Functionalized with the Monoclonal Antibody OX26. *Bioconjugate Chemistry*, 16, 1503-1511 (2005).
18. Hulya Karatas, Y.A., Yasemin Gursoy-Ozdemir, Ebru Bodur, Muge Yemisci, Secil Caban, Atay Vural, Onur Pinarbasli, Y.C., Eduardo Fernandez-Megia, Ramon Novoa-Carballal, Ricardo Riguera, Karine Andrieux, P.C., Turgay Dalkara. A Nanomedicine Transports a Peptide Caspase-3 Inhibitor across the Blood-Brain Barrier and Provides Neuroprotection. *The Journal of Neuroscience*, 29 (44), 13761-13769 (2009).

19. Pardridge, W.M. Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan horses. *Journal of Controlled Release*, 122, 345-348 (2007).
20. Lee, H.J., Pardridge, W.M. Pharmacokinetics and delivery of tat and tat-protein conjugates to tissues in vivo. *Bioconjugate Chemistry*, 12 (6), 995-999 (2001).
21. Fujita, M., Lee, B.S., Khazenzon, N.M., Penichet, M.L., Wawrowsky, K.A., Patil, R. ve diğ erleri. Brain tumor tandem targeting using a combination of monoclonal antibodies attached to biopoly(beta-L-malic acid). *J Control Release*, 122 (3), 356-363 (2007).
22. Zhang, Y., Zhu, C., Pardridge, W.M. Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Mol Ther*, 6 (1), 67-72 (2002).
23. Zhang, Y., Zhang, Y.F., Bryant, J., Charles, A., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res*, 10 (11), 3667-3677 (2004).
24. Lee, H.J., Zhang, Y., Zhu, C., Duff, K., Pardridge, W.M. Imaging brain amyloid of Alzheimer disease in vivo in transgenic mice with an Abeta peptide radiopharmaceutical. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (2), 223-231 (2002).
25. Sumbria, R.K., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Imaging Amyloid Plaque in Alzheimer's Disease Brain with a Biotinylated Abeta Peptide Radiopharmaceutical Conjugated to an IgG-Avidin Fusion Protein. *Bioconjugate Chemistry* (2012).
26. Saito, Y., Buciak, J., Yang, J., Pardridge, W.M. Vector-mediated delivery of 125I-labeled beta-amyloid peptide A beta 1-40 through the blood-brain barrier and binding to Alzheimer disease amyloid of the A beta 1-40/vector complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (22), 10227-10231 (1995).
27. Xia, C.F., Zhang, Y., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology. *Pharm Res*, 24 (12), 2309-2316 (2007).
28. Suzuki, T., Wu, D., Schlachetzki, F., Li, J.Y., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Imaging endogenous gene expression in brain cancer in vivo with 111In-peptide nucleic acid antisense radiopharmaceuticals and brain drug-targeting technology. *J Nucl Med*, 45 (10), 1766-1775 (2004).
29. Zhang, Y., Pardridge, W.M. Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin. *Brain research*, 889 (1-2), 49-56 (2001).
30. Song, B.W., Vinters, H.V., Wu, D., Pardridge, W.M. Enhanced neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor in regional brain ischemia after conjugation to a blood-brain barrier delivery vector. *the journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 301 (2), 605-610 (2002).
31. Fu, A., Hui, E.K., Lu, J.Z., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Neuroprotection in stroke in the mouse with intravenous erythropoietin-Trojan horse fusion protein. *Brain Res*, 1369, 203-207 (2011).
32. Zhou, Q.H., Hui, E.K., Lu, J.Z., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Brain penetrating IgG-erythropoietin fusion protein is neuroprotective following intravenous treatment in Parkinson's disease in the mouse. *Brain research*, 1382, 315-320 (2011).
33. Sumbria, R.K., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Brain protection from stroke with intravenous TNFalpha decoy receptor-Trojan horse fusion protein. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32 (10), 1933-1938 (2012).