

# Beyine İlaç Hedeflendirme Stratejileri

Received : 02.05.2013

Revised : 19.11.2013

Accepted : 27.12.2013

**Selin S. Doğan\*, Seçil Çaban\*, Yılmaz Çapan\*<sup>o</sup>**

## *Giriş*

Nörofarmasötikler, farmasötik ilaç sanayinde büyüme potansiyeli en fazla olan alanlardan biridir. Nörofarmasötik pazarının ilaç endüstrisinde geniş bir paya sahip olma potansiyeli, her üç bireyden birinin yaşam süresi boyunca santral sinir sistemini (SSS) etkileyen bir hastalık geçiriyor olması olarak açıklanmaktadır. Ancak ilaçların etki bölgesine ulaşmasında karşılaşılan problemler, SSS ilaç pazarının, kardiyovasküler ilaç pazarına yetişebilmesi için % 500'den fazla bir büyümeye gereksinim duymasına neden olmaktadır<sup>1</sup>.

SSS için yeni moleküller geliştirilmesini önleyen en önemli faktör kan-beyin engeli (KBE)'dir. Kan dolaşımındaki zararlı maddelerin beyne girişini önleyen KBE, tedavide kullanılması planlanan ilaçların etki yerine geçişini de sınırlandırmaktadır. Bu soruna çözüm getirilmesi için harcanan çabalar akademik ve endüstriyel alanda yetersiz kalmaktadır. Bunun yanı sıra SSS için geliştirilen yeni ilaçların önemli bir kısmının bu bariyeri geçemeyecek özellikte olması, etkili tedavi yöntemi geliştirilmesini de kısıtlamıştır<sup>2</sup>.

SSS hastalıkları üzerine etkili ilaçların büyük bir yüzdesini oluşturan rekombinant proteinler, monoklonal antikorlar (MAb) ve antisens moleküller gibi büyük moleküllü ilaçların hiçbiri KBE'yi geçemezken, bu durum küçük moleküllü ilaçlar için de benzerdir. Sanılanın aksine, küçük moleküllü ilaçların % 98'inden fazlası KBE'yi farmakolojik etki gösterebilecek miktarlarda geçemez<sup>3</sup>.

\* Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye 06100, Ankara

<sup>o</sup> Corresponding author: E-mail: ycapan@hacettepe.edu.tr

Beyne ilaç hedeflendirme alanında yapılacak çalışmalar sonucu SSS hastalıklarından olan Alzheimer, Parkinson, Huntington, amiyotrofik lateral skleroz, multipl skleroz, inme, beyin travması, omurilik hasarı, beyin kanseri, AIDS hastalığı gibi beyinde oluşan viral enfeksiyonlar, konjenital ataksiler ve konjenital metabolik hastalıklara karşı yeni ilaçlar geliştirilmesi, ihtiyaç duyulan gelişmelerdir<sup>4</sup>.

KBE nedeniyle ortaya çıkan problemler ancak ilaç geliştirme ve geliştirilen bu ilaçları etki yeri olan beyne hedeflendirme konusunda yapılacak çalışmaların beraber yürütülmesine dayanan programlarla aşılabılır<sup>5</sup>.

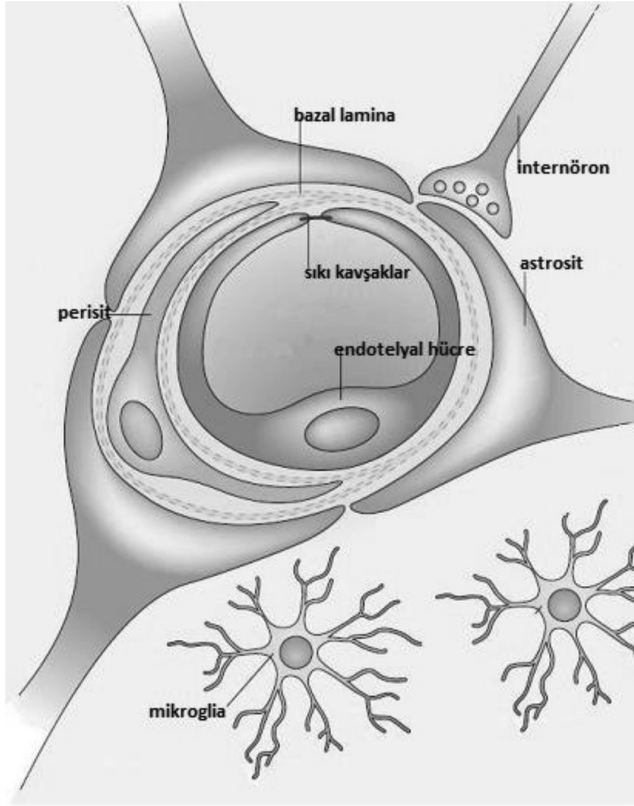
Beyne ilaç hedeflendirme probleminin ortadan kaldırılabilmesi mevcut SSS ilaçları için de yeni yaklaşımların uygulanmasına bağlıdır. Trans-kranial uygulamayla beyne hedeflendirme, medisinal kimya alanında uygulanan yaklaşımlarla molekülün fizikokimyasal özelliklerini değiştirme gibi eski yöntemlerin yerini endojen taşıyıcı sistemlere bırakmasıyla beklenen gelişmenin sağlanacağı yapılan çalışmalarla da kanıtlanmaktadır<sup>1</sup>.

Bu derleme, beyne ilaç hedeflendirmede kullanılan temel yaklaşımların tarihsel bir gelişim çerçevesinde olumlu ve olumsuz yanlarıyla gözden geçirilmesi ve günümüzde bu alanda kabul gören yeni yaklaşımların temellerinin incelenmesi niteliğindedir. Bu amaçla son dönemde en çok kullanılan endojen sistemlere dayalı hedeflendirme konusunda özellikle durulacaktır.

### Kan- Beyin Engeli

Beyne ilaç hedeflendirmede molekülün karşılaştığı temel problem, KBE olarak adlandırılan ve beyinde bulunan endotel hücrelerin astrosit ve perisitlerle birleşmesiyle oluşan yapıdır (Şekil 1). Dolaşımdaki kan serebral parankimadan KBE yardımıyla ayrılmakta ve böylece ilaçların SSS'ye geçişi engellenmektedir<sup>6</sup>.

KBE'nin anatomik olarak temeli beynin kapiller endotel hücrelerinde bulunan epitel benzeri sıkı kavşakların varlığıdır. Periferal dokularda bulunan ve gözenekli bir yapıya sahip olan kapillerlerin aksine, beyin mikrodamarlarındaki endotel hücreleri birleşerek yüksek dayanıklılıkta sıkı kavşaklar oluşturmaktadır<sup>3</sup>. Beyin kapillerlerinin poröz bir yapıya sahip olmaması, çözünmüş haldeki moleküllerin paraselüler yollarla



**Şekil 1**

KBE'yi oluşturan nörovasküler ünitelerin şematik olarak gösterimi. Serebral endotel hücreleri birleştikleri noktalarda, hücreler arası geçişi sınırlandıran sıkı kavşakları oluştururlar. Perisitler, serebral kapillerler boyunca aralıklı olarak bulunmakta ve endoteli kısmen çevrelemektedir. Serebral endotel hücreleri ve perisitler aynı ekstrasellüler matriksle çevrelenmiştir. Astrosit son ayakları kapillerleri çevreleyen bir ağ şeklindedir. Nöronlardan endotelial hücelere uzanan aksonlar nörotransmitterler ve peptitleri taşır. Mikroglialar (perivasküler makrofajlar), beyindeki yerleşik immünokompetan hücrelerdir ve sistemik dolaşımda bulunan monositlerden ve makrofajlardan türemişlerdir<sup>7,8</sup>.

serbest difüzyonuna engel olmaktadır. Ayrıca beyin kapillerleri çözünmüş maddelerin transelüler yolla pinositozunun da sınırlı olduğu bir yapıdır<sup>4</sup>.

Dolaşımda olan bir molekülün beyne girebilmesi için temel iki yol bulunmaktadır. Birincisi, molekülün ağırlığı 400 Da altındaki hidrofobik küçük moleküllerin serbest difüzyonu, diğeri ise molekülün endojen KBE taşıyıcıları yardımıyla kapiller endoteli geçmesidir<sup>4</sup>. Küçük besin maddeleri ve vitaminler KBE'yi endojen taşıyıcı aracılı transport (TAT) ile

geçerken, büyük moleküllere sahip peptidler reseptör aracılı transport (RAT) mekanizmasını kullanmaktadırlar<sup>9</sup>.

Serbest bir molekülün beyin dokusuna penetrasyonunun gerçekleşebilmesi için KBE endotel hücrelerinin kapiller kan dolaşımıyla temas halindeki luminal membran ve beyin interstisyel sıvısıyla temas halindeki abluminal membranı geçmesi gerekmektedir<sup>10</sup>.

### Beyne İlaç Hedflendirmede Genel Yaklaşımlar

Son yıllarda SSS hastalıklarında kullanılmak üzere geliştirilen ilaçlarda genel yaklaşımın küçük moleküllü ilaçlara doğru olmasının nedeni, bu ilaçların KBE'yi rahatça geçebileceğine inanılmasıdır. Ancak sanılanın aksine, küçük moleküllü ilaçların yalnızca % 2 gibi küçük bir miktarı KBE'yi aşabilmektedir (Şekil 2)<sup>2</sup>.

KBE'yi difüzyona dayanan mekanizmalarla farmakolojik olarak etki gösterebilecek miktarlarda geçebilmesi için bir ilaç molekülünün;



**Şekil 2**

Radyoizotopla işaretlenmiş histaminin intravenöz injeksiyonundan 30 dk sonra elde edilmiş, yetişkin bir fareye ait otoradyogram. Yapılan çalışmada küçük moleküllerin beyin ve omurilik dışında vücudun bütün post-vasküler alanlarına penetrasyonu gösterilmiştir.

Radyoizotop işaretli histamin yalnızca 111 Da ağırlığında küçük bir molekül olmasına rağmen KBE'yi aşmamaktadır<sup>2</sup>.

- Molekül ağırlığının 400 Da'dan küçük olması,
- Yağda çözünebilir özelliklere sahip olması gerekmektedir<sup>11</sup>.

Genel bir kural olarak bir molekül için KBE geçirgenliği, polar fonksiyonel grup formunda moleküle eklenen her bir H bağı çiftiyle 10-1 oranında azalmaktadır. Bu kurala bağlı olarak herhangi bir molekülün suyla yapacağı olası H bağları kimyasal yapısına bakılarak hesaplanabilir. H bağlarının sayısının 8'i aşması durumunda molekülün KBE'yi lipid aracılıklı difüzyon mekanizması yardımıyla yeterli dozda geçebilme olasılığı ortadan kalkmaktadır<sup>1</sup>.

H bağı sayısı ve molekül ağırlığının yanı sıra molekülün beyne ulaşabilmesini etkileyen üçüncü parametre de plazma farmakokinetiği ve plazma eğri altı alan değeridir (AUC). İlacın beyindeki konsantrasyonu plazma AUC değeriyle doğrudan ilişkilidir. Lipid taşıyıcıların kullanıldığı durumda ortaya çıkan problem bu farmakokinetik kural ile açıklanmaktadır. Etkin maddenin lipid çözünürlüğü artırıldığında KBE geçirgenliği artmasına rağmen plazma AUC'si de aynı oranlarda azalmaktadır<sup>12</sup>.

Beyne ilaç hedeflendirmede kullanılan yöntemler genel olarak invazif ve noninvazif yöntemler olarak iki grupta toplanabilir.

Geleneksel olarak bu alanda yapılan ilk denemeler medisinal kimya temelli yaklaşımlar ve nörocerrahiye dayalı invazif ilaç hedeflendirme yöntemleridir<sup>13</sup>.

Günümüzde beyne ilaç hedeflendirmede üzerinde çalışılan endojen taşıyıcı mekanizmaları hedefleyen sistemler; önceki yıllarda sıklıkla üzerinde çalışılan stratejilerden olan trans-kranial ve nazal yolla beyne ilaç taşınması, KBE'nin bozulmasına yönelik uygulamalar ve küçük moleküllerin lipidizasyonu uygulamalarının yetersizlikleri üzerinde durularak geliştirilen yaklaşımlardır<sup>1</sup>.

### İnvazif Yöntemler

İnvazif yöntemler, kan beyin engelinin geçici olarak bozulması sonrası trans-nazal uygulama gibi yaklaşımlar ve cerrahi yollarla trans-kranial ilaç uygulamasına dayanmaktadır<sup>13</sup>.

KBE'nin geçici olarak bozulması ise;

- Hiperozmotik çözeltilerin intra-karotid arter infüzyonu,

- Vazoaktif bileşikler, solventler, alkilleyici ajanlar, immün adjuvanlar, sitokinler veya lokal ultrasonik beyin irradyasyonu ile yapılabilir<sup>2</sup>.

KBE bozulması ile geçirgenliğin artırılmasında temel sorun, plazma proteinlerinin de beyne sızmasına neden olmasıdır. Plazma proteinlerinden olan albümin beyindeki astrositler için toksik niteliktedir. Bunun yanı sıra beyin kanla temas halinde olması astrogliazun uyarılmasına neden olmaktadır<sup>1</sup>. Görüldüğü gibi, KBE'nin bozulmasının vasküler patolojilere ve kronik nöropatolojik değişikliklere yol açtığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Kullanılmakta olan diğer bir yöntem ise trans-nazal yolla hedeflendirmedir. Trans-nazal yolla beyne hedeflendirilen ilaçlara örnek olarak küçük ve yağda çözünebilen bir molekül olan progesteron verilebilir<sup>13</sup>.

Yağda çözünebilen ve molekül ağırlığı 400 Da altında olan moleküller sadece KBE'yi değil nazal epitelyal bariyer ve araknoid zarı da geçebilme özelliğine sahiptirler. Yağda çözünen bu küçük moleküller, yağda çözünürlük oranlarına göre olfaktif beyin omurilik sıvısına geçebilirler<sup>13</sup>.

Molekülün serbest difüzyon için gereken özellikleri taşımadığı durumlarda ise trans-nazal transportu sağlayabilmek için burundaki epitel hücre bariyerinin bozulması gerekmektedir<sup>13</sup>. İnsanda her bir burun deliğine 100 µl'den fazla hacimde trans-nazal taşıyıcı sistem uygulanması lokal nazal bozulmaya, böylece ilaç molekülünün nazal ve olfaktif beyin omurilik sıvısı arasında taşınmasına olanak sağlamaktadır<sup>2</sup>.

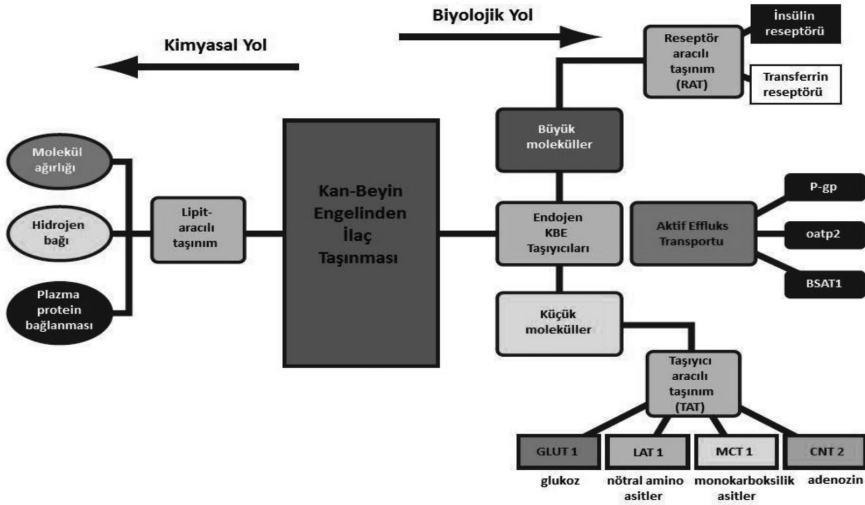
Ancak girişimsel hedeflendirme, beyin üzerine potansiyel toksik etkileri ve cerrahi yaklaşımların uygulama zorlukları gibi nedenlerle fazla tercih edilmemektedir.

### Noninvazif Yöntemler

Beyne ilaç hedeflendirmede kullanılan noninvazif stratejiler genel olarak biyolojik ve kimyasal temelli yaklaşımlar olarak ikiye ayrılabilir (Şekil 3)<sup>14</sup>.

### Kimyasal Yöntemler

Kimyasal yöntemlere dayalı hedeflendirme genel olarak moleküllerin lipid aracılıklı transport sistemleriyle KBE geçebilmesini sağlamak



**Şekil 3**

KBE'ye ilaç hedeflendirme stratejileri<sup>14</sup>.

amacıyla molekülün yağda çözünürlüğünün artırılması üzerinde yapılan çalışmaları kapsayan konvansiyonel yaklaşımlardır<sup>9</sup>.

Bir molekülün lipidizasyonu için temel olarak iki yol izlenebilir. İlk yöntem, molekülün suda çözünürlüğü sağlayan grupların yağda çözünmeyen fonksiyonel gruplarla maskelenmesidir. İkinci yöntem ise suda çözünen molekülün yağda çözünen özelliklere sahip bir taşıyıcıyla konjuge edilmesidir. Bu iki yöntemde de molekülün KBE'yi geçebilecek yapıda yağda çözünür ön ilaç olarak formüle edilmesi esastır<sup>14</sup>. Bu yaklaşımlardan ideal olarak beklenen, ön ilacın beyne geçtikten sonra metabolize olarak ana moleküle dönüşüp etki yerinde istenen özellikleri göstermesidir.

Kimyasal yöntemlerin pratikte beyne ilaç hedeflendirmede kullanımları oldukça sınırlıdır. Morfinin di-asetilasyonla elde edilen türevi olan eroinin dışında ön ilaç yaklaşımının beyne hedeflendirmede uygulaması olarak verilebilecek sadece birkaç örnek bulunmaktadır. Bu sınırlı kullanımın temel nedenleri lipidizasyonla molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak KBE'yi geçişin engellenmesi ve ön ilacın değişen farmakokinetik dağılım profilidir<sup>15</sup>.

Daha önceden de üzerinde durulduğu gibi, ilacın KBE'yi geçebilmesi için gerekli iki temel parametrenin yanında beyinde bulunan ilaç miktarını etkileyen diğer parametreler plazma farmakokinetiği ve plazma eğri altı alan değeridir (AUC). İlacın beyindeki konsantrasyonu, KBE geçirgenlik katsayısı (Pe) ve plazma AUC değeriyle doğrudan ilişkilidir<sup>1</sup>.

İlaç molekülünün yağda çözünürlüğü artırıldığında, KBE geçirgenlik katsayısı artmakta, ancak ilacın vücuttaki diğer organlara penetrasyonu da benzer şekilde artmaktadır. Bu nedenle ilacın plazma klirensi de değişikliğe uğramaktadır. Lipidizasyon sonrası ilacın plazma yarı ömrü birkaç saatten birkaç dakikaya kadar düşebilmekte, bu durum da plazma AUC değerinde artmış membran geçişine bağlı düşüşe sebep olmaktadır<sup>12,14</sup>. Suda çözünen bir ilacın yağda çözünen forma dönüştürülmesi ayrıca molekül ağırlığında da artışa sebep olmaktadır. Molekül ağırlığındaki bu artış, ilacı lipidize etmek için kullanılan yöntemle ilgili olarak değişmektedir. Kütle-spesifik KBE geçiş eşik değeri, biyolojik membranlarda lipid aracılı transport sistemiyle açıklanabilir<sup>16</sup>.

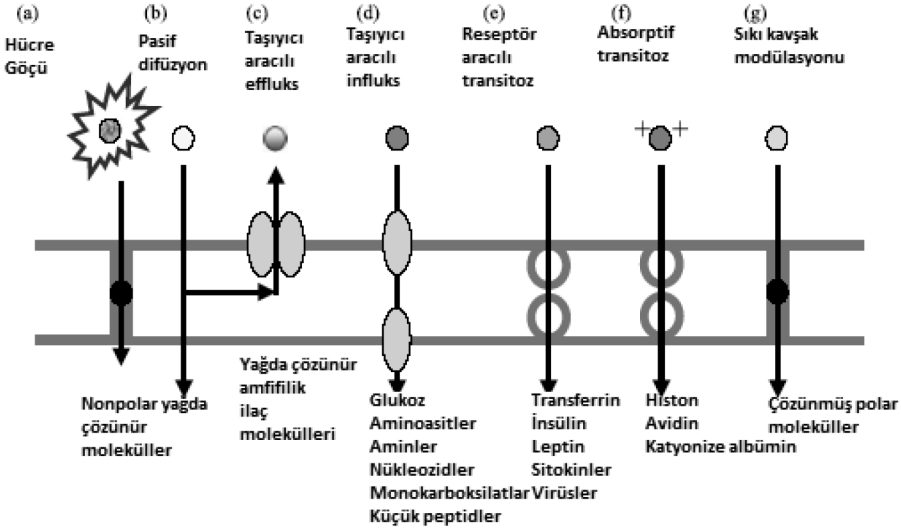
Tüm bu olumsuzluklara rağmen medisinal kimya temelli bu yaklaşım moleküllerin endojen taşıyıcı aracılı transport sistemleri için substrat özelliği kazanması amacıyla biyolojik yöntemlere yardımcı olarak kullanılabilir. Bu yaklaşıma örnek olarak dopamin molekülü verilebilir. Normal şartlarda dopamin KBE'yi geçemeyen özellikte bir molekül iken, dopaminin bir  $\alpha$ -aminoasit olan L-dopa'ya çevrilmesi, büyük nötral aminoasit tip 1 (LAT1) taşıyıcı sistemi ile KBE'yi geçip SSS için aktif olarak kullanılan bir ilaca dönüşmesine olanak vermiştir<sup>17,18</sup>.

### Biyolojik Yöntemler

Biyolojik yöntemler, yeni teknolojilere dayanan ve KBE'yi oluşturan endotel hücrelerde bulunan endojen taşıyıcı sistemler hakkında kapsamlı bilgi gerektiren hedeflendirme stratejileri olarak kabul görmektedir. Biyolojik yaklaşımda temel amaç ilaç molekülünün yapısında ve formülasyonda yapılan değişikliklerle endojen transport sistemleriyle beyne geçişini sağlamaktır (Şekil 4). Bu stratejini kullanılması hem terapötiklerin seçici olarak beyne hedeflendirilmesini sağlamakta hem de beyne girişe olanak sağlamaktadır<sup>6</sup>.

Bu transport sistemleri son dönemde beyne ilaç hedeflendirme stratejileri arasında üzerinde en çok çalışılan konuların dayandığı



**Şekil 4**

Moleküllerin KBE'yi geçebileceği potansiyel yollar. (a) Lökositler KBE'ye bitişik sıkı kavşakları geçebilmektedir. (b) Çözünmüş moleküller hücre membranından pasif difüzyona uğrayıp endotel tabakasından geçebilirler. Yüksek yağda çözünürlük özelliği bu geçişi kolaylaştırır. (c) Aktif effluks pompaları pasif difüzyonla geçiş yapan çözünmüş maddelerden bazılarıyla etkileşerek endotel dışına taşınmalarını sağlar. (d) Taşıyıcı aracılı transportla glukoz, aminoasit, nükleozid gibi pek çok esansiyel polar madde pasif ya da aktif olarak SSS'ye taşınır. (e) Peptid ve protein gibi makromoleküller reseptör aracılı transport ile endotelden taşınır. (f) Absorptif transitoz, negatif yüklü makromoleküllerin KBE'ye geçişini sağlayabilir. (g) Sıkı kavşakların geçirgenliğinin çeşitli şekillerde artırılmasıyla paraselüler difüzyonel yolak da taşınmayı sağlayabilir<sup>6</sup>.

temeldir. Önümüzdeki dönemde beyne ilaç hedeflendirmede kullanılan yaklaşımlar bu yönde geliştirilmediği sürece, SSS bozuklukları için kullanılacak moleküller yağda çözünür özellikleri sayesinde KBE'yi geçebilen küçük bir gruptan ileri gidemeyecektir<sup>1</sup>. Son dönemde bu alanda yapılan çalışmalarını yakından takip edebilmek için KBE yapısında bulunan endojen taşıyıcı sistemler ve uygulanan stratejiler ileriki bölümde ele alınacaktır.

### Kan – Beyin Engeli Endojen Taşıyıcıları

KBE'de bulunan endojen taşıyıcılar KBE'yi oluşturan beyin kapiller endotel hücrelerinin luminal ve abluminal membranlarında yer almaktadır<sup>19</sup>. KBE yapısında bulunan taşıyıcı sistemler genel olarak (i) taşıyıcı aracılı transport sistemleri (TAT), (ii) reseptör aracılı transport

sistemleri (RAT), (iii) aktif effluks transport sistemleri (AET) adı altında 3 grupta toplanabilir. Bu sistemlerden TAT ve AET, kan ve beyin arasında küçük moleküllerin taşınmasından sorumluyken RAT sistemi kandaki bazı büyük endojen moleküllerin beyne girişinden sorumludur. TAT sistemleri kandan beyne çift yönlü taşıma gerçekleştirirken, AET sistemi genellikle effluks pompa olarak çalışarak beyindeki ilaç molekülleri ya da endojen substratları kana verir<sup>20</sup>.

### Taşıyıcı Aracılı Transport Sistemleri

TAT sistemleri beynin kapiller endotelinin luminal ve abluminal membranlarında yer alan ve bu özellikleri sayesinde besin maddelerinin kan-beyin arasında genellikle çift yönlü taşınmasını sağlayan sistemlerdir. Bu çift yönlü taşımının gerçekleşmediği tek sistem adenozinin taşınmasından sorumlu CNT2 sistemidir<sup>14</sup>.

Besin maddeleri ve endojen moleküllerin beyne taşınmasıyla görevli çeşitli transport sistemleri;

- Glukoz ve mannozün taşınması için heksoz transport sistemi,
- Fenilalanin, lösin ve diğer nötral aminoasitler için nötral aminoasit transport sistemi,
- Glutamat ve aspartat için asidik aminoasit transport sistemi,
- Arjinin ve lizin için temel aminoasit transport sistemi,
- $\beta$ -Alanin ve torin için  $\beta$ -aminoasit transport sistemi,
- Laktat ve kısa zincirli yağ asitleri için monokarboksilik asit transport sistemi,
- Kaolin ve tiamin için kaolin transport sistemi,
- Mepiramin için amin transport sistemi,
- Purin bazları (adenin, guanin) için nükleozid transport sistemi,
- Vazopressin gibi küçük peptid molekülleri için peptid transport sistemi olarak sıralanabilir<sup>21</sup>.

Bu sistemlerden glukoz taşınmasında görev alan GLUT1 sistemi, nötral amino asitlerin taşınmasında görev alan LAT1 sistemi, monokarboksilik asitleri taşıyan MCT1 sistemi ve adenozinin taşınmasına

aracılık eden CNT2 sistemi, beyne aktif ilaç taşınmasında hedef olarak kullanılanlardır<sup>14</sup>.

TAT sistemleriyle beyne hedeflendirme stratejisinin temelini, söz konusu ilaç molekülünün bu sistemlerin ligandi olan endojen molekülleri taklit edecek şekilde yapı veya formülasyon değişikliğine uğratılması oluşturmaktadır. Bu yaklaşıma örnek olarak gabapentin molekülü verilebilir. Gabapentin ((1- aminometil) sikloheksanasetik asit),  $\alpha$ -aminoasit yapısında olmasına rağmen  $\alpha$ -aminoasit yapısını taklit ederek, büyük nötral aminoasitleri taşıyan LAT1 sistemi tarafından tanınmaktadır<sup>22</sup>.

İlaç molekülünün TAT sistemi kullanılarak KBE'yi aşabilmesi için uygulanacak alternatif bir yaklaşım da, molekülün bu sistemin ligandi olan glukoz gibi bir endojen molekülle konjugasyonunu sağlamaktır. Ancak bu yaklaşım genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bunun nedeni transport proteinlerin oluşturduğu stereoselektif özellikteki porların ilaç-endojen ligand yapısını tanıyamamasıdır<sup>14</sup>.

Beyinde bulunan söz konusu taşıyıcı sistemler çeşitli hastalık durumlarından etkilenmektedir. Beyin travması, epilepsi, iskemi ve Alzheimer Hastalığı gibi bozukluklarda endojen taşıyıcı sistemlerle çalışılırken, stratejilerin geliştirilmesi sırasında bu değişiklikler de göz önünde bulundurulmalıdır<sup>23</sup>.

### Aktif Effluks Transport Sistemleri

Aktif effluks sistemleri içerisinde en çok çalışılan ABCB1 geni ürünü olan p-glikoprotein (P-gp)'dir. KBE'de p-glikoprotein dışında ABC (ATP-binding cassette) gen ailesi ürünü olan daha pek çok enerji bağımlı aktif effluks taşıyıcı sistem de bulunmaktadır. Bu aileye dahil diğer effluks proteinler çoklu ilaç rezistans proteini (MRP/ABCC1-12) ve meme kanseri rezistans proteini (BCRP/ABCG2)'dir<sup>8</sup>.

Beyinden kana ilaç taşınmasıyla görevli AET sistemleri enerji bağımlı ve enerji bağımlı olmayan iki temel taşıyıcı seriden oluşmaktadır<sup>1</sup>. Serebral endoteli da kapsayan çeşitli dokularda bulunan p-glikoprotein ise, ATP'ye bağımlı olarak çalışan ve pek çok ilacın doku dışına atılımından sorumlu bir yapıdır<sup>24</sup>. Beyne hedeflendirme yapılırken, etki göstermesi beklenen ilaç molekülünün AET sistemlerinin substratı olup olmadığı önem taşımaktadır. Schinkel ve diğ.'nin yaptığı çalışmada, p-glikoproteininin digoksin, doksorubisin ve siklosporin A'nın beyinde bulunan

miktarları üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan mdr1 geni taşımayan (mdr1 knock-out) farelerde her üç ilacın da beyinde bulunan miktarlarında artış gözlenmiştir. Sonuçlar, her üç ilacın da beyne penetrasyonunun AET sistemleriyle kısıtlandığını göstermektedir<sup>21</sup>. Beyin kapiller endotelinde bulunan p-glikoprotein miktarı fokal serebral iskemi sonrası artmaktadır. Ayrıca P-gp'nin farmakolojik inhibisyonu veya genetik olarak inaktive edilmesinin, P-gp substratı oldukları bilinen ve iskemik beyin dokusunda nörolojik koruma sağlayan birtakım maddelerin miktar ve etkisinde artışa neden olması MDR-1 inhibisyonunun nörolojik koruma sağlayan tedavi etkinliğini artırabileceğini göstermiştir<sup>23</sup>.

KBE yapısında bulunan AET sistemlerinin inhibe edilebilmesi için genel olarak iki yaklaşım benimsenmektedir. Bunlardan ilki, effluks sistemleri için spesifik inhibitörler kullanarak bu taşıyıcıların substratlarının SSS'ye geçişinin sağlanmasıdır. Diğer bir yaklaşım ise, etkinliği bilinen ve ABC taşıyıcı sistemler nedeniyle düşük KBE penetrasyonuna sahip moleküllerin analoglarının tasarlanmasıdır<sup>8</sup>.

Her iki yaklaşımda da başarı sağlanabilmesi, ABC effluks transport sistemlerinin yapı aktivite ilişkilerinin detaylı olarak bilinmesi yoluyla gerçekleşebilir. Ancak AET sistemleri, substratlarıyla bilinen enzim-substrat/anahtar-kilit modeli temelinde etkileşmez ve bu nedenle standart Michealis-Menten kinetiğiyle bu etkileşim açıklanamaz<sup>8</sup>.

P-glikoprotein, MRP VE BCRP effluks pompalarını inhibe edebilmek için kompetitif ve non-kompetitif özellikte pek çok inhibitör geliştirilmiştir<sup>8</sup>. Sözü edilen ABC taşıyıcı inhibitörleri yardımıyla KBE'yi geçemeyen AET substratı moleküllerin beyne taşınmasında artış sağlanmaktadır. Ancak bu taşıyıcıların inaktive edilmesinin, dolaşımdaki toksik maddelerin de beyne girişini kolaylaştırarak uzun vadede olumsuz sonuçlara neden olabileceği göz önünde tutulmalıdır<sup>8</sup>.

### Reseptör Aracılı Transport Sistemleri

Dolaşımdaki bazı büyük moleküllü peptidler RAT sistemleriyle etkileşerek KBE'yi aşabilmektedirler. Beyin kapiller endotelinde düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), insülin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF1-IGF2), interlökin-1 (IL1), folik asit ve transferrin için spesifik reseptörler bulunmaktadır. Buna rağmen reseptör aracılı transitoz sadece insülin ve transferrin reseptörleri için gösterilmiştir<sup>6</sup>.

Peptid yapılı moleküllerin RAT sistemleriyle KBE'yi geçişi alanında çalışmalar 1980'lerin ortalarında insanda beyin endotel yapısında bulunan insülin reseptörünün, insülinin KBE'den in vitro endositoz ve in vivo transitozla geçişinde görev yaptığının bulunmasıyla başlamıştır. Endotelial sıkı kavşakların varlığı paraselüler yolla geçişi imkansız kıldığından insülin için geçerli tek mekanizma reseptör aracılı transport olarak görülmektedir. İnsülin benzeri büyüme faktörleri, leptin ve transferinin de aynı mekanizmayla KBE'yi geçtiği bilinmektedir<sup>25</sup>. İnsan ve hayvanlarda yapılan otopsi sonucunda izole edilen kapillerlerle yapılan çalışmalarda insülinin, kapillerler üzerinde bulunan spesifik reseptörlere doygunluğa ulaşan bir mekanizmayla bağlandığı görülmüştür<sup>25</sup>. Bu bölümde hedeflendirme alanında üzerinde en çok çalışılan iki reseptör üzerinde durulacaktır.

### Transferrin Reseptörü

Beyin kapillerlerinde çokça bulunan transferrin reseptörü (TfR), demirin beyne taşınmasında görev alan reseptör aracılı transport sistemlerindedir. TfR'nin doğal substratı, transferrin (Tf) olarak adlandırılan ve demiri bağlayan bir proteindir<sup>26</sup>. Transferrinler demiri absorpsiyon, depolanma ve kullanım bölgelerine taşımakla görevlidir<sup>27</sup>.

Tf'nin taşınması hakkında hala var olan sorulara rağmen bu protein beyne hedeflendirmede kullanılmaktadır. Örneğin, Shin ve diğ., en etkili taşınmanın sağlanması amacıyla, Tf'nin esas bağlanma bölgesinin tespiti için Tf ile konjuge, iyotlanmış IgG3 antikorunu kullanmışlardır. IgG3'le esas bağlanma bölgesinden konjuge edilmiş Tf'nin, enjekte edilen dozun alındığı en yüksek oran olan % 0.3 ile beyne taşındığı tespit edilmiştir<sup>28</sup>. Antiviral bir bileşik olan azidotimidin (AZT), Tf hedeflendirilmiş ve polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş albümin nanopartikülleriyle (PEG-NP) beyne taşınmıştır. Hedeflendirilmiş PEG-NP kullanılarak yapılan uygulama sonrası sıçan beyninde bulunan AZT miktarı % 21.1 iken, hedeflendirilmemiş PEG-NP sistemi kullanıldığında bu oran % 9.3 olarak bulunmuştur<sup>29</sup>. Yürütülen başka bir çalışmada Tf, malign beyin tümörlerine difteri toksini (CRM 107) hedeflendirmede kullanılmıştır. Tf ile konjuge edilmiş difteri toksini, geleneksel tedaviye dirençli serebral tümörü olan hastalarda herhangi sistemik bir toksisite göstermeksizin tümör hücrelerinden cevap alınmasına olanak vermiştir<sup>6</sup>.

Üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen, beyne ilaç hedeflendirmede Tf ideal bir vektör değildir. TfR vücutta doğal olarak bulunan yüksek miktardaki Tf ile doygun halde olduğundan, Tf ile hedeflendirilmiş ilaç molekülünün reseptörle etkileşebilmesi için doğal ligandla yarışması gerekir. Bu sebeple TfR'ye spesifik monoklonal antikorlar (MAb) kullanılarak yapılan hedeflendirme çalışmaları uygulanmakta ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir<sup>26</sup>. Sumbria ve diğ.'nin yürüttüğü çalışmada, inme tedavisi için nöroprotektif ve antiinflamatuar etkin maddeler kombine olarak TfR füzyon proteinleri formunda uygulanmıştır. Tedavi sonrası, tek başına uygulanan nöron koruyucu etkin maddeye göre kombine uygulanan füzyon proteinlerin beyinin farklı bölgelerindeki infarkt hacimlerde %30'dan %69'a kadar azalma sağladığı gözlenmiştir<sup>30</sup>.

Beyne ilaç hedeflendirmede non-invazif olarak pek çok ilaca uygulanabilen başarılı bir yöntem olan TfR'ye yönlendirilmiş MAb kullanımının bazı sakıncaları da bulunmaktadır. TfR periferel dokularda da yoğun olarak bulunan bir yapı olduğundan spesifik olarak beyne hedeflendirme özelliği kısıtlı kalmaktadır. Ancak beyne spesifik gen dizileri kullanılarak elde edilen MAb'lerin kullanılması beyne olan seçiciliğin artırılmasını sağlamaktadır. Bu sayede gözlenebilecek yan etkiler en aza indirilmektedir<sup>26</sup>.

### İnsülin Reseptörü

İnsülin reseptörü de TfR gibi beyin kapiller endotel hücrelerinin luminal membranında ve beyindeki diğer hücrelerin plazma membranlarında bulunmaktadır<sup>26</sup>. Transferrin için denenmiş olan, endojen ligandla ilaç molekülünün konjugasyonuna dayanan yaklaşım insülin için uygulanmamıştır. İnsülinin dolaşımında 10 dakika gibi kısa bir yarılanma ömrüne sahip olması ve doğal insülin dengesinin bozulmasına neden olabilecek bu yaklaşımın hipoglisemiyle sonuçlanma ihtimali bu alanda çalışmayı önlemiştir. Ancak reseptöre spesifik antikorlarla hedeflendirme denemeleri insülin için de çalışılan konular arasındadır<sup>31</sup>.

Murin insan insülin reseptörü (HIR)-MAb'si bu proteine karşı gelişen immün reaksiyon nedeniyle insanlarda beyne hedeflendirmede kullanılamaz. Bu sebeple hemşimerik HIR-MAb hem de humanize HIR-MAb, insanlarda ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmak üzere geliştirilmiştir<sup>3</sup>. Son yıllarda HIR-MAb ile yürütülen çalışmalarda özellikle görüntüleme

alanında ümit vaad eden sonuçlar elde edilmektedir. Boado ve diğ.'nin yürüttüğü çalışmada radyoizotop ile işaretlenen iduronat 2-sülfataz (IDS) adlı lizozomal enzim, HIRMAb ile füzyon protein yapısında Resus maymunlarına uygulanmıştır. IDS enzimi tek başına KBE'yi geçemezken, yapılan görüntüleme sonucu HIRMAb-IDS füzyon proteinlerinin % 1'inin uygulama sonrası beyin tarafından alındığı gözlenmiştir<sup>32</sup>.

Kalp, iskelet kasları ve yağ dokusundaki parenkimal hücrelerde yüksek düzeylerde insülin reseptörü bulunmaktadır. Ancak bu organları besleyen kapillerlerde yaklaşık olarak 100 nm boyutunda olan nanopartiküllerin organ içine geçişini engelleyen endotel bariyerler bulunmaktadır. Bunun yanı sıra kalp, iskelet kasları ve yağ dokusunda bulunan bu kapillerlerin endotellerinde beyin ve gözde olduğu gibi insülin reseptörü yoktur. Benzer bir şekilde karaciğer ve dalağı besleyen mikrodamarlarda da insülin reseptörleri bulunmamaktadır. Ancak karaciğer ve dalakta var olan sinuzoidal mikrosirkülasyon yatakları 100 nm civarında bir büyüklüğe sahip nanopartiküller için tamamen geçirgen bir özellik gösterdiğinden, uygulanan nanopartiküller bu bariyeri geçerek parenkimal hücrelerdeki insülin reseptörleri ile etkileşmektedir. Bu sebeplerle dokuya özgü reseptör substratlarının ilaç taşıyıcı sistemlere eklenmesi, uygulanan ilaç molekülünün spesifik olarak istenen dokuda etki göstermesini sağlayacak, diğer dokularda birikmeye ve istenmeyen etkilere neden olmayacaktır<sup>33</sup>.

### *Tartışma ve Sonuç*

Bilindiği gibi KBE, SSS için ilaç geliştirilmesinde engel teşkil eden en önemli faktördür. Küçük moleküllü ilaçlarla tedavi edilebilen depresyon, şizofreni, kronik ağrı ve epilepsi gibi SSS bozuklukları dışındaki hastalıkların tedavi edilebilmesi için yeni ilaç moleküllerinin keşfine paralel olarak KBE'yi geçebilecek ve beyne spesifik hedeflendirme sağlayabilecek sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir<sup>14</sup>. Son yıllarda tedavide sıklıkla yer bulan yeni nesil biyoteknoloji ürünleri, lipid ve protein yapıdaki büyük moleküller, beyne spesifik hedeflendirme sağlayacak sistemlerin yetersizliği dolayısıyla SSS için yeterli kullanım alanı bulamamaktadır<sup>34</sup>.

Biyolojik temelli yaklaşımlara dayanan nanopartiküler sistemlerle KBE sorununa çözüm aranmaktadır. Beyinde anatomik olarak bu-

lunan endojen taşıyıcı sistemler ile nanopartiküler sistemlerin beyne hedeflendirmede sağladığı avantajların beraber kullanıldığı stratejiler sayesinde, insanda klinik olarak uygulanabilir özellikte ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilebilmesi için adımlar atılmaktadır<sup>35</sup>. Genetik olarak insanda kullanıma uygun hale getirilmiş MTH teknolojileri yardımıyla büyük moleküllü nörofarmasötiklerin insan beyninde gelişen bozukluklara karşı kullanılması bu alanda beklenen gelişmelerdendir<sup>1</sup>.

Beyne ilaç hedeflendirme alanında gelinen noktada, gelişmelerin hızlanması ve klinikte kullanılabilir özellikte yeni nörofarmasötikler geliştirilebilmesi için, beyindeki endojen taşıyıcı sistemlerin işleyişinin tam olarak aydınlatılmasına ve bu sistemlere dayanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı modellerin moleküler biyoloji ve genetik yaklaşımlarla desteklenerek yeniden formüle edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

### Özet

Santral Sinir Sistemi (SSS) bozukluklarında kullanılmak üzere yeni ilaç molekülleri ve tedavilerin geliştirilmesi, beyin mikrodamarlarında bulunan sıkı kavşakların oluşturduğu Kan-Beyin Engeli (KBE) tarafından kısıtlanmaktadır. KBE, beyni toksik ve zararlı bileşiklerden korurken aynı zamanda çok sayıda ilaç molekülü için de engel teşkil etmektedir. Bu sebeple şizofreni, depresyon ve insomniayı kapsayan küçük bir grup dışındaki SSS hastalıkları KBE sebebiyle tedavi edilememektedir. SSS için ilaç geliştirilmesinde geri kalınmasının nedeni, yeni ilaç keşfi ve hedeflendirmenin iki ayrı disiplin olarak düşünülmesidir. Diğer alanlarda olduğu gibi gelişmenin yakalanabilmesi için temel yaklaşım, yeni ilaç molekülü ve hedeflendirme araştırmalarının beraber yürütülmesidir. Beyne ilaç hedeflendirme stratejileri, kimyasal ve biyoloji temelli disiplinlere dayanan iki gruba ayrılabilir. Geçmiş yıllarda, KBE'ye ilaç hedeflendirmede yapılan çalışmalar kimyasal yaklaşımlar alanında yoğunlaşmaktadır. Ancak günümüzde, biyolojik stratejilere dayanan, beyin kapiller endotel hücrelerindeki spesifik reseptörlere hedeflendirilmiş nanopartiküler sistemlerle umut verici çalışmalar yürütülmektedir. Bu derlemenin amacı, yeni stratejileri daha iyi anlayabilmek için, yürütülmüş önceki çalışmaların izlenmesine ek olarak yeni sistemlerin temellerinin incelenmesidir.



*Anahtar kelimeler:* İlaç hedeflendirme, kan-beyin engeli, reseptör aracılı transport

### *Summary*

#### **Brain Drug Targeting**

The development of new drug candidates and cures for Central Nervous System (CNS) disorders is restricted owing to the Blood-Brain Barrier (BBB) formed by the endothelial tight junctions within the brain microvasculature. The BBB protects brain from toxic and harmful compounds, but it also represents an obstacle for a large number of drugs. Thus, there are number of Central Nervous System (CNS) diseases that cannot be treated owing to the BBB problem, except the small group of CNS disorders including schizophrenia, depression and insomnia. The lag in CNS drug development is due to the fact that drug discovering and drug targeting are conducted as two separate disciplines. The major point to catch up with the progress in any other developing area is to carry on the researches for new drug development and targeting together. The brain drug targeting strategies can be divided into two groups derived from either chemistry based or biology-based disciplines. For the past decades, there has been a research interest in the area of chemical approaches for BBB targeting. But nowadays, promising applications of brain drug targeting have been done based on biologic strategies by nanoparticulate systems targeting specific receptors expressed in brain capillary endothelial cells. Therefore, the aim of this present review is to follow the time line of previous approaches to access to the CNS for better understanding of the new strategies as well as the basis of novel targeting systems.

*Keywords:* Drug targeting, blood-brain barrier, receptor mediated transport

*KAYNAKLAR*

1. Pardridge, W.M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, 12 (1-2), 54-61 (2007).
2. Pardridge, W.M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2 (1), 3-14 (2005).
3. Pardridge, W.M. Re-engineering biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses. *Bioconjug Chem*, 19 (7), 1327-1338 (2008).
4. Pardridge, W.M. Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery. *Curr Opin Pharmacol*, 6 (5), 494-500 (2006).
5. Pardridge, W.M. William Pardridge discusses the lack of BBB research. Interview by Rebecca N. Lawrence. *Drug Discov Today*, 7 (4), 223-226 (2002).
6. Beduneau, A., Saulnier, P., Benoit, J.P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*, 28 (33), 4947-4967 (2007).
7. Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7 (1), 41-53 (2006).
8. Begley, D.J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther*, 104 (1), 29-45 (2004).
9. Pardridge, W.M. BBB-Genomics: creating new openings for brain-drug targeting. *Drug Discov Today*, 6 (8), 381-383 (2001).
10. Syvänen S., X.R., Sahin S., Hammarlund-Udenaes M. Pharmacokinetic Consequences of Active Drug Efflux at the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutical Research*, 23, 705-717 (2006).
11. Pardridge, W.M. (2001). *Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development*: Cambridge University Press.
12. Pardridge, W.M. Drug delivery to the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17 (7), 713-731 (1997).
13. Pardridge, W.M. Drug targeting to the brain. *Pharm Res*, 24 (9), 1733-1744 (2007).
14. Pardridge, W.M. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv*, 3 (2), 90-105, 151 (2003).
15. Oldendorf, W.H., Hyman, S., Braun, L., and Ordendorf, S.Z. Blood-brain barrier penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science*, 178, 984-986 (1973).
16. Trauble, H. Movement of Molecules across Lipid Membranes - Molecular Theory. *Journal of Membrane Biology*, 4 (2), 193-& (1971).
17. Wade, L.A., Katzman, R. Rat brain regional uptake and decarboxylation of L-DOPA following carotid injection. *The American journal of physiology*, 228 (2), 352-359 (1975).
18. L. A. Wade, R.K. Synthetic Amino Acids and the Nature of L-Dopa Transport at the Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry*, 25 (6), 837-842 (1975).
19. Cornford E.M., H.S. Localization of Brain Endothelial Luminal and Abluminal Transporters with Immunogold Electron Microscopy. *NeuroRX*, 2 (1), 27-43 (2005).
20. Tamai I., T.A. Transporter-Mediated Permeation of Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89 (11), 1371-1388 (2000).
21. Tsuji, A., Tamai, I.I. Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 36 (2-3), 277-290 (1999).
22. Uchino, H., Kanai, Y., Kim, D.K., Wempe, M.F., Chairoungdua, A., Morimoto, E. ve diğeri. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid

- transporter 1 (LAT1): Insights into the mechanisms of substrate recognition. *Molecular Pharmacology*, 61 (4), 729-737 (2002).
23. Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., Kanmogne, G.D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuro-immune Pharmacol*, 1 (3), 223-236 (2006).
  24. Yong-Eun Lee Koo, G.R.R., Mahaveer Bhojani, Randy Schneider, M.A.P., Alnawaz Rehemtulla, Brian D. Ross, R.K. Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplat-forms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1556-1577 (2006).
  25. Pardridge, W.M. Vector-mediated drug delivery to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36 (2-3), 299-321 (1999).
  26. Jones, A.R., Shusta, E.V. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res*, 24 (9), 1759-1771 (2007).
  27. Li H., S.H., Qian Z.M. The role of the transferrin-transferrin-receptor system in drug delivery and targeting. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23 (5), 206-209 (2002).
  28. Shin, S.U., Friden, P., Moran, M., Olson, T., Kang, Y.S., Pardridge, W.M. ve diğerleri. Transferrin-antibody fusion proteins are effective in brain targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (7), 2820-2824 (1995).
  29. Mishra, V., Mahor, S., Rawat, A., Gupta, P.N., Dubey, P., Khatri, K. ve diğerleri. Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *Journal of drug targeting*, 14 (1), 45-53 (2006).
  30. Sumbria, R.K., Boado, R.J., Pardridge, W.M. Combination stroke therapy in the mouse with blood-brain barrier penetrating IgG-GDNF and IgG-TNF decoy receptor fusion proteins. *Brain research*, 1507, 91-96 (2013).
  31. 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).
  32. Boado, R.J., Hui, E.K., Lu, J.Z., Sumbria, R.K., Pardridge, W.M. Blood-brain barrier molecular trojan horse enables imaging of brain uptake of radioiodinated recombinant protein in the rhesus monkey. *Bioconjugate Chemistry*, 24 (10), 1741-1749 (2013).
  33. Pardridge, W.M. shRNA and siRNA delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev*, 59 (2-3), 141-152 (2007).
  34. 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).
  35. 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).

