

Die Lunge als Applikationsort für Peptide, Proteine und Gentherapeutika

Michael Bur und Claus-Michael Lehr, Universität des Saarlandes

1. Grundlegendes

Aufgrund der beachtlichen Fortschritte auf dem Gebiet der rekombinanten DNA Technologie in den letzten 20 Jahren ist es heute möglich Proteine und Peptide in ausreichend großer Menge und Reinheit für die therapeutische Verwendung zu synthetisieren. Die sehr spezifische Wirkung an molekular definierten Targets bewirkt die geringen Nebenwirkungen von Proteinen und Peptiden und stellt damit einen großen Vorteil für den Patienten dar. Hunderte synthetisierter Proteine und Peptide wurden mittlerweile als hochwirksame Substanzen identifiziert und warten auf ihre therapeutische Anwendung. Einige Eigenschaften von Proteinen bereiten allerdings Schwierigkeiten bei der galenischen Formulierung und der Applikation. Allen Proteinen und Peptiden sind hohe molekulare Masse, geringe Lipophilie und geringe chemische und enzymatische Stabilität gemeinsam. Dadurch können die meisten Proteine und Peptide nicht in Form von Tabletten oder anderen Arzneiformen oral appliziert werden. Mit wenigen Ausnahmen werden praktisch alle auf dem Markt befindlichen Proteine und Peptide mit systemischer Wirkung durch Injektion verabreicht. Um zukünftig auch die nicht parenterale Applikation von Proteinen und Peptiden zu ermöglichen werden zurzeit zwei verschiedene Strategien verfolgt. Einerseits versucht man durch galenische Maßnahmen wie Mikroverkapselung, Einschluss in nanopartikulären Strukturen oder ähnliches die Stabilität und Resorption bei der peroralen Applikation zu erhöhen, andererseits sucht man nach alternativen Applikationsorten. Vor allem im Falle der Behandlung chronischer Erkrankungen, welche eine Langzeittherapie erfordern sucht man nach nicht invasiven Applikationswegen, da invasive Applikationswege immer das gesundheitliche Risiko der zudem schmerzhaften Injektion, die Notwendigkeit von medizinisch geschulten Personal und eine nur geringe Patienten Compliance beinhalten. Als eine Alternative bietet sich die pulmonale Applikation aufgrund verschiedener Vorteile an:

- Sehr große Resorptionsfläche des Alveolarepithels zwischen 100 und 140 m²
- Sehr dünne Resorptionsbarriere (unter 10 µm)
- Geringes Flüssigkeitsvolumen (nur zwischen 7 und 20 ml), dadurch bedingte hohe Konzentrationsgradienten bei löslichen Substanzen
- Sehr geringe enzymatische Ausstattung
- Hoher Blutfluss in der Lunge
- Resorption unter Umgehung des First Pass Effekt

Jedoch ist im Falle der pulmonalen Verabreichung zwischen Applikationsort und Wirkort mit dem Alveolarepithel eine der dichtesten Barrieren des Körpers („Luft- Blut- Schranke“) geschaltet.

2. Anatomische Grundlagen

Die Lunge besteht aus zwei anatomisch und funktionell unterschiedlichen Bereichen, den zuleitenden Atemwegen und der Alveolarregion. Die zuleitenden Atemwege bestehen aus der

Nasenhöhle, dem Mund und Rachenraum, den Bronchien und den Bronchiolen. Der Einteilung von Weibel [1] folgend rechnet man die ersten 16 Generationen des Lungenbaumes zum bronchialen Bereich, und die Generationen 17 bis 23 zum Alveolarbereich. Den zuleitenden Luftwegen obliegt die Luftführung, Anwärmung und Befeuchtung. Über diese rein physikalischen Aufgaben hinaus erfüllt der Bronchialbaum auch eine Clearancefunktion. Mit Hilfe von Zilien und Mucus, welche die gesamte Oberfläche der Bronchien (rund 2m^2) bedecken, kann der Körper in der Atemluft enthaltene Fremdkörper, Partikel, Sporen und Bakterien herausfiltern und durch einen zum Rachen gerichteten Transport aus der Lunge entfernen. Der Funktion entsprechend handelt es sich beim Bronchialepithel um ein zilientragendes schleimsezernierendes Säulenepithel.

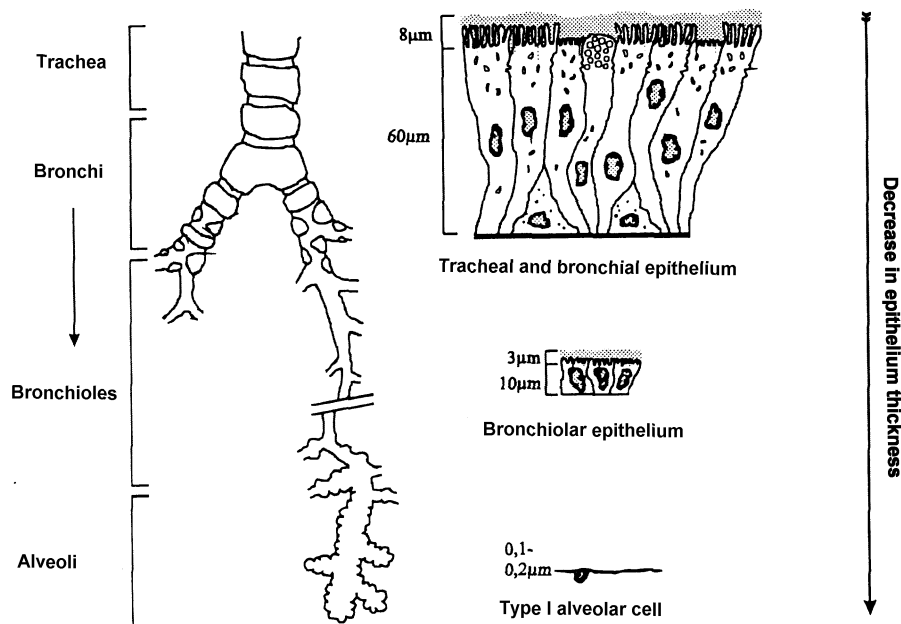


Abbildung 1: Verzweigungen des Atemwegssystems, relative Größe der Epithelzellen in den verschiedenen Regionen der Lunge, modifiziert nach Patton et al.1996 [2].

Eine gänzlich andere Epithelgestaltung findet man in der tiefen Lunge vor. Hier findet der Gasaustausch statt. Um kurze Diffusionswege für die Atemgase zu ermöglichen, ist das Alveolarepithel ausgesprochen dünn. Den größten Teil der Oberfläche bilden die Typ I Zellen, die zwar eine sehr große Flächenausdehnung aufweisen, aber nur eine sehr geringe Dicke von ungefähr $0,1\ \mu\text{m}$ besitzen. Der zweite wichtige Zelltyp in der tiefen Lunge ist die Typ II Zelle. Hierbei handelt es sich um einen kubischen Zelltyp, dessen Funktion die Bildung des Surfactant ist. Darüber hinaus dient die Typ II Zelle als Vorläufer der fragilen Typ I Zellen, und kann im Verletzungsfall zur Typ I Zelle differenzieren. Der Surfactant erniedrigt die Oberflächenspannung und ermöglicht dadurch die feine schwammförmige Struktur der Lunge und verhindert das Kollabieren der Lungenbläschen während der Expiration. Surfactant ist ein Gemisch von Phospholipiden und Surfactantproteinen, welche oberflächenaktive Eigenschaften aufweisen.

3. Barrieren der pulmonalen Resorption für Proteine und Peptide

Inhalierte Aerosolarzneistoffe mit einem aerodynamischen Partikeldurchmesser zwischen 1 und $3\ \mu\text{m}$ gelangen in die tiefe Lunge und sedimentieren aufgrund der Schwerkraft. Partikel, welche größer als $3\ \mu\text{m}$ sind werden in den oberen Luftwegen durch Impaktion abgeschieden, kleinere

Partikel zwischen 50 nm und 1 µm werden wieder ausgeatmet. Sehr kleine Nanopartikel mit einem Durchmesser unter 50 nm werden aufgrund ihrer raschen Diffusion (Brown'sche Molekularbewegung) ebenfalls in der tiefen Lunge deponiert und festgehalten. Partikel welche in den oberen Luftwegen deponiert werden stehen meist nicht zu einer systemischen Resorption zur Verfügung. Niven [3] identifizierte bronchialen Mucus, mucoziliäre Clearance, Surfactant, Makrophagen, pulmonale Enzyme, alveolares Epithel, Basalmembran und Endothel als Barrieren für eine erfolgreiche Resorption von inhalierten biotherapeutischen Wirkstoffen. Mucus (1-10 µm dick) oder Surfactant (0,1-0,2 µm dick) stellen die ersten physikalischen Barrieren für die Resorption von Proteinen und Peptiden dar. Obwohl sowohl das Alveolarepithel als auch das kapillare Endothel eine hohe Permeabilität für Gase, Wasser und lipophile Substanzen aufweisen, ist die Resorption von großen hydrophilen Molekülen und geladenen Verbindungen sehr eingeschränkt. Durch die Tight Junctions des Epithels können nur Moleküle mit einem Maximaldurchmesser von 0,6 nm hindurch wandern. Die endothelialen Tight Junctions erlauben immerhin noch einen Durchtritt von Molekülen mit einem Durchmesser von bis zu 6 nm. Größere Moleküle müssen mittels Endozytose durch das Epithel transportiert werden. Unterhalb des Epithels befindet sich die Basalmembran, eine dichte Matrix aus Glykoproteinen mit einer Dicke von 20- 25 nm.

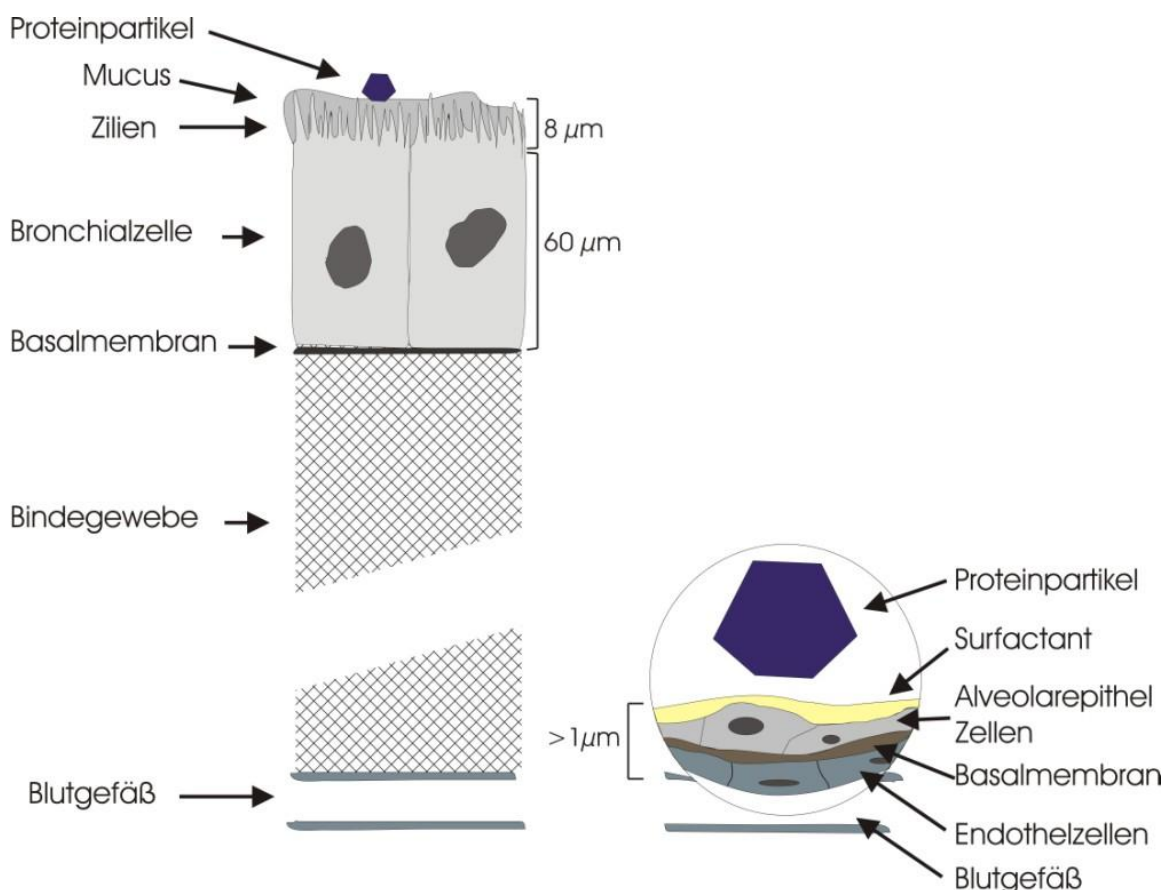


Abbildung 2: Die unterschiedlichen Ausmaße der Resorptionsbarrieren in Bronchialtrakt (links) und Alveolarbereich (rechts).

Trotz der geringen enzymatischen Ausstattung des Alveolarraumes, wird ein großer Anteil der deponierten Proteine und Peptide entweder von Proteasen und enzymatisch aktiven Serumproteinen gespalten, oder es kommt zur Phagozytose durch die Alveolarmakrophagen. Die Makrophagen sezernieren Peroxidasen und inflammatorische bzw. immunmodulatorische

Mediatoren. Im Rahmen dieser Abwehrmechanismen kann es auch zur Degradation von Proteinen kommen. Auch die Epithelzellschicht enthält vor allem intrazellulär zahlreiche Proteasen und Peptidasen. Der schnelle Abtransport durch die mucoziliäre Clearance, die Mucusschicht, und die Dicke des Säulenepithels schränken die systemische Resorption von Arzneistoffen im Bronchialbereich zusätzlich stark ein. Ausreichend hohe Resorptionsleistungen sind nur in der tiefen Lunge möglich.

Trotz dieser Schwierigkeiten stellt die pulmonale Applikation von Proteinen und Peptiden im Vergleich zur peroralen Applikation eine echte Alternative dar.

4. Systemische Therapie mit Proteinen/ Peptiden

Vor allem die pulmonale Applikation von Hormonen wie z.B. Insulin, Wachstumshormon, Somatostatin, TSH und FSH wurde in den letzten Jahren ausgiebig untersucht. Der bedeutendste Vertreter aus dieser Gruppe, das Insulin, wurde in seiner inhalativen Form unter dem Markennamen Exubera® 2006 von FDA und EMEA zugelassen. Insulin als Polypeptid wird bei peroraler Einnahme von Magensäure und intestinalen Enzymen zerstört, und wäre überdies zu groß um als intaktes Molekül hinreichend schnell die Darmmukosa zu durchqueren. Eine der ersten Studien, die sich systematisch mit der pulmonalen Applikation von Insulin beschäftigte, waren die Untersuchungen von Wigley et al. 1971 [4]. Erste Versuche mit inhalierbarem Insulin gehen sogar bis ins Jahr 1920 zurück [5].

Die Firmenkooperation Pfizer/Aventis entwickelte mit dem amerikanischen Unternehmen Nektar das pulverförmige inhalierbare Insulinpräparat Exubera®. Das gelöste Insulin wird unter Zusatz von Mannitol, Glycin, Natriumcitrat und Natriumhydroxid sprühgetrocknet. Man erhält sehr feine, amorphe, glasstabilisierte Partikel, die gut haltbar sind und eine sehr enge Korngrößenverteilung (2 bis 4 µm) aufweisen. Ein Partikel enthält circa 300 Millionen Insulinmoleküle.

In der glasstabilisierten Form sind die Proteinmoleküle weitgehend immobilisiert, wodurch Sekundär- und Tertiärstruktur und damit die Wirksamkeit des Insulins erhalten bleiben. Das Pulver ist zwar resistent gegen mikrobiellen Befall und bei Raumtemperatur auch physikalisch und chemisch gut haltbar, jedoch sehr hygroskopisch. Deshalb wurde jede Einzeldosis in einzelne, vor Feuchtigkeit schützende Blister verpackt, was eine stufenlose Dosierung unmöglich machte. Die Applikation erfolgte mit einem Druckluft- unterstützten Inhalator, der in einem Spacer einen feinverteilten Pulvernebel erzeugte, der vom Patienten mit mehreren tiefen Inspirationen eingeatmet werden konnte. Exubera® wurde in der klinischen Phase III an mehr als 3000 Patienten mit Diabetes getestet. Besonderes Augenmerk der Studie lag auf der Effektivität der Blutzuckersenkung im Vergleich zu gespritztem Humaninsulin sowie zu oralen Antidiabetika, auf inter- und intraindividuellen Variabilitäten der Blutglukosesenkung, Auswirkung des Rauchens, Entwicklung von Insulinantikörpern sowie Sicherheit der Therapie bei Langzeitanwendung. Es wurde eine absolute Bioverfügbarkeit von 10 % gefunden, jedoch ansonsten keine nachteiligen Effekte. Es schien auch bei Langzeitanwendung nicht zu einer Veränderung der Lungengewebsstruktur zu kommen, was von manchen Forschern, aufgrund der Wirkung des Insulins als Wachstumsfaktor, erwartet wurde. Im Vergleich zu den parenteral verabreichten Insulinen wirkt inhalatives Insulin wesentlich schneller, da das Hormon im letzteren Fall nicht erst aus dem Fettgewebe in den Blutkreislauf diffundieren muss.

Als Ergebnis der klinischen Studie erhielt Exubera® 2006 die Zulassung zur Behandlung des Diabetes mellitus bei Patienten die älter als 18 Jahre sind, keine pulmonale Erkrankung aufweisen und mindestens seit 6 Monaten nicht mehr rauchen. Neben fehlendem wirtschaftlichen Erfolg, der teilweise durch die erhöhten Therapiekosten zu erklären ist, da neben den Kosten für das inhalative Rapidinsulin Exubera®, auch noch Kosten für die Therapie mit dem parenteralen

Basalinsulin anfielen, wurde auch über ein verstärktes Lungenkarzinom Risiko unter der Behandlung mit Exubera[®] berichtet. Da es sich bei allen betroffenen Patienten um ehemalige Raucher handelte konnte eine Kausalität zwischen erhöhtem Lungencarcinomrisiko und Exubera[®] nicht endgültig belegt werden. Jedoch kam es Ende 2007 zur Einstellung des Vertriebes von Exubera[®] in Europa und den USA. Auch die Weiterentwicklung des Präparates AERx (Eli Lilly, Alkermes und Novo Nordisk) wurde trotz Erfolg versprechender Phase III Studie eingestellt. Interessant erscheint zurzeit die Technosphere[®] Formulierung von Mannkind Pharmaceuticals, wobei es sich um ein Trockenpulveraerosol mit Diketopiperazin als Absorptionenhancer handelt. Auch wenn dem ersten inhalierbaren Insulin der wirtschaftliche Erfolg verwehrt blieb, so hat sich doch gezeigt, dass eine inhalative Therapie mit einem hochmolekularen Protein machbar ist.

Weitere, teils sich in der klinischen Prüfung befindende, interessante Kandidaten für eine pulmonale Applikation sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Substanzgruppe	Substanz	Molekulargewicht [Da]	Indikation
Heparin	Fraktioniertes/unfraktioniertes Heparin	4000 - 15000	Prävention tiefer Beinvenenthrombosen, Myokardinfarkt
Hormone (Proteohormone) einschließlich deren Analoga	Calcitonin	4500	Osteoporose, M. Paget
	Cetrorelix/Detirelix	1430/1500	Gonadorelin Rezeptorantagonist / Fertilitätssteigerung
	Epoetin	14700	Anämie
	Follikel Stimulierendes Hormon (FSH)	36000	Hormonersatztherapie
	Glucagon	3600	Hormonersatztherapie
	Thyreoida Stimulierendes Hormon (TSH)	24000 – 30000	Hypothyreose
	Insulin	6000	Diabetes mellitus
	Leuprolide	1200	Endometriose, Prostatacarcinom
	Prolaktin	23000	Hormonersatztherapie
	rhG-CSF (PEGyliert)	18800 - 36000	Chronische Granulozytopenie, AIDS
	Oxytocin	1000	Hormonersatz
	Parathyroidhormon	4300	Osteoporose, M. Paget
Wachstumshormon	22100	Hypophysärer Kleinwuchs	
Immunsuppressiva bzw. Immunmodulatoren	Cyclosporin A	1200	Transplantatabstoßung
	α - Interferon	19000 – 22000	Hepatitis, Tumorthherapie
	β - Interferon	19000 – 22000	Multiple Sklerose, Tumorthherapie
	γ - Interferon	16000 - 22000	Tumorthherapie
	Consensus Interferon (rCon-IFN)	19600	Hepatitis C
Peptide / Proteine	Bactericidal permeability increasing protein (BPI)	55000	Gram-negative Infektionen der Atemwege
	Fab-Fragmente	50000 - 100000	Impfung
	Faktor IX	57000	Haemophilie B
	Hirudin	7000	Antikoagulans
	Renin-inhibitorische Peptide	1000	Hypertonie
	Protein C	60000	Thrombophilie
Prostaglandine	Iloprost	360	Primäre pulmonale Hypertonie
	Prostaglandin E ₁ und I ₂	360	Primäre pulmonale Hypertonie

5. Proteine zur inhalativen Gentherapie

Neben den bereits erwähnten Peptiden und Proteinen ist auch die pulmonale Applikation von Gentherapeutika auf der Basis von DNA/RNA Molekülen von Interesse.

Eine Krankheit bei der die Anwendung der pulmonalen Gentherapie in absehbarer Zeit möglich sein wird ist die zystische Fibrose, im deutschen Sprachgebrauch auch Mukoviszidose genannt. Hervorgerufen wird die Krankheit durch einen Defekt in einem Gen, das in den Bronchialepithelzellen und in den Zellmembranen von Darm, Leber, Pankreas und Schweißdrüsen für einen Kanal für Chlorid-Ionen kodiert. Derzeit sind ca. 970 verschiedene Mutationen in diesem Gen bekannt, das den Namen CFTR-Gen (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Gen) erhalten hat. Der häufigste auftretende Defekt im CFTR-Gen ist der Delta F 508 Defekt. Es bezeichnet ein Fehlen (delta) der Aminosäure Phenylalanin („F“) an der Stelle 508 der Proteinkette. Etwa 50% der Erkrankten weisen die Delta F 508 Abweichung auf. Die bisherige symptomatische Therapie der Mukoviszidose konzentriert sich auf die Kontrolle der Atemwegsinfektionen, die Mobilisierung des Schleimes und die Behandlung der pulmonalen Entzündungen. Neben den medikamentösen Behandlungen könnte in Zukunft die Gentherapie zur Verfügung stehen. Dafür möchte man durch die Inhalation von in Vektoren eingebauten, funktionsfähigen CFTR-Genen erreichen, dass diese stabil in die DNA der Epithelzellen eingebaut und aktiviert werden. Die so transformierten Zellen sollen den funktionsfähigen Chlorid-Kanal synthetisieren und in die Epithelzellmembran einbauen können. Doch der anfängliche Enthusiasmus für dieses Konzept wurde relativ schnell gebremst. Sehr schnell wurde klar, dass die Epithelzellen der Atemwege ein schwer zu erreichendes Ziel für die Transfektion mit Plasmid- DNA darstellen und moderne Delivery Devices (Genfähren) erforderlich sind.

Virale Genfähren

Der erste Vektor, der im Rahmen der Gentherapie getestet wurde, leitet sich vom Adenovirus ab. Um auszuschließen, dass der Organismus anschließend an einer Virusinfektion erkrankt, muss ein als Genfähre benutztes Virus zuerst verändert werden. Das Virus sollte sich in der Wirtszelle nicht vermehren können. Dafür wurden dem Virus die entsprechenden Gene entfernt. Statt ihrer setzt man die zu übertragende DNA in das Virusgenom ein.

Adenoviren rufen im Organismus jedoch starke Entzündungsreaktionen hervor. Viele verschiedene Wege der Immunantwort werden vom infizierten Organismus als Abwehrmechanismen eingeschlagen. Eine Möglichkeit, der Immunantwort zu begegnen, wäre die Beseitigung weiterer Virus spezifischer Gene aus dem Vektor. Ein anderer Weg läge in der gleichzeitigen medikamentösen Behandlung des Patienten mit dem Ziel, die Immunantwort des Körpers zu unterdrücken oder einzuschränken.

Der Vorteil von Adenoviren besteht darin, dass sie auch Zellen effizient transfizieren können, die ruhen und keine hohe Teilungsrate aufweisen. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer Integration des gewünschten Gens in das Genom der Wirtszelle, was zu einer dauerhaften Expression des Gens führen würde. Die Expression eines solchen Gens bleibt nur vorübergehend (transient), und das Gen geht bei der nächsten Zellteilung wieder verloren.

Ein anderes modifiziertes Virus, das Maloney Virus (ein Retrovirus), zeigt gute Ergebnisse in stark proliferierenden Zellen im Reagenzglas, aber wenig Effizienz bei Zellen mit einer niedrigen Teilungsrate und in vivo. Deshalb wäre es denkbar, dieses Virus als Genfähre für die Therapie bei Föten einzusetzen. Retrovirale Vektoren integrieren im Gegensatz zu anderen Viren das

gewünschte Gen effizient in das Genom der Wirtszelle. Dadurch wird eine stabile Genexpression in der Mutter- und Tochterzelle ermöglicht.

Die Verwendung von viralen Genfähren ist eine viel versprechende, wenngleich noch sehr schwierige Methode in der Gentherapie. Die verschiedenen Vektoren rufen in unterschiedlichem Ausmaß Entzündungs- und Immunreaktionen hervor. Weitere Unterschiede sind die Größe der Vektoren, welche die Größe der aufzunehmenden Fremd-DNA limitiert. Des Weiteren gibt es Unterschiede in der Fähigkeit, sich in das Wirtsgenom integrieren zu können. Ein großes Problem stellt noch der gezielte Gentransfer in ein spezifisches Gewebe dar (Targeting). Eine Vielzahl weiterer Viren (Lentiviren, Adeno- assoziierte Viren) werden zurzeit auf ihren potenziellen Nutzen für die Gentherapie untersucht.

Nicht virale Genfähren

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Entwicklung viraler Genfähren, bei deren Erprobung es leider sogar schon zu tödlichen Zwischenfällen kam, rücken statt dessen künstliche („non- virale“) Genfähren zunehmend ins Interesse. Im Gegensatz zu den viralen Systemen haben diese weniger antigene Wirkungen auf den Organismus. Zudem besteht bei der virusfreien Übertragung keine Gefahr einer Rekombination. Ein Prototyp dieser non- viralen Genfähren stellen kationische Liposome dar. Die mizellenartigen Fettemulsionen sind positiv geladen und verbinden sich mit der negativ geladenen DNA zu einem zellmembrangängigen Komplex. Helferlipide, z.B. Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), erleichtern das Eindringen der DNA in die Zielzelle durch Membranfusion oder Endozytose. Intrazellulär verfügen die Liposomen nicht wie die Viren über einen Mechanismus, der sie in den Zellkern bringt. Ein großer Teil der DNA wird im Zytoplasma der Zelle noch vor dem Erreichen des Zellkernes durch lysosomale Enzyme zerstört. Deshalb müssen große Mengen von Liposomen-DNA-Komplexen eingesetzt werden, um eine effiziente Korrektur in vivo zu erreichen. Variationen in der Zusammensetzung der Liposomen können die Effizienz der Vektoren etwas verbessern. Eine klinische Liposomen-Studie zeigte zwar bereits erste Erfolge- bei 15 Mukoviszidose-Patienten wurden Komplexe aus Liposomen und CFTR-DNA in die Nasenhöhle appliziert und die Ergebnisse deuten auf eine partielle Normalisierung der Chloridsekretion in der Nasenschleimhaut hin- aber der Beweis, dass man mit den Liposomen eine CFTR-Expression in der Lunge erreichen kann, steht derzeit noch aus.

<i>Genfähre</i>	<i>Beladungs- Kapazität in Kilobasen</i>	<i>Zielzellen</i>	<i>Trans- fections- Effizienz</i>	<i>Stabilität der Expression</i>	<i>Mit- übertragung viraler Bestandteile</i>	<i>Inflamma- torische Aktivität</i>
<i>Retrovirus</i>	< 8 Kb	Mitose	Niedrig	Stabil	Ja	Niedrig
<i>Adenovirus</i>	7-8 Kb	Mitose u. Interphase	Mittel	Transient	Ja	Hoch
<i>Adeno assoziierte Viren</i>	< 5 Kb	Mitose u. Interphase	Niedrig	Stabil	Ja	Niedrig
<i>Lentiviren</i>	< 8 Kb	Mitose u. Interphase	Niedrig	Stabil	Ja	Niedrig
<i>Liposomen</i>	> 10 Kb	Mitose u. Interphase	Niedrig	Transient	Nein	Niedrig

<i>DNA beladene Nanopartikel</i>	< 5 Kb	Mitose u. Interphase	Mittel	Transient	Nein	Niedrig
<i>Molekulare Konjugate</i>	>10 Kb	Mitose u. Interphase	Niedrig	Transient	Nein	Niedrig

Tabelle 2: Vor- und Nachteile der verschiedenen Gentransfersysteme.

Hochinteressant und aktuell ist der Ansatz mit DNA beladene Nanopartikel als Genfähren zu nutzen. In ersten Studien wurden Nanopartikel aus pegylierten Poly-L-Lysin [8] mit einem Durchmesser von weniger als 20 nm zur Transfection von bronchialen Zellen in Mäusen eingesetzt. Besonderes Augenmerk wurde auf Toxizität und Effizienz im Vergleich zur Applikation von nackter DNA gerichtet. Man macht sich die erstaunlichen Resorptionsraten von Nanopartikeln, welche nach Inhalation in Leber, Gehirn und Milz gefunden werden, zunutze. Nanopartikel scheinen eine sehr gute Transfektionseffizienz zu besitzen, aber die Toxizität der Partikel ist stark größen- und materialabhängig [9].

Außerdem versuchte man "nackte" DNA in hypotoner Lösung direkt zu inhalieren und hoffte auf eine Übertragung der DNA in die Epithelzellen. Die Verwendung dieser Methode bewährte sich bisher jedoch noch nicht.

Durch den dauernden Kontakt mit Viren und Partikeln, hat der Körper zahlreiche Abwehrmechanismen gegen Infektionen durch Viren installiert. Eine der wichtigsten Strategien dieses Gewebes gegenüber der Infektion mit Viren ist der Mangel spezieller Proteine in den Membranen der Epithelzellen, die Viren zum Anheften an die Zelle nutzen. Dies verhindert weitestgehend die Infektion der Zellen mit diesen Viren. Außerdem bilden die Flüssigkeitslayer (Mucus bzw. Surfactant) in der Lunge eine beachtliche Barriere bei der Genübertragung sowohl für Partikel als auch virale Genfähren. Komponenten der pulmonalen Flüssigkeiten können an Viren binden und den Kontakt mit den Zellrezeptoren verhindern. Die Entwicklung der Gentherapie hängt von dem Finden sicherer und in vivo gut handhabbarer Methoden und optimaler Genfähren ab, die eine effiziente und stabile Genexpression im Zielgewebe erlauben.

Auch am Beispiel der Gentherapie sieht man, dass das eigentliche Problem des erfolgreichen Einsatzes makromolekularen Biopharmazeutika nicht in der Größe, oder den physikalischen Eigenschaften dieser Moleküle liegt, sondern in den unzureichenden galenischen Formulierungen und im Fehlen geeigneter Inhalations- Devices.

6. Literatur

- [1] Weibel ER; Morphometry of the Human Lung. Berlin: Springer Verlag; 1963
- [2] Patton, John S.; Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. Adv. Drug delivery Rev. 19, 3-36, 1996.
- [3] Niven RW: Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1995, 12: 151- 231.
- [4] Wigley FM, Londono JH, Wood SH, Shipp JC, Waldman RH: Insulin across respiratory mucosa by aerosol delivery. Diabetes 1971, 20: 552-556
- [5] Gansslen M; Über die Inhalation von Insulin; Klin. Wochenschrift 1925, 4; 71.

- [6] Farr S, McElduff A, Ward E, Okumu F, Mather L, Gonda I, Rubsamen R; A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled insulin administered as different strength solutions to healthy volunteers. *Diabetes* 1998, 47:A 61
- [7] Hollander PA, Blonde L, Rowe R, Mehta AE, Milburn JL, Hershon KS, Chiasson JL, Levin SR, Efficacy and safety of inhaled insulin (exubera) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with type 2 diabetes: results of a 6-month, randomized, comparative trial. *Diabetes Care*. 2004 Oct;27(10):2356-62.
- [8] Ziady AG, Gedeon CR, Miller T, Quan W, Payne JM, Hyatt SL, Fink TL, Muhammad O, Oette S, Kowalczyk T, Pasumarthy MK, Moen RC, Cooper MJ, Davis PB. Transfection of airway epithelium by stable PEGylated poly-L-lysine DNA nanoparticles in vivo. *Mol Ther*. 2003 Dec;8(6):936-47.
- [9] Ziady AG, Gedeon CR, Muhammad O, Stillwell V, Oette SM, Fink TL, Quan W, Kowalczyk TH, Hyatt SL, Payne J, Peischl A, Seng JE, Moen RC, Cooper MJ, Davis PB. Minimal toxicity of stabilized compacted DNA nanoparticles in the murine lung. *Mol Ther*. 2003 Dec;8(6):948-56.