Erzeugung und Charakterisierung zielgerichteter liposomaler Trägersysteme für die Tumortherapie

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Peter Hölig

aus Frankfurt a. M.

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

am 15. März 2005 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. T. Kissel

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Fahr

Tag der mündlichen Prüfung: 16. März 2005

Für meine Mutter.

„Wenn jemand sucht, dann geschieht es leicht, daß sein Auge nur noch das Ding sieht, das er sucht, daß er nichts zu finden, nichts in sich einzulassen vermag, weil er nur immer an das Gesuchte denkt, weil er ein Ziel hat, weil er vom Ziel besessen ist. Suchen heißt: ein Ziel haben. Finden aber heißt: frei sein, offen stehen, kein Ziel haben.”

Hermann Hesse, Siddhartha

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung 1

2. Einleitung 3

2.1. Krebs 3

2.2. Konventionelle Tumortherapie 4

2.3. Optimierte Tumortherapie 6

2.3.1. Gegen Tumorzellen selektiv gerichtete Wirkstoffe 7

2.3.2. Tumorzell-Targeting 7
2.3.2.1. Tumorzellmarker 9
2.3.2.2. Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor 9

2.3.3. Antiangiogene Therapie 10

2.3.4. Vaskuläres Targeting 13
2.3.4.1. Tumorendothelzell-Marker 14
2.3.4.2. Integrine 14
2.3.4.3. Endoglin 15

2.4. Liposomen 17

2.4.1. Charakterisierung von Liposomen 21

2.5. Liposomen als Arzneistoffträgersystem 22

2.5.1. Liposomen in der Tumortherapie 22

2.6. Zielgerichtete Liposomen in der Tumortherapie 23

2.7. Liganden 25

2.8. Erzeugung von zielgerichteten Liposomen 29

3. Ziele der Arbeit 33

4. Ergebnisse 34

4.1. Darstellung von Immunliposomen mittels eines scFv-Fragments.....36

4.1.1. Kopplung von scFv-Fragmenten über eine Carbonsäureamidbindung..... 36

4.1.2. Kopplung von scFv-Fragmenten über eine Thioetherbindung 42

4.1.2.1. Erzeugung von scFv-Fragmenten mit einer freien Thiol-Gruppe 44
4.1.2.1.1. Überprüfung der Aktivität der freien Thiolgruppen 46
4.1.2.1.2. Überprüfung der Aktivität der Maleimid-Gruppen 47

4.1.2.2. Kopplung des modifizierten scFv-Fragments an Maleimid-haltige Liposomen 48
4.1.2.2.1. Versuche zum Nachweis der Kopplung 49
4.1.2.2.2. Bestimmung der Kopplungseffizienz 51
4.1.2.2.3. Titration des Kopplungslipids und des scFv-Fragments.....51
4.1.2.2.4. Absättigung von nicht-konjugierten Maleimid-Gruppen mit Cystein 53

4.1.2.3. Physikochemische Charakterisierung..... 55

4.1.2.4. Bindungsstudien 57
4.1.2.4.1. Spezifität der Immunliposomen für Endothelzellen 57
4.1.2.4.2. Kompetitionsexperimente mit freien scFv-Fragmenten 58
4.1.2.4.3. Zeitverlauf der Bindung 60
4.1.2.4.4. Bindungsstudien bei erhöhter Inkubationstemperatur 61
4.1.2.4.5. Inkubation der Immunliposomen mit humanem Plasma 62

4.1.2.5. Bindungs- und Aufnahmestudien der Immunliposomen mittels Fluoreszenzmikroskop 63

4.1.2.6. Beladung der Immunliposomen mit Doxorubizin..... 66

4.1.2.7. Untersuchung der Zytotoxizität von Doxorubizin-beladenen Immunliposomen 67

4.1.2.8. Untersuchungen zur Pharmakokinetik 68

4.1.2.9. Verwendung von PEG-ylierten Liposomen 69

4.1.2.10. Diskussion 72
4.1.2.10.1. Kopplung von scFv-Fragmenten an Liposomen.....73
4.1.2.10.2. Charakterisierung der Immunliposomen 77
4.1.2.10.3. Ausblick 80

4.2. Darstellung von zielgerichteten Liposomen mittels eines Peptidliganden 81

4.2.1. Kopplung des RGD-Peptides über eine Carbonsäure-amidbindung..... 82

4.2.2. Einbau von RGD-10 Lipopeptiden in Liposomen 84

4.2.2.1. Lipopeptide der 1. Generation..... 84

4.2.2.2. Lipopeptide der 2. Generation 85
4.2.2.2.1. Rasterkraftmikroskopie 86

4.2.2.3. Bindungsstudien 87
4.2.2.3.1. Nachweis der Zielzellspezifität 87
4.2.2.3.2. Spezifität der RGD-10 Liposomen 90
4.2.2.3.3. Kompetitionsexperimente 91

4.2.2.4. Bindungs- und Aufnahmestudien mittels Fluoreszenzmikroskop 93
4.2.2.4.1. Bindungs- und Aufnahmestudien der fluoreszenzmarkierten Liposomen 93
4.2.2.4.2. Untersuchungen von Doxorubizin-beladenen Liposomen 95

4.2.2.5. Untersuchung zur *in vitro*-Zytotoxizität 100

4.2.2.6. Pharmakokinetische Studien 100

4.2.2.7. Verwendung von PEG 102

4.2.2.8. Tumorregressionsstudie 102

4.2.2.9. Diskussion 104
4.2.2.9.1. Erzeugung eines zielgerichteten liposomalen Systems 105
4.2.2.9.2. Charakterisierung des zielgerichteten liposomalen Systems 108
4.2.2.9.3. Ausblick 111

4.3. Darstellung von zielgerichteten Liposomen mittels eines Proteins. 112

4.3.1. Der Epidermale Wachstumsfaktor 112

4.3.2. Der modifizierte Epidermale Wachstumsfaktor 113

4.3.2.1. Überprüfung der Kopplungsfähigkeit des EGFm1 114

4.3.2.2. Bindungsstudien 115

4.3.2.3. Kopplung des EGFm1 an ein NHS-Ester-haltiges Kopplungslipid 117
4.3.2.3.1. Kopplungsreaktion 117
4.3.2.3.2. Bindungsstudien 119
4.3.2.3.3. Aufnahmestudie 121

4.3.2.4. Diskussion 122
4.3.2.4.1. Ausblick 124

4.4. Verpackung von Cytarabin in Liposomen 125

4.4.1. Cytarabin 125

4.4.2. Verpackung von Cytarabin in AVE 95 127

4.4.2.1. Beladung der Liposomen 127
4.4.2.1.1. Quantifizierung von Cytarabin 128
4.4.2.1.2. Untersuchung der Verpackungseffizienz in Abhängigkeit vom Lipidgehalt 129
4.4.2.1.3. *In vitro*-Stabilität 130

4.4.2.2. *In vivo*-Tumorregressionsstudien 131

4.4.2.3. Diskussion 134
4.4.2.3.1. Verpackung von Cytarabin in Liposomen 134
4.4.2.3.2. Liposmal verkapseltes Cytarabin *in vivo* 136
4.4.2.3.3. Ausblick 138

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick 139

6. Material und Methoden 142

6.1. Materialien und Geräte 142

6.2. Chemikalien, Antikörper, Medien und Liganden 144

6.3. Allgemeine Lösungen 145

6.4. Zellkultur 146

6.4.1. Verwendete Zellen 146
6.4.2. Zellkulturmedien und -lösungen 146
6.4.3. Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen 147
6.4.4. Bestimmung der Zellzahl 147

6.5. Erzeugung und Reinigung von Antikörperfragmenten 148

6.5.1. Proteinexpression in *E. coli* 148
6.5.1.1 Proteinextraktion aus dem Periplasma 149
6.5.1.2. Proteinaufreinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie ... 149

6.6. Proteinanalytik 150

6.6.1. Bradford-Schnelltest 150
6.6.2. Photometrische Proteinbestimmung 150
6.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 150
6.6.4. Western-Transfer 152
6.6.5. Immunoblot 152

6.7. Liposomentechnologie 153

6.7.1. Herstellung der Liposomen 153
6.7.2. Größenbestimmung 155
6.7.3. Bestimmung des Zetapotentials 155
6.7.4. Rasterkraftmikroskopie 156
6.7.5. Bestimmung des Phospholipidgehaltes 156
6.7.6. Beladung von Liposomen 157
6.7.6.1. Beladung der Liposomen mittels Remote-Loading 157
6.7.6.2. Passive Beladung 158
6.7.7. Größenausschlußchromatographie 158
6.7.8. Gehaltsbestimmung von Doxorubizin 159
6.7.9. Gehaltsbestimmung von Cytarabin 159

6.8. Methoden zur Modifikation von Liposomen mit Liganden 160

6.8.1. Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung unter Verwendung von N-Glut-PE 160
6.8.2. Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung unter Verwendung von NHS-PEG-PE 160
6.8.3. Kopplung von Fluorescein-Isothiocyanat an Proteine 161
6.8.4. Kopplung über eine Thioetherbindung 161
6.8.5. Nachweis der Kopplung 162
6.8.5.1. Kopplung von SAMSA zur Überprüfung der Aktivität der Maleimid-Gruppen 162
6.8.5.2. Kopplung von Fluorescein-Maleimid an scFv-Fragmente 162
6.8.6. Einbau von Lipopeptiden in Liposomen 163

6.9. Bindungs- und Aufnahmestudien 163

6.9.1. Bindungsstudien mittels FACS 163
6.9.2. Bindungs- und Aufnahmestudien mittels Fluoreszenzmikroskop 164
6.9.3. Aufnahmestudien mittels Bafilomycin A1 164
6.9.4. Kompetitionsexperimente 165

6.10. Zytotoxizitätstests (Kristallviolett-Test) 165

6.11. Tierexperimente 166

6.11.1. Haltung der Versuchstiere 166
6.11.2. Tumorregressionsstudien 166
6.11.3. Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zur Organverteilung 167

7. Literaturverzeichnis 168

8. Anhang 183

8.1. Lebenslauf 183

8.2. Danksagung 184

8.3. Eidesstattliche Erklärung 186

8.4. Veröffentlichungen 187

8.4.1. Publikationen 187
8.4.2. Beteiligung an Patenten der vectron therapeutics AG 187
8.4.3. Vorträge 188
8.4.4. Poster 188

Abkürzungen

Für die Abkürzungen von Mengen-, Größen- und Gewichtsangaben wurden die internationalen Standards verwendet.

A431	humane Epidermiskarzinomzellen
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ara-C	Cytarabin, 1-β-D-Arabinofuranosyl-cytosin, Cytosinarabinosoid
AVE	"artificial virus-like envelope"
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C26	murine Kolonkarzinomzellen
CDR	complementarity determining regions
Chol	Cholesterol
Da	Dalton (Einheit des Molekulargewichtes, [g/mol])
d.h.	das heißt
DLPE	1,2-Dilauroyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
doo	8-Amino-3,6-dioxaoctansäure
DOPE	1,2-Dioleoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoglyzerol
DOPS	1,2-Dioleoyl-*sn*-Glyzero-Phospho-L-Serin
DOTAP	2,3-Dioleyloxypropyltrimethylammonium-chlorid
DOTMA	*N*-[1-(2–3-dioleyloxy)propyl]-*N*,*N*,*N*-trimethylammonium-chlorid
Dox	Doxorubizin
DPPE-PEG_{2000}	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Methoxy(Polyethylene glycol)-2000]
DSPC	1,2-Distearoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphocholin
E. coli	Escherichia coli
EDC	Ethyl-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	"epidermal growth factor" (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGM	"endothelial cell growth medium"
EMEA	European Medicines Evaluation Agency
EPC	L-a-Phosphatidylcholin
EPR-effect	"enhanced permeability and retention"-effect
erb-B	Onkogen, das für EGF-Rezeptoren codiert
Fa.	Firma
Fab'	"Fragment antigen binding" (antigenbindendes Fragment)
FACS	"Fluorescence Activated Cell Sorter" (Durchflußzytometer)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fc	"Fragment crystallisation" (konstanter Teil eines Ak)
FCS	fötales Kälberserum
Fv	"Fragment variable" (variables Fragment)
GMP	"Good Manufacturing Practices" (Gute Herstellungspraxis)

^{3}H-COE	^{3}H-Cholesteryl-oleoyl-ether
HAMA	Humane-Anti-Maus-Antikörper
HDMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HER	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HPLC	"High Pressure Liquid Chromatography"
HRP	"horseradish peroxidase" (Meerrettich Peroxidase)
HUVEC	humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
IC_{50}	Inhibition Constant (beim Kristallviolett-Test: Konzentration einer Substanz, die 50% der Zellen abtötet)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KG	Körpergewicht
LP	Lipopeptid
LP1	RGD-Lipopeptid mit einer doo-Einheit
LP3	RGD-Lipopeptid mit drei doo-Einheiten
M	molar
MCC-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[4-(p-maleimidomethyl)cyclohexan-carboxamid]
MeWo	humane Melanomzellen
min	Minute(n)
MPB-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramid]
MPB-PEG-PE	1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Maleimide(Polyethylene Glycol)2000]
MPBS	Magermilchpulver-PBS
MWCO	molecular weight cut off
NBD-PE	1,2-Dioleoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl)
N-Glut-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-(Glutaryl)
NGR	Buchstabensymbole der Aminosäuren Asparagin-Glycin-Arginin
NHS-PEG-PE	1,2-Distearoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[PEG_{2000}-(N-hydroxysuccinimid)
OD	Optische Dichte
P	Passage
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Polydispersitätsindex
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphocholin
PS	Phosphatidylserin
RGD	Buchstabensymbole der Aminosäuren Arginin-Glycin-Aspartat
RGE	Buchstabensymbole der Aminosäuren Arginin-Glycin-Glutamat
Rhodamin-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-(Lissamin Rhodamin B Sulfonyl)
RP-HPLC	"Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography"

rpm	"revolutions per minute" (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAMSA-Fluorescein	S-Acetylmercaptosuccinoyl-amino-Fluorescein
SATA	N-succinimidyl-S-acetylthioacetat
scFv	"single-chain Fragment variable"
SDS	"sodium dodecyl sulphate" (Natriumdodecylsulfat)
SM	Sphingomyelin
SPDP	N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)Phosphin-hydrochlorid
TEA	Trietylamin
TEMED	Tetramethyletylendiamin
TGF	"transforming growth factor" (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VEGF	"vascular endothelial growth factor" (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VPG	Vesikuläres Phospholipid Gel
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. Zt.	zur Zeit
ZAve	mittlerer intensitätsgewichteter Teilchendurchmesser (bei der PCS)

1. Zusammenfassung

Bis jetzt konnte mittels konventioneller Therapien (Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie) kein entscheidender Durchbruch in der Bekämpfung von Krebs erreicht werden. Die Chemotherapie ist oftmals mit dosislimitierenden Nebenwirkungen verbunden und stößt so an ihre Grenzen. Deshalb stellen zielgerichtete Trägersysteme für den Transport von zytotoxischen Substanzen ins Tumorgewebe einen vielversprechenden Ansatz dar. Mit solchen Therapeutika sollte als Folge einer erhöhten Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe ein verstärkter Anti-Tumoreffekt bei gleichzeitig weniger stark ausgeprägten Nebenwirkungen zu erzielen sein. Als Ziel kommen entweder die Tumorzellen selber (Tumorzell-Targeting) oder die Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße (Vaskuläres Targeting), die einen Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen, in Betracht. Durch eine selektive Expression bzw. eine Überexpression verschiedener Antigene auf den Tumor- und Endothelzellen im Vergleich zu normalen Körperzellen wird eine relativ selektive Therapie ermöglicht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, drei neue liposomale Systeme für die zielgerichtete Tumortherapie zu entwickeln. Dafür wurden liposomale Oberflächen mit Zielsteuerungsmotiven, die mittels der Phage-Display-Technologie erzeugt wurden, modifiziert. Für das vaskuläre Targeting wurden als Liganden ein gegen Endoglin gerichtetes humanes scFv-Fragment und ein gegen die α_v-Integrine gerichtetes RGD-Peptid verwendet. Als Zielsteuerungsmotiv für den auf Tumorzellen lokalisierten EGF-Rezeptor diente ein derivatisiertes humanes EGF-Protein. Während das scFv-Fragment über eine Thioetherbindung an Maleimid-haltige Liposomen und das EGF-Protein über eine Carbonsäureamidbindung an N-hydroxysuccinimid-haltige Liposomen gerichtet gekoppelt werden konnte, wurde das RGD-Peptid als Lipopeptid in die liposomale Membran integriert. Mittels *in vitro*-Studien konnte demonstriert werden, daß alle drei zielgerichteten liposomalen Systeme selektiv an die jeweiligen Zielzellen gebunden haben und von diesen aufgenommen wurden. Darüber hinaus wurde durch Kompetitionsexperimente nachgewiesen, daß die Bindung an die Zielzellen bzw. die Aufnahme in diese spezifisch über den jeweiligen Liganden vermittelt wurde. Die mit dem scFv-Fragment modifizierten und mit Doxorubizin beladenen Liposomen zeigten im Vergleich zu den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerungsmotiv eine erhöhte *in vitro*-Zytotoxizität. Die gegen die α_v-Integrine gerichteten und mit Doxorubizin beladenen Liposomen konnten auch im Tierversuch das Tumorwachstum - verglichen mit den gleichen nicht-zielgerichteten Liposomen - stärker

inhibieren. Weitere *in vitro*- und *in vivo*-Versuche müssen für alle drei erzeugten liposomalen Systeme noch den endgültigen Nachweis erbringen, daß durch eine Zielsteuerung eine erhöhte Tumortoxizität erzielt werden kann.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde erfolgreich das Zytostatikum Cytarabin in eine neue liposomale Formulierung verpackt. Mittels dieser Liposomen konnte - verglichen mit freiem Cytarabin - eine signifikant verstärkte Inhibierung des Tumorwachstums im Tierversuch nachgewiesen werden.

2. Einleitung

2.1. Krebs

Im 20. Jahrhundert kam es einerseits zu einem drastischen Rückgang der Sterblichkeit infolge von Infektionskrankheiten, andererseits nahm aber die Mortalität infolge von Tumorerkrankungen stark zu (Prescott und Flexer, 1990). Krebs stellt in Nordamerika und Europa nach den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. In Deutschland treten jedes Jahr 340000 neue Krebserkrankungen auf, an denen 210000 Menschen sterben (Becker und Wahrendorf, 1998).

In normalen Geweben verändert sich die Zellmenge kaum, da ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod besteht. Tumorzellen haben ihre Selbstkontrolle verloren, das Gleichgewicht zwischen Teilung, Wachstum, Differenzierung auf der einen Seite und Alterung und Tod auf der anderen Seite ist in Richtung Wachstum verschoben. Kennzeichen für Malignität von Zellen sind invasives Wachstum und Metastasierung. Gesunde gleichartige Zellen sind untereinander über Adhäsionsmoleküle wie z. B. dem E-Cadherin verbunden und wachsen auf einer Extrazellulärmatrix. Die Bindung an diese erfolgt über zelluläre Rezeptoren, zu denen die Integrine gehören. Im Gegensatz dazu kommt es bei Tumorzellen zu einer Überexprimierung von Proteasen, mit deren Hilfe sie sich aus dem Zellverband lösen können. Anschließend durchdringen die Tumorzellen zuerst die Basalmembran des Ursprunggewebes, danach die Basalmembran und das Endothel von Blutgefäßen, um dann mit dem Blutstrom zu anderen Geweben zu gelangen. Die Blutgefäße können sie wieder verlassen und Metastasen in anderen Organen bilden (Ruoslathi, 1996). Obwohl Tumorzellen auf ihrer Oberfläche abnormale Strukturen exprimieren werden sie vom Immunsystem in der Regel nicht als fremd erkannt (Cabrera et al., 2003).

Krebs entsteht allgemein in Körperzellen, die ihre Teilungsfähigkeit noch nicht verloren haben. Im Gegensatz dazu sind Zellen, deren Teilungsfähigkeit verloren gegangen ist, wie z. B. Nervenzellen, praktisch dagegen immun. Das unkontrollierte Wachstum von Krebszellen ist histologisch durch nicht abgrenzbare und unstrukturierte Zellhaufen zu erkennen. Sich teilende Zellen durchlaufen einen Zellzyklus (Abb. 2-1): Dieser besteht aus der G_1-, S-, G_2- und M-Phase. In der G_1-Phase findet die Zelldifferenzierung, in der S-Phase

die Verdopplung der DNA und in der G_2-Phase der Übergang zur Teilungsphase, der M-Phase, statt. Bevor die nächste Zellteilung beginnt, verharren gesunde Zellen in der G_0-Phase, in der sie ihre physiologischen Aufgaben erfüllen.

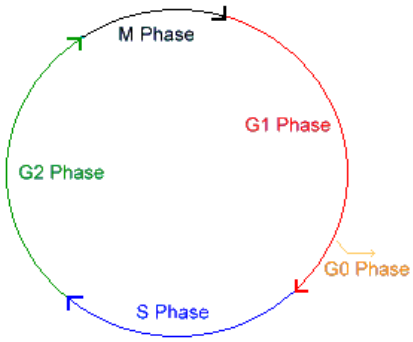


Abb. 2-1: Der Zellzyklus. Zellen, die sich teilen, durchlaufen den Zellzyklus. Bei Tumorzellen ist die Dauer der Arretierung in der G_0-Phase verkürzt, so daß es zu häufigeren Zellteilungen kommt.

Die Ursache für das schnelle Wachstum von malignen Zellen liegt in einem verkürzten Zellzyklus. Bei Krebszellen ist die Dauer der Arretierung in der G_0-Phase reduziert und so ist die Teilungsrate und damit das Wachstum im Vergleich zu den Zellen, von denen sie sich ableiten, verstärkt und nicht mehr an die physiologischen Anforderungen angepaßt. Dies ist eine Folge einer genetischen Mutation, die jede Krebszelle auf ihre Nachkommen vererbt (Prescott und Flexer, 1990).

2.2. Konventionelle Tumortherapie

Maligne Tumoren führen ohne medizinischen Eingriff früher oder später direkt oder indirekt zum Tode. Der Tod kann durch den Primärtumor selbst oder Metastasen, bakterielle Infektionen, Auszehrung oder Blutungen verursacht werden (Ingaki et al., 1974). Die 5-Jahresüberlebensraten sind je nach Krebsart sehr unterschiedlich: So beträgt diese in Deutschland bei Brustkrebs ca. 60-70% und bei Pankreaskrebs nur ca. 5% (Schön, 1995).
Die drei klassischen Säulen der Tumortherapie stellen Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie dar. Operationen werden durchgeführt, wenn es sich um solide und klar abgrenzbare Tumoren handelt. Allerdings ist mit dem Herausschneiden der sichtbaren

Tumormasse noch nicht gewährleistet, daß alle Tumorzellen im Körper entfernt werden. Bei der Strahlentherapie setzt man von außen oder innen Röntgen- oder Gammastrahlen ein, um die Tumorzellen zu zerstören. Ebenso ist es dabei nicht möglich, nicht lokalisierbare Mikrometastasen zu zerstören (Hellman und Vokes, 1996).

Jedoch ermöglicht die Chemotherapie eine Eliminierung solcher Mikrometastasen. Bei Chemotherapeutika handelt es sich um Substanzen, die sich nach parenteraler Applikation über die Blutgefäße im ganzen Körper verteilen und zytostatisch wirken. Zytostatika reduzieren pro Therapiezyklus nicht alle Tumorzellen, sondern immer nur einen gewissen Prozentsatz. Deshalb werden sie über mehrere Zyklen verabreicht. Allerdings kann aber von jeder dennoch verbliebenen Tumorzelle ein Rezidiv ausgehen. Da sich Tumorzellen im wesentlichen von gesunden Körperzellen nur durch ihr ungehemmtes Wachstum unterscheiden, ist mit klassischen Zytostatika keine selektive Elimination möglich. Eine relative Selektivität wird erst durch eine sehr hohe Teilungsrate von Tumorzellen, wie sie z. B. Hodentumoren aufweisen, erreicht. Solche schnell wachsenden Tumoren sprechen sehr gut auf eine Chemotherapie an. Da Zytostatika besonders auf Zellen, die eine hohe Teilungsrate aufweisen, wirken, werden neben Tumorzellen auch gesunde Zellen, die sich häufig teilen, getötet. Deshalb werden bei einer Zytostatikatherapie z. B. die Schleimhaut des Verdauungstraktes, die Haarwurzeln, das Knochenmark und die Keimdrüsen stark geschädigt (Karow und Lang, 1998).

Zytostatika greifen entweder während einer bestimmter Phase des Zellzyklus ein (phasenspezifische Zytostatika) oder sie sind in allen Phasen des Zellzyklus wirksam (phasenunspezifische Zytostatika). Zur ersten Gruppe gehören z. B. die Antimetabolite (u. a. 5-Fluoruracil und Cytarabin), die Mitosehemmstoffe (u. a. Vinblastin und Paclitaxel) und die Topoisomerase-I-Hemmer (u. a. Irinotecan). Antimetabolite werden auf Grund ihrer Strukturähnlichkeit mit Nukleotiden in die DNA eingebaut, wo sie aber funktionsuntüchtig sind. Darüber hinaus hemmen sie Enzyme der Nukleotidbiosynthese. Mitosehemmer binden entweder an Tubulin (Vinblastin), wodurch die Ausbildung der Mikrotubuli gestört wird, oder sie verhindern die Depolymerisation der Mikrotubuli (Paclitaxel). Bei der DNA-Replikation bindet die Topoisomerase-I an die DNA und bewirkt eine Entspiralisierung und Trennung des Doppelstrangs in Einzelstränge. Topoisomerase-I-Hemmer binden an diesen DNA-Topoisomerase-Komplex, so daß die DNA zwar gespalten, aber nicht mehr in ihre superhelikale Form überführt werden kann. Diese Zytostatika wirken nur in der S-Phase des Zellzyklus. Um möglichst viele Tumorzellen mit solchen Zytostatika abzutöten, ist es notwendig, die Tumorzellen über einen möglichst langen Zeitraum diesen auszusetzen.

Daraus ergibt sich, daß für deren therapeutischen Effekt die Dauer der Therapie von entscheidender Bedeutung ist. Zur zweiten Gruppe, den phasenunspezifischen Zytostatika, gehören z. B. die Alkylantien (u. a. Cyclophosphamid) und die Antibiotika (u. a. Daunorubizin und Doxorubizin). Durch Alkylantien werden DNA-Stränge intra- und intermolekular miteinander verknüpft, die Antibiotika interkalieren in die DNA. Beide Substanzgruppen blockieren so die Matrizenfunktion und damit die Synthese von DNA und RNA. Für deren Wirkung ist mehr die Höhe der Dosis als die Dauer der Therapie entscheidend.
Zytostatika weisen allerdings entscheidende Nachteile auf: Zum einen ist die Therapie mit starken und dosislimitierenden Nebenwirkungen verbunden. Zum anderen verlieren sie nach mehrmaliger Gabe ihre Wirksamkeit, da die Tumorzellen Resistenzmechanismen entwickeln (Karow und Lang, 1998; Forth et al., 1996).

2.3. Optimierte Tumortherapie

Durch die alleinige Weiterentwicklung konventioneller Therapien konnte bisher kein Durchbruch bei der Bekämpfung von Krebs erreicht werden. Umso mehr ist es das Ziel, neue Therapien zu entwickeln, die selektiv auf Zellen des Tumorgewebes wirken und gesunde Zellen weitgehend verschonen. Dies ist möglich, da sich die Zellen im Tumorgewebe im Vergleich mit gesunden Zellen durch ein spezifisches Antigenmuster auszeichnen. Infolge von Mutationen exprimieren diese Zellen zum einen mutierte anstelle von ruhenden Genen und zum anderen können normale Gene verstärkt oder aber vermindert exprimiert werden (Park 2002). Dadurch besteht die Möglichkeit, neue zielgerichtete Wirkstoffe zu entwickeln oder auch zytotoxische Substanzen (z. B. Chemotherapeutika, Toxine und Radiotherapeutika) mit Liganden zu kombinieren, die gegen Strukturen auf den Zellen im Tumorgewebe gerichtet sind. Solche Therapeutika können gegen die Tumorzellen oder gegen die Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße (Angiogenese), auf die solide Tumoren für ein weiteres Wachstum angewiesen sind, gerichtet sein. Da das Antigenmuster bei jeder Tumorart verschieden ist, ist es sinnvoll für jede Tumorerkrankung eine spezifische Therapie zu entwickeln. Darüber hinaus wird es in Zukunft möglich sein, das spezifische Antigenmuster der Tumorzellen von jedem Patienten zu erfassen. Dann sollte die Möglichkeit bestehen, Tumortherapeutika individuell auswählen zu können.

2.3.1. Gegen Tumorzellen selektiv gerichtete Wirkstoffe

In den letzten Jahren wurden verschiedene selektive Wirkstoffe gegen Tumorzellen entwickelt. Darunter befinden sich viele monoklonale Antikörper, wie der 1998 in den USA für die adjuvante Behandlung von metastasierendem Brustkrebs zugelassene humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Der Antikörper ist gegen HER-2 (= EGF-2-Rezeptor bzw. ErbB-2-Rezeptor) gerichtet, dieser Rezeptor wird in 25-30% der Brustkrebsfälle überexprimiert.
Ein weiterer Ansatzpunkt sind die Genprodukte von Onkogenen, wie z. B. die Ras-Proteine (Ramirez de Molina et al., 2004) und die Tyrosin-Kinasen. Das Molekül Gefitinib (Iressa®) hemmt intrazellulär die Tyrosin-Kinase des EGF-Rezeptors und ist seit Herbst 2003 für die Behandlung von therapieresistenten Lungentumoren zugelassen (El-Rayes und LoRusso, 2004). Da diese Therapien meistens nur zytostatisch wirken, werden sie oftmals nach einer Operation mit einer Chemotherapie kombiniert.

2.3.2. Tumorzell-Targeting

Der zielgerichtete Transport von Chemotherapeutika zu den Tumorzellen stellt eine Optimierung der Zytostatikatherapie dar. Mit diesem Therapieansatz wird versucht, zytotoxische Substanzen selektiv in Tumorzellen zu liefern. Verschiedene Chemotherapeutika wurden an Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide, Hormone und Wachstumsfaktoren gekoppelt und *in vitro* und *in vivo* analysiert. Mittels solcher Konjugate sollte es möglich sein, zumindest teilweise die limitierenden Faktoren einer konventionellen Zytostatikatherapie zu überwinden. So sollten erhöhte Konzentrationen der Therapeutika in den Zielzellen bei gleichzeitig verminderten systemischen Nebenwirkungen erreicht werden können. An solche Systeme werden zwei wichtige Anforderungen gestellt: Zum einen müssen sie im Blutkreislauf stabil sein und zum anderen müssen sich die Therapeutika aber nach der Aufnahme in die Zielzellen vom Liganden abspalten können (Trail et al., 2003).
Weitere limitierende Faktoren treten nach einer Anreicherung der Therapeutika im Tumorgewebe auf. Einer erfolgreichen Aufnahme in die Zielzellen steht der herrschende hohe intratumorale Druck entgegen, wodurch es besonders schwierig ist, im Inneren des Tumors gelegene Zellen zu erreichen. Da selbst die Tumorzellen „eines Tumors“ heterogen sind,

exprimieren diese möglicherweise nicht alle oder nicht alle in demselben Ausmaß das Antigen, gegen das der Ligand gerichtet ist, über (Mastrobattista et al., 1999).

Seit dem Jahre 2000 ist in den USA das Immuntoxin Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®) für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) zugelassen. Dabei sind rechnerisch gesehen zwei bis drei Moleküle des Ozogamicins an einen monoklonalen humanisierten Antikörper, der gegen CD33 gerichtet ist, gekoppelt (Hamann et al., 2002; Damle und Frost, 2003). Firestone et al. (1996) koppelten Doxorubizin an den chimären monoklonalen Antikörper BR96, der gegen das Antigen Le^y gerichtet ist. Dieses wird u. a. von Brust- Lungen- und Kolontumoren überexprimiert. Bei *in vivo*-Versuchen mit Mäusen konnte eine überlegene Anti-Tumoraktivität dieser Immunkonjugate gegenüber freiem Doxorubizin nachgewiesen werden (Trail et al., 1993; Trail et al. 1995). Mit dem Immunkonjugat BR 96-DOX wurden klinische Studien der Phase I (Saleh et al., 1998) und Phase II (Tolcher et al., 1999) durchgeführt. Jedoch zeigte sich, daß die Anti-Tumoraktivität der Immunkonjugate verglichen mit freiem Doxorubizin schwächer war, obwohl diese von den Tumorzellen aufgenommen worden waren. Vermutlich konnte nicht genügend Doxorubizin in die Tumorzellen geliefert werden, da die gebundene Menge an Doxorubizin mit 2-10 Molekülen pro Antikörper zu gering war. Jedoch kann die Anzahl Zytostatika-Moleküle pro Antikörper nicht beliebig erhöht werden: Shih et al. (1991) zeigten in ihrer Studie, daß ab einer Menge von zehn gekoppelten Molekülen Doxorubizin pro Antikörper dessen Aktivität und antigenspezifische Zytotoxizität stark abnimmt.

Einen Ausweg bieten hier Trägersysteme wie Liposomen. Diese weisen eine sehr große Beladungskapazität auf und durch die Verkapselung sind die Substanzen vor einem Abbau während der Zirkulation im Blut geschützt. Da Liposomen im Blut oftmals längere Halbwertszeiten als die freien Wirkstoffe aufweisen, kann deren Zirkulationszeit durch die liposomale Verpackung verlängert werden. Ebenso können sie mit Zielsteuerungsmotiven wie den oben genannten Antikörpern modifiziert werden. Verglichen mit Immunkonjugaten kann man auf diese Art mit viel weniger Liganden wesentlich größere Wirkstoffmengen zum Zielgewebe lenken (Torchilin, 2000).

2.3.2.1. Tumorzellmarker

Als Zielstrukturen auf Tumorzellen können spezifisch von Tumorzellen exprimierte Antigene, wie abnormal glykosylierte Glykolipide, Glykoproteine, Proteoglykane und Mucin, genutzt werden (Hakmori, 1992). Darüber hinaus werden verschiedene Antigene von bestimmten Tumoren überexprimiert. Zu diesen gehören u. a. Folat-Rezeptoren (Coney et al., 1991), EGF-Rezeptoren (Coussens et al., 1985), Transferrin-Rezeptoren (Keer et al., 1990), die Antigene CD10 (Carrel et al., 1993) und CD20 (Vervoordeldonk et al., 1994), das Prostata-spezifische Antigen (Hernandez et al., 2004) und das karzinoembryonale Antigen (Gold und Goldenberg, 1998).
Da in dieser Arbeit der EGF-Rezeptor als Zielstruktur diente, wird dieser im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

2.3.2.2. Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor

Der EGF-Rezeptor, der auch als erbB-1-Rezeptor bzw. HER-1 bezeichnet wird (Gembitsky et al., 2002), wird von vielen Tumoren, z. B. von denen der Lunge, Leber, Brust, Hals, Nacken, Ovarien und Blase überexprimiert und stellt somit einen vielversprechenden Angriffspunkt für die zielgerichtete Tumortherapie dar (Salomon et al., 1995; Nicholson et al., 2001; Baselga, 2001; Ciardiello und Tortora, 2001). Natürliche Liganden dieses Rezeptors sind der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF = Epidermal Growth Factor) und der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF = Transforming Growth Factor). Die Bindung der Liganden bewirkt eine Rezeptordimerisierung, durch die über eine Signalkaskade schließlich eine Genexpression im Zellkern ausgelöst wird, die zu mitogenen Effekten führt. Im Sommer 2004 wurde der chimäre monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbitux®) in Verbindung mit dem Topoisomerase-1-Hemmer Irinotecan für die Behandlung des metastasierenden Kolorektalkarzinoms von der EMEA zugelassen. Cetuximab bindet mit 5- bis 10-fach höherer Affinität als endogene Liganden an den EGF-Rezeptor und verhindert somit deren Bindung und eine Signalweiterleitung (Veronese und O'Dwyer, 2004). In der Literatur wurden verschiedene Konjugate, bestehend aus EGF und Zytostatika, Radionukleotiden, Ribonuklease und Toxinen, beschrieben. Derartige Konjugate waren in der Lage die Wirkstoffe zielgerichtet in die Tumorzellen zu liefern und zeigten im Vergleich zu den freien

Wirkstoffen *in vitro* und *in vivo* einen verstärkten Anti-Tumoreffekt (Chen et al., 2002; Lutsenko et al., 2002; Jinno et al., 1996; Lee et al., 1993).

2.3.3. Antiangiogene Therapie

Bei diesem Konzept, das ursprünglich von Folkman (1971) entwickelt wurde, stellen die Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße das Ziel für Tumortherapeutika dar. Eine verstärkte Angiogenese findet man bei vielen Krankheiten, wie z. B. bei der diabetischen Retinopathie und der rheumatoiden Arthritis, besonders stark ausgeprägt ist sie bei soliden Tumoren. Ab einer bestimmten Tumorgröße kommt es zur Neubildung von Blutgefäßen, da für ein weiteres Tumorwachstum eine ausreichende Nährstoff- und Sauerstoffversorgung notwendig ist. In der Arbeit von Dempke et al. (2001) wird die Bedeutung der Angiogenese für das Tumorwachstum sehr deutlich: Wird ein Tumor in die Augenkammer eingesetzt, wo die Versorgung mit Nährstoffen nur auf Diffusionsvorgängen beruht, so bleibt der Tumor sehr klein. Nach der Implantation auf die blutgefäßreiche Iris nimmt dagegen das Tumorwachstum immer stärker zu und es ist ein dichtes Kapillarnetz zu beobachten.
Die Angiogenese wird durch Wachstumsfaktoren ausgelöst. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen den angiogenen und antiangiogenen Faktoren (Liekens et al., 2001). Im Tumorgewebe verschiebt sich dieses, da Tumorzellen selber angiogene Wachstumsfaktoren sezernieren (Zeng et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer Permeabilitätserhöhung und Dilatation der Blutgefäßkapillaren, das eine Aufnahme von weiteren Wachstumsfaktoren begünstigt (Liekens et al., 2001).

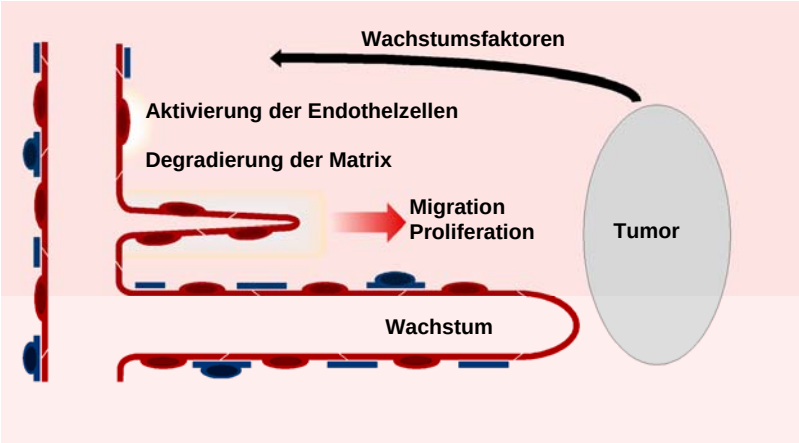


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Angiogenese.

Im gesunden Gewebe sind die Endothelzellen durch die Basalmembran und das Netz der extrazellulären Matrixproteine fest mit ihrer Umgebung verankert. Während der Angiogenese werden diese von Proteasen aufgelöst (Coussens et al., 2002). Die aus dem Verband gelösten Endothelzellen wandern in Richtung des Tumors, haften dabei an aufgelöste Matrixproteine und bilden eine zusammenhängende Struktur, die sich von der bestehenden Blutkapillare bis hin zum Tumor erstreckt (van Hinsbergh et al., 2001). Um die Kapillaren an den Matrixproteinen zu verankern, sinkt die Proteaseaktivität wieder.

Es gibt drei Gruppen von angiogenen Faktoren: Die erste Gruppe sind die Wachstumsfaktoren, die direkt auf die Endothelzellen wirken und die Migration, Proliferation und Differenzierung auslösen (Liekens et al., 2001). Zu dieser Gruppe gehören der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) sowie die Angiopoietine. Während diese Stoffe spezifisch auf Endothelzellen wirken (Liekens et al., 2001; Liu et al., 2002; Zeng et al., 2001) ist dies bei anderen Wachstumsfaktoren nicht der Fall. Zum Beispiel wirken der basale Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-2) und der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) neben Endothelzellen auch auf andere Zellen (Liekens et al., 2001). Es existieren zusätzlich indirekt wirksame Faktoren, z. B. der Tumor-Nekrose-Faktor TNF-α und der Transformierende Wachstumsfaktor TGF-β. Direkt wirken dieses Stoffe auf Endothelzellen antiproliferativ. Sie können aber u. a. VEGF aus Makrophagen, Endothel- und Tumorzellen freisetzen (Liekens et al., 2001). Zur zweiten Gruppe der angiogenen Faktoren zählen die Proteasen, diese sind für die Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären Matrixproteine verantwortlich (Coussens et al., 2002). Die dritte Gruppe stellen die Integrine dar, die sich an der Oberfläche

der Endothelzellen befinden und für die Verankerung an der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Liekens et al., 2001; van Hinsbergh et al., 2001). Die Wachstumsfaktoren werden u. a. durch Hypoxie des Tumorgewebes stark überexprimiert (Liekens et al., 2001; Brahimi-Horn et al., 2001).

Mit einer antiangiogenen Therapie wird versucht, die Bildung von neuen Blutgefäßen zu verhindern. Die Vorteile einer solchen Therapie sind vielfältig:
1) Es sind nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten, da Angiogenese im Organismus eines Erwachsenen abgesehen von wenigen Ausnahmen (z. B. während des weiblichen Zyklus und bei der Wundheilung) nicht vorkommt. 2) Die neu gebildeten Blutgefäße sind für Therapeutika leicht zugänglich, da sie direkt mit dem bestehenden Blutgefäßsystem verbunden sind. 3) Die Endothelzellen sind genetisch stabil und sollten deshalb keine Resistenzen ausbilden. 4) Durch die zielgerichtete Applikation sind kaum Nebenwirkungen zu erwarten. 5) Die Antigene, die als Zielstruktur auf den neu gebildeten Blutgefäßen dienen, sind im Gegensatz zu den Antigenen auf den Tumorzellen homogen. 6) Die Therapie ist bei vielen soliden Tumoren anwendbar, da diese ab einer bestimmten Größe für ein weiteres Wachstum neue Blutgefäße benötigen. 7) Mit dieser Therapie können auch Metastasen ab wenigen Millimetern Durchmesser erreicht werden. 8) Es können auch langsam wachsende Tumoren, die auf Zytostatika kaum ansprechen, behandelt werden (Augustin, 1998; Duff et al., 2003).
Viele Arbeitsgruppen sind auf der Suche nach Wirkstoffen, die die Angiogenese inhibieren können. Ein Hauptangriffsziel für neue Wirkstoffe stellt das VEGF und sein Rezeptor dar: Im Februar 2004 wurde der monoklonale und humanisierte Antikörper Bevacizumab (Avastin®) in den USA in Kombination mit einer 5-Fluoruracil-basierten Chemotherapie zur First-Line-Therapie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom zugelassen. Bevacizumab bindet mit hoher Affinität an VEGF und fängt dieses ab, bevor es an den Rezeptor binden kann (Veronese und O'Dwyer, 2004). In weiteren klinischen Studien werden Inhibitoren der Tyrosin-Kinase des VEGF Rezeptors untersucht, z. B. der selektive Inhibitor SU 5416 (Semaxanib) (Kuenen et al., 2002) und der unselektive Inhibitor SU 6668 (Laird et al., 2000). Weiter wird versucht Inhibitoren der Matrixmetallproteinasen zu finden bzw. zu entwickeln. Z. B. werden klinische Studien mit Neovastat durchgeführt, einem unspezifischen Inhibitor von Matrixmetallproteinasen, der aus dem Knorpel von Haifischen gewonnen wird (Coussens et al., 2002). Insgesamt befinden sich nach einer Statistik des US-amerikanischen National

Cancer Institute über 50 Substanzen in klinischen Prüfungen bis zur Phase III, meist als Zusatz zu Standard-Therapieschemata.
Inhibitoren der Angiogenese wirken in der Regel nur zytostatisch. Am Rand des Tumors gibt es auch Bereiche, die von bestehenden Blutgefäßen versorgt werden und mit Hemmstoffen der Angiogenese nicht erreicht werden können. Deshalb ist es sinnvoll eine solche Therapie mit anderen zu kombinieren.

2.3.4. Vaskuläres Targeting

Einen anderen Ansatz stellt die vaskuläre Therapie dar. Mit dieser sollen die neu gebildeten Blutgefäße zerstört werden. Dieses kann z. B. mit zytotoxischen Substanzen erreicht werden, die an endothelzellspezifische Liganden gekoppelt werden. Gegenüber dem zielgerichteten Transport von solchen Substanzen zu den Tumorzellen weist ein solcher Ansatz zusätzlich zu den unter 2.3.3. genannten Vorteilen einer antiangiogenen Therapie weitere auf: 1) Die Therapeutika müssen die Blutgefäße nicht verlassen, um ihr Ziel zu erreichen. 2) Die Endothelzellen werden nicht wie die Tumorzellen durch einen erhöhten Druck, wie er im Inneren von Tumoren herrscht, abgeschirmt. 3) Da von einem Blutgefäß viele Tumorzellen versorgt werden, ist durch die Zerstörung eines Blutgefäßes die Vernichtung von vielen Tumorzellen möglich.
Olson et al. (1997) koppelten das Diphtherie-Toxin an rekombinantes VEGF und konnten mit diesem Konjugat im Vergleich zu freiem Toxin mittels *in vivo*-Studien ein signifikant reduziertes Tumorwachstum beobachten. Einen solchen verstärkten Anti-Tumoreffekt beobachteten ebenfalls Arap et al. (1998) bei Mäusen mit Brusttumoren, die sie mit Doxorubizin, das entweder an ein Integrin-bindendes RGD-Peptid oder an ein die Aminopeptidase-N bindendes NGR-Peptid gekoppelt war, behandelten.
Krasnici et al. (2003) benutzen in ihrer Studie kationische Liposomen als zielgerichtetes Transportmittel für Zytostatika zum Tumorendothel. Mittels intravitaler Mikroskopie konnte diese Gruppe nachweisen, daß die kationischen Liposomen im Vergleich zu neutralen und anionischen Liposomen fast ausschließlich von den Endothelzellen aufgenommen wurden. Diese Akkumulation wurde auf die positive Ladung der Liposomen zurückgeführt. Miller et al. (1998) untersuchten die Bindung und Aufnahme von Liposomen in Abhängigkeit von der Ladung und konnten zeigen, daß kationische Liposomen auf Grund ihrer Ladung verstärkt

und unspezifisch an Zellen binden und aufgenommen werden. Der Ansatz von Krasnici et al. (2003) ist deshalb kritisch zu bewerten, da die kationischen Liposomen nach intravenöser Applikation vermutlich unspezifisch auch an andere Zellen im Körper binden werden.
Auch hier sollten sich durch die Verpackung von zytotoxischen Substanzen in zielgerichtete Liposomen dieselben Vorteile ergeben, wie sie in Kapitel 2.3.2. für gegen Tumorzellen gerichtete Systeme beschrieben wurden.

2.3.4.1. Tumorendothelzell-Marker

In den letzten Jahren wurde verstärkt nach Zielstrukturen für eine vaskuläre Therapie gesucht (Halin et al., 2001; Kolonin et al., 2001). Zu den bedeutenden Tumorendothelmarkern gehören die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, VEGF, die Matrixmetallproteinasen (Kolonin et al., 2001) das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) (Horoszewicz et al., 1987; Silver et al., 1997), die Extradomäne B (ED-B) von Fibronektin (B-FN) (Zardi et al., 1987; Tarli et al., 1999), die Aminopeptidase N (Kolonin et al., 2001) und das Endoglin (Burrows et al., 1995; Sanchez-Elsner et al., 2002).

2.3.4.2. Integrine

Integrine stellen zelluläre Oberflächenrezeptoren dar, über die die Zellen mit der extrazellulären Matrix verankert sind. Diese sind Heterodimere, die aus einer α- und einer β-Untereinheit bestehen. Es gibt diverse Kombinationen aus 16 verschiedenen α- und 8 verschiedenen β-Untereinheiten (Kumar et al., 2001). Die Integrine treten mit unterschiedlichen Matrixproteinen in Wechselwirkung. Dabei fungieren sie als Rezeptoren für die Peptidsequenz RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) der Matrixproteine. Auf proliferienden Endothelzellen werden die Integrine $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$ überexprimiert, die Rezeptoren für das Matrixprotein Vitronectin darstellen. Diese werden auf ruhenden Endothelzellen so gut wie gar nicht exprimiert. Darüber hinaus wurden sie auf verschiedenen Tumorzellen, z. B. auf metastasierenden Melanomzellen, gefunden (Conforti et al., 1992; Gehlsen et al., 1992). Um die Angiogenese zu unterbinden, wurden diverse Inhibitoren benutzt: Es sind viele

verschiedene lineare und cyclische Peptide mit einer RGD-Sequenz erzeugt worden, die eine Bindung von Endothelzellen an Matrixproteine *in vitro* und *in vivo* inhibieren konnten. Als besonders potent erwies sich das cyclische Peptid ACDCRGDCFCG, das zwei Disulfidbrücken aufweist (Gehlsen et al., 1988; Koivunen et al., 1995). Auch der humanisierte monoklonale Antikörper Vitaxin®, ein Antagonist des $\alpha_V\beta_3$ Integrin-Rezeptors, zeigte eine Inhibierung der Angiogenese (Gutheil et al., 2000). Harvie et al. (2003) verwendeten das cyclische Peptid ACDCRGDCFCG als Zielsteuerungsmotiv für Lipid-Protamin-DNA Komplexe. Sie erreichten bei Transfektionsversuchen mit MDA-MB-231 Zellen, die die Integrine $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$ überexprimieren, eine 100-fach höhere Effizienz als mit den gleichen Lipopolyplexen ohne RGD-Peptid. Zarovni et al. (2004) koppelten die für TNF-α codierende DNA an ein RGD-Peptid und konnten *in vivo* im Gegensatz zum freien Plasmid eine Inhibition des Tumorwachstums nachweisen.

2.3.4.3. Endoglin

Der transformierende Wachstumsfaktor TGF-β ist ein Zytokin und an der Steuerung der Angiogenese, der Wundheilung, von Immunfunktionen und Proliferations- und Differenzierungsprozessen der Hautzellen beteiligt. Der TGF-β Rezeptor besteht aus dem Typ-1 und -2. Das TGF-β, ein Polypeptid, bindet zunächst an den Typ-2 Rezeptor und erst danach an den Typ-1 Rezeptor. Es kommt nur zur Auslösung von Folgeprozessen, wenn beide Rezeptoren sich durch die Überbrückung mit TGF-β zu einem Komplex zusammenlagern. Dies bezeichnet man als sequenziellen Bindungsmodus (Attisano et al., 1993). Danach erfolgt eine Autophosphorylierung des Typ-2 Rezeptors an Serin- und Threoninresten, wodurch eine Kinaseaktivität induziert wird, die dann zur Phosphorylierungen wieder an Serin- und Threoninresten des Typ-1 Rezeptors führt. Dadurch können sich verschiedene „Smad"-Proteine an den Typ-1 Rezeptor anlagern und so intrazellulär die Signale weiter übertragen (Wrana et al., 2000). Das Endoglin (CD 105), ein homodimeres Transmembran-Glykoprotein, ist eine akzessorische Komponente des TGF-β Rezeptors, das in den Endothelien den Zutritt des TGF-β an den Typ-2 Rezeptor unterstützt. Es weist ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa auf und besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind (Gougos und Letarte, 1988). Die Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem Endoglin liegt bei 71%

(Ge und Butcher, 1994). Vermutlich wird der weitere Signalweg durch das Endoglin beeinflußt. Endoglin wird auf proliferierenden Endothelzellen, die z. B. bei der Angiogenese von Tumoren zu finden sind, stark überexprimiert (Miller et al., 1999). Allerdings findet man eine schwache Endoglinexpression auch auf verschiedenen anderen Zellen, so z. B. auf Endothelzellen vieler Organe (Gougos und Letarte, 1988), vaskulären Muskelzellen (Adam et al., 1998) und Makrophagen (Lastres et al., 1992). Erhöhte Mengen von Endoglin wurden z. B. auf Blutgefäßen, die Prostata- sowie Brusttumoren und Melanome versorgten, gefunden (Liu et al., 2002; Bodey et al., 1998; Dawn und MacKie, 2002). Da im Serum von gesunden als auch an einem Tumor erkrankten Personen eine lösliche Form des Endoglins nachgewiesen werden kann (Wang et al., 1994), findet das Endoglin auch als Tumormarker Verwendung. Eine hohe Konzentration weist auf Metastasen und eine schlechte Prognose hin. Anti-Endoglin Antikörper werden zur Darstellung der Dichte der tumorversorgenden Blutgefäße eingesetzt. Es zeigte sich, daß eine hohe Dichte mit einer kürzeren progressionsfreien Zeit und kürzeren Gesamtüberlebenszeit bei vielen verschiedenen Tumoren korreliert (Takahashi et al., 2001).

Darüber hinaus wurden mit anti-Endoglin Antikörpern therapeutische Systeme erzeugt: Immuntoxine wurden an derartige Antikörper gekoppelt und es konnte ein starker Anti-Tumoreffekt *in vivo* bei der Behandlung von Mäusen mit Brusttumoren nachgewiesen werden (Seon et al., 1997; Matsuno et al., 1999). Ebenso wurde das Tumorwachstum von soliden Tumoren bei Mäusen durch die Behandlung mit anti-Endoglin Antikörpern, an die ^{125}Iod gebunden war, gestoppt (Tabata et al., 1999).

2.4. Liposomen

Liposomen sind hohlkugelförmige Lipidvesikel mit einem wässrigen Kern. Sie wurden zuerst von Bangham 1965 (Bangham et al., 1965) beschrieben und von Sessa 1968 zum ersten Mal als Liposomen bezeichnet (Sessa und Weissmann, 1968). Nach ihrer Entdeckung dienten sie als Modellmembran und wurden physikochemisch charakterisiert (Bangham, 1968). Erst ein Jahrzehnt später wurde ihr Potenzial als Arzneistoffträgersystem erkannt und seitdem stetig weiterentwickelt (Greogoriadis et al., 1974; Papahadjopoulos und Vail, 1978). Liposomen entstehen aus der Selbstassoziation von amphiphilen Molekülen im wässrigen Medium. Dabei handelt es sich meistens um Phospholipide, die in Phosphoglyzeride und Sphingolipide unterteilt werden können. Diese findet man im Organismus als physiologischen Bestandteil von Zellmembranen. Bei den Phosphoglyzeriden sind zwei Hydroxylgruppen des Glycerins mit Fettsäureketten verestert und die dritte ist über eine Phosphatgruppe mit einer polaren Kopfgruppe verbunden (Abb. 2-3). Bei den gesättigten oder ungesättigten Fettsäureketten, die gewöhnlich eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen enthalten, handelt es sich meist um Ölsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure und Laurinsäure. Die polaren Kopfgruppen werden meist von Cholin, Ethanolamin, Serin, Phosphatsäure, Glycerol und Inositol gebildet.

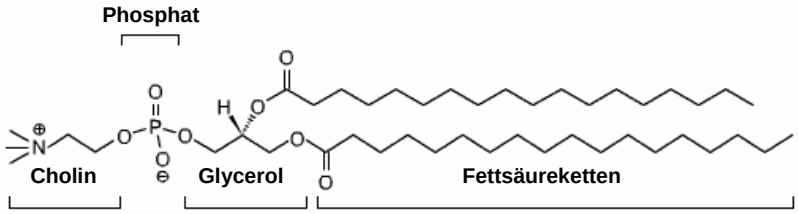


Abb. 2-3: Struktur von Phosphoglyzeriden: Hier dargestellt ist 1,2-Distearoyl-*sn*-glyzero-3-phosphatidylcholin. Als Gerüst dient bei allen Phosphoglyzeriden Glycerol, zwei Hydroxylgruppen sind hier mit Stearinsäure (lipophile Fettsäureketten) und die dritte ist mit Phosphatidylcholin verestert.

Die Sphingolipide enthalten keine Glycerin-Einheit, an dessen Stelle tritt Sphingosin, ein Aminoalkohol mit einer langen, ungesättigten Kohlenwasserstoffkette (Abb. 2.4). Dabei ist die Aminogruppe des Sphingosins durch eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft und

die polare Kopfgruppe ist über eine Phosphatgruppe mit der primären Hydroxylgruppe des Sphingosins verbunden. Beim Sphingomyelin besteht die Kopfgruppe aus Phosphorylcholin.

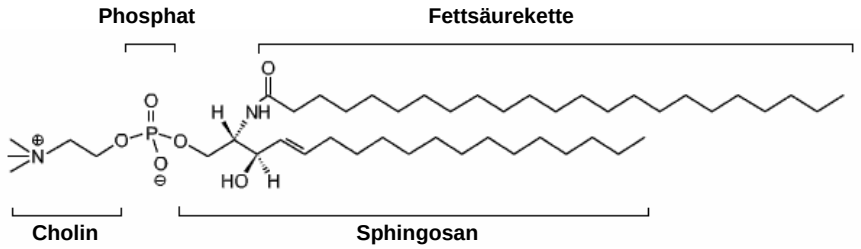


Abb. 2-4: Struktur von Sphingolipiden: Anstatt des Glycerins enthalten Sphingolipide den Aminoalkohol Sphingosan, der eine ungesättigte Kohlenwasserstoffkette enthält. Über eine Amidbindung ist eine zweite Fettsäure verknüpft und die primäre Hydroxylgruppe ist im Fall des hier dargestellten Sphingomyelins mit Phosphorylcholin verestert. Die Sphingolipide sind mit verschiedenen gesättigten und ungesättigten Fettsäureketten verknüpft.

Die natürlichen Phospholipide (z. B. aus Soja und Eigelb) weisen eine Mischung aus verschiedenen Fettsäureketten auf. Es besteht aber die Möglichkeit die einzelnen Fraktionen chemisch zu synthetisieren. So können Phospholipide mit definierten Fettsäureketten dargestellt werden. Darüber hinaus wurden auch künstliche Lipide synthetisiert, die meist postiv geladene Kopfgruppen (z B. DOTAP und DOTMA) tragen und zur Kondensation von DNA verwendet werden (Felgner et al., 1994; Liu et al., 2003). Die Phospholipide lagern sich bei der Assoziation im wässrigen Medium zu Phospholipiddoppelschichten zusammen. In einer Doppelschicht richten sich die lipophilen Fettsäureketten gegeneinander nach innen aus und die hydrophilen Kopfgruppen ragen nach außen (New, 1989).

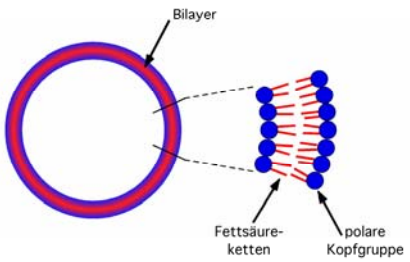


Abb. 2-5: Struktur eines Liposoms: Hier ist ein unilamellares Liposom dargestellt. Die Hülle wird von einer Lipiddoppelschicht (Bilayer), die aus Phospholipiden besteht, gebildet. In dieser richten sich die lipophilen Fettsäureketten gegeneinander nach innen aus und die hydrophilen Kopfgruppen ragen in Richtung der inneren und äußeren wässrigen Phase. Oftmals wird Cholesterol mit in die Doppelschicht eingebaut.

Oftmals wird Cholesterol, das ebenfalls Bestandteil von Biomembranen ist, mit in Liposomen eingebaut (Abb. 2-6). Die Hydroxylgruppe des Cholesterols orientiert sich dabei in Richtung der polaren Kopfgruppen der Phospholipide. Cholesterol senkt die Temperatur für den Phasenübergang vom gelartigen zum flüssigen bzw. flüssig-kristallinen Zustand der liposomalen Membran und verändert deren Permeabilität und Fluidität: Diese Eigenschaften werden unterhalb der Phasenübergangstemperatur erhöht und oberhalb erniedrigt (Hermanson, 1996). So wird durch das Cholesterol die Membranpermeabilität für Inhaltsstoffe verringert und die Lagerstabilität erhöht. Cholesterol erhöht auch die Stabilität *in vivo*, indem es das Ausmaß des Austausches von Phospholipiden mit Lipoproteinen reduziert. Falls die Phasenübergangstemperatur der liposomalen Membran durch den Zusatz von Cholesterol unter die Raumtemperatur gesenkt werden kann, müssen solche Formulierungen nicht bei erhöhten Temperaturen im Wasserbad extrudiert werden.

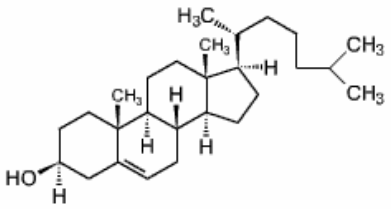


Abb. 2-6: Strukturformel von Cholesterol. Cholesterol wird oftmals zur Erhöhung der Stabilität mit in die liposomale Membran eingebaut.

Die liposomalen Bestandteile werden auch oftmals in Gruppen nach ihrer Ladung bei physiologischem pH-Wert eingeteilt: Zu der neutralen Gruppe gehören Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine und das Sphingomyelin. Bei diesen Phospholipiden wird die negative Ladung der Phosphatgruppe von der positiven Ladung der Kopfgruppe ausgeglichen. Ebenfalls neutral ist das Cholesterol. Negativ geladen sind die Phosphatidylserine, die zusätzlich zur negativen Ladung der Phosphatgruppe eine negative Ladung an der Kopfgruppe tragen und die Phosphatidylglycerole, die neben der negativen geladenen Phosphatgruppe eine neutrale Kopfgruppe aufweisen. Dagegen sind viele synthetische Lipide positiv geladen.

Die Größe der Liposomen ist abhängig von den liposomalen Bestandteilen und der Herstellungsmethode. Man unterscheidet zwischen unilamellaren und multilamellaren Liposomen: Erstere bestehen nur aus einer Phopholipiddoppelschicht, dabei weisen kleine

unilamellare Liposomen (SUV) einen Durchmesser von weniger als 100 nm auf, bei großen unilamellaren Liposomen (LUV) kann der Durchmesser bis über 1 µm ansteigen. Multilamellare Liposomen (MLV) bestehen dagegen aus mehreren konzentrisch angeordneten Phospholipiddoppelschichten mit dazwischen liegenden wässrigen Schichten (Gregoriadis, 2003).

Die physikochemischen Eigenschaften wie z. B. Ladung, Stabilität und die Permeabilität für Inhaltsstoffe sind von den einzelnen Bestandteilen abhängig (Allison und Greogoriadis, 1974; Alving, 1987; Therien und Shahum, 1989). Der Einbau von Sphingomyelin in Liposomen führt z. B. zu einer rigideren Struktur der Doppelschicht. Dadurch wird die Permeabilität für Inhaltsstoffe reduziert und solche Liposomen zeigen *in vivo* eine verlängerte Verweildauer im Blutkreislauf. Dieses ist vermutlich zum einen auf die größere Stabilität des Sphingomyelins verglichen mit Phosphoglyzeriden gegenüber Hydrolyse (die Fettsäureketten sind nicht über eine hydrolyselabile Esterbindung mit dem Sphingosin verknüpft) und zum anderen auf die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen (Webb et al., 1995; Allen und Chonn, 1987; Gregoriadis und Senior, 1980).

Allerdings zeigte sich, daß sich an systemisch applizierte Liposomen - abhängig von den liposomalen Bestandteilen - Opsonine anheften, die dafür verantwortlich sind, daß die Liposomen von den Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) als fremd erkannt werden und von diesen aus dem Blutkreislauf entfernt werden (Gabizon et al., 1990; Harashima et al., 1993). Die Stabilität von Liposomen und die Blutverweildauer konnten durch den Einbau von Polyethylenglykol(PEG)ketten (Allen et al., 1989; Klibanov et al., 1991) und von glykosylierten Lipiden (Allen und Chonn, 1987) in die liposomale Membran erhöht werden. Durch die PEG-Ketten wird die liposomale Oberfläche abgeschirmt, so daß diese vor einer Opsonierung geschützt wird (Torchilin, 1996). Aber auch PEG-ylierte Liposomen scheinen nicht völlig unsichtbar im Körper zirkulieren zu können: Bendas et al. (2003) injizierten im Abstand von 14 Tagen PEG-ylierte Liposomen in Ratten und konnten zeigen, daß sich die Verweildauer im Blut nach der zweiten Injektion schon deutlich reduzierte und die Aufnahme in Leberzellen erhöht war.

2.4.1. Charakterisierung von Liposomen

Ein routinemäßiges Verfahren zur Messung der Größen von Liposomen stellt die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) dar. Mit diesem Verfahren können Durchmesser von Teilchen im Größenbereich von ca. 5 nm bis ca. 5 µm bestimmt werden. Das Verfahren beruht auf der Streuung von Licht an Teilchen, die sich ausschließlich auf Grund der Brown´schen Molekularbewegung in einem Dispersionsmittel bewegen. Da sich kleinere Teilchen schneller bewegen als größere kommt es bei diesen zu schnelleren Intensitätsschwankungen des Streulichts. Durch die Geschwindigkeit der Intensitätsschwankungen ist es mittels des Diffusionskoeffizienten D und einer Korrelationsfunktion möglich die mittleren Durchmesser der Teilchen (ZAve) zu bestimmen. Neben dem Durchmesser der Teilchen, kann der Polydispersitätsindex (PI) mittels einer Kumulanten-Analyse ermittelt werden. Dieser Wert ist ein Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung. Für monodisperse Proben liegt er nach Müller (1996) im Bereich zwischen 0,03 und 0,06, eng verteilte Proben weisen Werte zwischen 0,10 und 0,20 und breit verteilte Werte zwischen 0,25 und 0,5 auf.

Einen anderen wichtigen Parameter zur Charakterisierung von Liposomen stellt das Zetapotential dar. Falls Partikel in ionenhaltigen Lösungen dispergiert werden, können diese an der Oberfläche in einer festgebundenen flüssigen Schicht adsorbiert werden und verändern auf diese Weise die Ladung der Partikel. Die dadurch entstandene Potentialdifferenz zwischen der Oberfläche der festgebundenen flüssigen Schicht eines Partikels und dem Neutralbereich der Lösung bezeichnet man als Zetapotential. Das Zetapotential hat für die Stabilität von Systemen, die dispergierte Partikel enthalten, praktische Bedeutung. Dessen Größe bestimmt das Ausmaß der Abstoßung zwischen gleich geladenen Teilchen. Standardmäßig kann das Zetapotential mittels einer Laserstreulichtmethode (Laser-Doppler-Anemometrie) ermittelt werden. Dabei befinden sich die Liposomen in einem elektrischen Feld und deren Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zum Zetapotential und der angelegten Feldstärke. Um das Zetapotential von Partikeln miteinander vergleichen zu können, müssen die Wanderungsgeschwindigkeiten bei identischer Feldstärke ermittelt werden. Das Meßprinzip beruht darauf, daß zwei gekreuzte Laserstrahlen ein Interferenzstreifenmuster bekannter Dimension erzeugen und durchwandernde Teilchen Lichtblitze in regelmäßigem Takt abgeben, woraus die elektrophoretische Geschwindigkeit abgeleitet werden kann (Müller, 1995).

2.5. Liposomen als Arzneistoffträgersystem

Liposomen sind im allgemeinen gut biokompatibel, da sie meistens aus Bestandteilen, die auch im menschlichen Organismus vorkommen, bestehen. Deshalb sind sie und ihre Metabolite im Körper abbaubar und zeigen nur eine geringe Toxizität (Parnham und Wetzig, 1993). Da Liposomen im Inneren eine hydrophile Phase und in der Membran eine lipophile Phase besitzen, lassen sich sowohl hydrophile als auch hydrophobe Substanzen verpacken, die sich in der jeweiligen Phase anreichern. Für schwach basische bzw. saure Substanzen wurden spezielle Beladungstechniken, wie z. B. das Remote-Loading Verfahren mittels eines pH-Gradienten, entwickelt (Mayer et al., 1986; Allen, 1998). Durch die Verpackung in Liposomen sind Arzneistoffe (z. B. Zytostatika, Antibiotika und Impfstoffe) weitgehend vor einem schnellen Abbau im Blutkreislauf geschützt und können über einen langen Zeitraum zirkulieren. Zusammenfassend können Liposomen als ein Depot-System mit kontrollierter Freisetzung der verpackten Inhaltstoffe beschrieben werden (Gregoriadis, 1993; Greogoriadis und Florence, 1993). Durch die Verpackung von Substanzen in Liposomen können außerdem deren Nebenwirkungen reduziert werden. So konnte die Toxizität von in Liposomen verpacktem Amphotericin B (AmBisome®) um den Faktor 50-70 erniedrigt werden (Adler-Moore, 1994). Darüber hinaus besitzen Liposomen eine große Beladungskapazität (Allen, 1998). Bei einer optimalen liposomalen Formulierung sollte einerseits die verpackte Substanz während der Zirkulation in den Liposomen verbleiben (Gabizon und Papahadjopoulos, 1988) und andererseits muß sie aber so instabil sein, daß der Inhalt im Zielgewebe freigesetzt werden kann (Drummond et al., 1999).

2.5.1. Liposomen in der Tumortherapie

Für die Verpackung von Zytostatika zur Behandlung von malignen Erkrankungen scheinen Liposomen besonders geeignet zu sein. Um einen starken Anti-Tumoreffekt zu erzielen, ist es notwendig, daß Zytostatika über einen möglichst langen Zeitraum und in einer hohen Dosis appliziert werden (Livingston, 1994). Bei der Applikation von Zytostatika in freier Form stehen diesen Forderungen die dosislimitierenden Nebenwirkungen gegenüber. Infolge einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen (z. B. Doxorubizin und Daunorubizin) ist deren

Kumulation im Herzgewebe und die daraus resultierende Kardiotoxizität dosislimitierend. Zu den weiteren bedeutenden Nebenwirkungen gehören die Knochenmarksdepression, Stomatitis, Übelkeit/Erbrechen und Alopezie (Minow und Gottlieb, 1975). Diese Nebenwirkungen konnten durch die Verpackung von Doxorubizin in Liposomen stark reduziert werden und es konnte nachgewiesen werden, daß Liposomen im Tumorgewebe in hoher Konzentration akkumulieren (Mayew und Papahadjopoulos, 1983; Legha et al., 1982). Dort wird das Doxorubizin aus den Liposomen freigesetzt und von den Tumorzellen aufgenommen. Diese Akkumulation wird als passive Zielsteuerung bezeichnet und ist auf den EPR-Effekt („Enhanced Permeability and Retention Effect“) zurückzuführen (Matsumura und Maeda, 1986; Maeda und Matsumura, 1989): Die Liposomen gelangen durch existierende Lücken in den neu gebildeten Blutgefäßen ins Tumorgewebe und akkumulieren dort auf Grund eines gestörten Lymphabflusses. Yuan et al. (1995) konnten in ihrer *in vitro*-Studie mit PEG-ylierten Liposomen zeigen, daß die Blutgefäße, die einen Tumor versorgen, für diese bis zu einer Größe von 400 nm Durchmesser durchlässig sind. Zugelassen sind die liposomalen Formulierungen Caelix® bzw. Doxil®, bei denen Doxorubizin in PEG-ylierte Liposomen verpackt wurde. In über 20 klinischen Studien an Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, daß liposomal verpacktes Doxorubizin gegenüber nicht verpacktem bei einem günstigeren Nebenwirkungsprofil mindestens genauso effektiv ist (O'Shaughnessy, 2003).

2.6. Zielgerichtete Liposomen in der Tumortherapie

Um den therapeutischen Effekt von mit Zytostatika beladenen Liposomen noch zu verstärken, besteht die Möglichkeit, diese spezifisch zu den Tumorzellen (Tumorzell-Targeting) oder zu den Endothelzellen (vaskuläres Targeting) der neu gebildeten Blutgefäße zu lenken und bezeichnet dies als aktive Zielsteuerung. Erreicht werden kann dies durch die Kopplung von Liganden an die liposomale Oberfläche bzw. durch den Einbau von Ligand-Lipid-Konjugaten in die liposomale Membran (Leserman et al., 1980; Torchilin, 2000; Metselaar et al., 2002). Zielgerichtete Liposomen, die Antikörper oder Antikörperfragmente als Liganden tragen, werden als Immunliposomen bezeichnet. Der Anti-Tumoreffekt von Zytostatika kann durch die Verpackung in zielgerichtete Liposomen weiter verstärkt werden, da dies zu einer erhöhten Tumorakkumulation und einer verstärkten Aufnahme in die Zellen führen sollte. Durch die erhöhte Selektivität können gleichzeitig die Nebenwirkungen weiter reduziert

werden. (Mastrobattista et al., 1999). Um mit zielgerichteten Liposomen einen verstärkten und möglichst selektiven Anti-Tumoreffekt zu erzielen, müssen diese mehrere Bedingungen erfüllen: Die Liposomen müssen möglichst lange im Blutkreislauf zirkulieren und sollten klein (< 100 nm) sein (Wu et al., 1993; Huang et al., 1992). Der Forderung nach einer langen Verweildauer im Blut stehen oftmals Eigenschaften der Liganden (siehe 2.7.) und der Kopplungslipide gegenüber (siehe 2.8.). Durch die Verwendung von PEG kann die Zirkulationsdauer verlängert werden (siehe 2.8.). Darüber hinaus kann die Blutkinetik und die Selektivität von zielgerichteten Liposomen durch die Kopplungslipide negativ beeinflußt werden (siehe 2.8.). Für einen verstärkten Anti-Tumoreffekt müssen die zielgerichteten Liposomen von den Tumorzellen aufgenommen werden. Um dies zu gewährleisten, müssen einerseits Liganden verwendet werden, die nach der Bindung an die Zielstruktur internalisiert werden und andererseits dürfen sie ihre Aktivität durch die Kopplung an Lipide nicht verlieren (siehe 2.8.). Falls die Aufnahme in die Zielzellen über den Weg der rezeptorvermittelten Endozytose verläuft, muß der inkorporierte Wirkstoff in den Endosomen gegenüber einem pH-Wert von ca. 5 stabil sein und muß diese auch wieder verlassen können (Lee et al., 1998).

In vielen verschiedenen Studien wurden zielgerichteten liposomale Systemen untersucht:

Mittels *in vitro*-Aufnahme- und Bindungsstudien konnten viele Gruppen nachweisen, daß zielgerichtete Liposomen von den jeweiligen Zielzellen durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen wurden. Die Liposomen waren u. a. gegen verschiedene Rezeptoren aus der EGF Familie, gegen den Transferrin-Rezeptor, gegen die Integrine und gegen den Folat-Rezeptor gerichtet (Allen et al., 1995; Ishii et al., 1989; Kirpotin et al., 1997; Lee und Low, 1994; Mamot et al., 2003; Nielsen et al., 2002; Sarti et al., 1996; Schiffelers et al., 2003).

Mittels *in vivo*-Studien konnte ein verstärkter Anti-Tumoreffekt für viele verschiedene zielgerichtete liposomale Systeme nachgewiesen werden. Nielsen et al. (2002) koppelten z. B. ein gegen den ErbB-2-Rezeptor gerichtetes scFv-Fragment an mit Doxorubizin beladene Liposomen und konnten eine Tumorregression beobachten, die im Vergleich zu den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerung signifikant stärker war. In der Studie von Sapra et al. (2004) konnte gezeigt werden, daß Mäuse mit einem B-Zell-Lymphom durch die Behandlung mit Liposomen, die mittels eines monoklonalen Antikörpers bzw. eines Fab'-Fragments gegen das CD19 Antigen gerichtet waren, im Vergleich zu den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerung signifikant länger lebten. Schiffelers et al. (2003) koppelten z. B. ein cyclisches RGD-Peptid an PEG-ylierte Liposomen, die mit Doxorubizin beladen waren. Sie wiesen mit dieser Formulierung eine verstärkte Tumorregression nach.

2.7. Liganden

Als liposomale Liganden für die zielgerichtete Tumortherapie wurden u. a. Antikörper (Heath et al., 1984; Allen et al., 1995; Hansen et al., 1995); Fab' - Fragmente (Park et al., 1997); scFv-Fragmente (Marty et al., 2002; Völkel et al., 2004; Demirovic et al., 2005); Proteine, z. B. EGF (Kikuchi et al., 1996; Kullberg et al., 2005) und Transferrin (Sarti et al., 1996); Peptide, z. B. RGD-Peptide (Oku et al., 1996; Gyongyossy-Issa et al., 1998; Fahr et al., 2002; Schiffelers et al., 2003; Dubey et al., 2004), Vitamine, z. B. Folat (Lee und Low, 1994) und Kohlenhydrate, z. B. Galactose (Hashida et al., 2001), verwendet.

Die Verwendung von natürlichen Liganden (z. B. EGF, Transferrin und Folat) weist einige Vorteile auf: Diese besitzen auf Grund ihrer Herkunft eine große Bindungsaffinität zu ihren Rezeptoren, sind nicht immunogen und können kostengünstig erzeugt werden (Mastrobattista et al., 1999). Nachteilig ist, daß deren Struktur oftmals nicht optimal für die Kopplung an Liposomen ist. So verfügen diese z. B. über mehrere identische funktionelle Gruppen, über die die Kopplung an Liposomen erfolgen kann. Deshalb ist ohne eine Derivatisierung oftmals kein gerichtetes und reproduzierbares Kopplungsprodukt darstellbar.

Durch die Entwicklung neuer Techniken, wie z. B. die Hybridom-Technologie zur Darstellung monoklonaler Antikörper (Köhler und Milstein, 1975) und der Phage-Display-Technologie zur Erzeugung von Antikörperfragmenten, Proteinen und Peptiden (Parmley und Smith, 1988), ist es möglich, „maßgeschneiderte“ Liganden in Bezug auf die Zielstruktur zu generieren.
Oftmals finden Antikörper und Antikörperfragmente Verwendung als Liganden (Mastrobattista et al., 1999). Antikörper (Immunglobuline) sind Glykoproteine, die im Organismus von den B-Lymphozyten exprimiert werden und dort als Mediatoren der spezifischen humoralen Immunität fungieren. Von Vorteil ist, daß Antikörper im allgemeinen über eine hohe Affinität zu den Antigenen verfügen. Diese bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten. Über Disulfidbrücken sind die schweren Ketten miteinander verbunden. An jede schwere Kette ist wiederum je eine leichte Kette über eine Disulfidbrücke konjugiert. Die schweren Ketten bestehen aus vier, die leichten aus zwei Domänen. Jeweils die N-terminalen Domänen beider Ketten bilden die antigenbindenden Domänen. Diese enthalten wiederum je drei hypervariable Bereiche („complementarity

determining regions“ = CDR´s) aus 10 bis 20 Aminosäuren, die die eigentlichen Bindungsstellen für die Antigene ausbilden. Die schweren Ketten verfügen über drei oder vier konstante, die leichte Ketten über eine konstante Domäne. Die konstanten Domänen der schweren Ketten sind innerhalb der einzelnen Immunglobulin-Subklassen identisch und für deren biologische Funktion verantwortlich (Abb. 2-7) (Stryer, 1988).

Mittels der Hybridom-Technologie können Antikörper in großen Mengen hergestellt werden. Bei diesen handelt es sich in der Regel um murine monoklonale Antikörper. Liposomen, die mit solchen Liganden modifiziert wurden, zeigten eine drastisch reduzierte Blutverweildauer nach mehrmaliger Applikation. Dieses ist auf die Bildung von Humanen-Anti-Maus-Antikörpern (HAMA-Reaktion) zurückzuführen (Frodin et al., 1992).
Darüber hinaus ist die reduzierte Blutverweildauer von solchen Immunliposomen auch eine Folge der Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose. Normalerweise heften sich Antikörper an Stoffe, die vom Körper als fremd erkannt werden. Über ihren Fc-Teil werden sie phagozytiert und somit aus dem Blutkreislauf eliminiert (Derksen et al., 1988). Des weiteren zeigte sich, daß an Liposomen gekoppelte Antikörper zu einer stärkeren Immunantwort führten als dieselben Antikörper in freier Form (Harding et al., 1997). Vermutlich ist dies entweder auf die Präsentation über die liposomale Oberfläche oder aber auf die durch die Kopplungsreaktion erfolgte chemische Modifikation zurückzuführen.
Eine erste Optimierung stellten chimäre Antikörper dar. Bei diesen stammen nur noch die variablen Domänen von der Maus und die konstanten Domänen sind humanen Ursprungs. Dabei werden die murinen und humanen Bereiche auf DNA-Ebene fusioniert. Allerdings führten die verbliebenen murinen Anteile (ca. 30%) wieder zu einer HAMA-Reaktion (Brüggemann et al., 1987). Deshalb wurden als nächstes humanisierte Antikörper entwickelt. Bei diesen stammen nur noch die CDR´s von der Maus, aber selbst diese sind teilweise immer noch immunogen im menschlichen Organismus gewesen (Jones et al., 1986). Zum einen ist es mittels gentechnischer Methoden (Phage-Display-Technologie) seit kurzem möglich, komplett humane Antikörper zu erzeugen und zum anderen können diese mittels transgener Mäuse (Hierfür werden genetisch veränderte Mäuse, die humane Antikörper exprimieren können, verwendet. Die Erzeugung der Antikörper erfolgt danach wie bei der Hybridom-Technologie.) dargestellt werden (Lonberg und Huszar, 1995). Für eine gerichtete Kopplung an Liposomen besitzen Antikörper oftmals keine optimale Struktur, da sie über viele identische reaktive Gruppen verfügen.

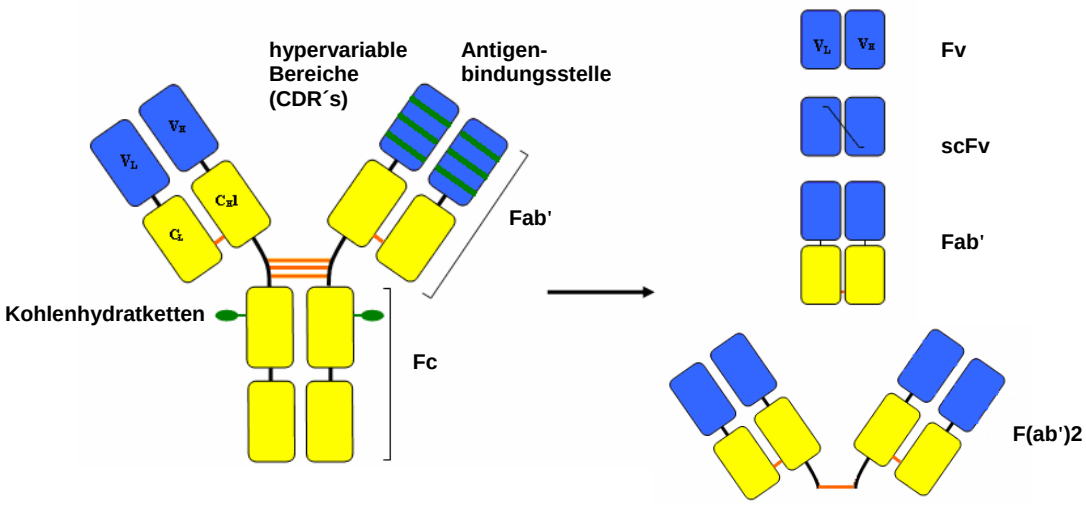


Abb. 2-7: Schematische Darstellung eines IgG1 Antikörpers und der antigenbindenden Fragmente. Die Bindung eines Antigens an den Antikörper erfolgt über die variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Ketten. Die Antigenbindestelle wird von je drei hypervariablen Bereichen, den CDR´s, gebildet. Nach der Antigenbindung werden weitere biologische Effekte im Körper über die konstanten Domänen des Fc-Teils vermittelt. Fab', F(ab')2 und Fv-Fragmente verfügen ebenso wie Antikörper über die Fähigkeit Antigene zu binden. Um das nicht-kovalent verbundene Fv-Fragment zu stabilisieren, kann zwischen den beiden variablen Domänen eine Aminosäurenkette auf DNA-Ebene eingefügt werden (scFv-Fragment).

Da für die Antigenbindung nur die variablen Domänen eines Antikörpers verantwortlich sind, wurden Methoden entwickelt, um Antikörperfragmente (Abb. 2-7) zu erzeugen. Antikörper können durch Proteasen in definierte Fragmente zerlegt werden: Durch Pepsin-Spaltung kann das bivalente F(ab')2 Fragment (Jones und Landon, 2002) und durch Verdauung mit Papain das monovalente Fab' Fragment (Coleman und Mahler, 2003) erzeugt werden (Fab = **F**ragment **a**ntigen**b**indend). Darüber hinaus können Fab'-Fragmente auf gentechnischem Weg in Bakterien dargestellt werden (Better et al., 1988). Immunliposomen, die mit einem Fab' Fragment erzeugt wurden, zeigten im Vergleich zu Antikörpern bedingt durch den fehlenden Fc-Teil eine wesentlich verlängerte Verweildauer im Blut (Maruyama et al., 1997).

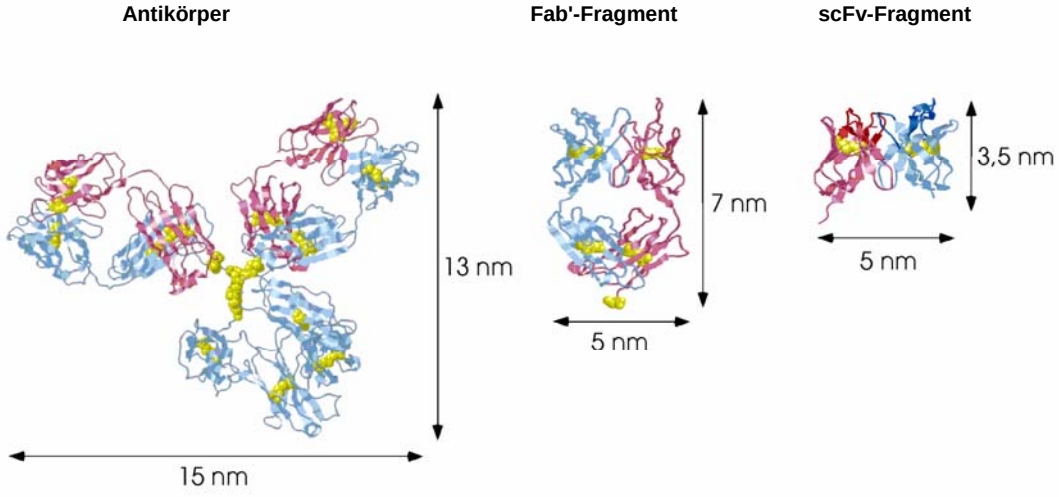


Abb. 2-8: Schematischer Vergleich der Größen zwischen Antikörper, Fab'- und scFv-Fragment

Das kleinste Fragment, das über eine komplette Antigenbindungsstelle verfügt, besteht aus den zusammengelagerten variablen Domänen der schweren und der leichten Kette. Dieses wird als Fv-Fragment (= **v**ariables **F**ragment) bezeichnet und läßt sich gentechnisch erzeugen und in Bakterien exprimieren (Skerra et al., 1988). Nachteilig ist, daß die variablen Domänen nicht kovalent miteinander verknüpft sind, sondern nur über schwache hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Deshalb wurden Methoden entwickelt, um eine kovalente Verbindung zwischen den beiden Domänen herzustellen. Dazu wird meistens auf DNA-Ebene eine Sequenz, die für 15-20 Aminosäuren codiert, eingefügt. Über diese Aminosäurenkette sind die beiden variablen Domänen kovalent miteinander verbunden und man bezeichnet dieses als scFv-Fragment (**s**ingle-**c**hain **F**ragment **v**ariable) (Bird et al., 1988). Für die Erzeugung von Immunliposomen scheinen scFv-Fragmente, besonders wenn sie humanen Ursprungs sind, sehr geeignet zu sein: Sie binden mit einer hohen Affinität an die Zielstruktur und sind auf Grund ihrer Größe (Abb. 2-8) sowie ihrer Herkunft kaum immunogen. Da sie nicht über die konstanten Regionen von Antikörpern verfügen, wird eine Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose vermieden. Durch die Phage-Display-Technologie sind humane scFv-Fragmente leicht zugänglich und lassen sich verglichen mit humanen Antikörpern kostengünstig und in hoher Effizienz, z. B. durch bakterielle Fermentation, erzeugen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, scFv-Fragmente relativ einfach auf DNA-Ebene mittels gentechnischer Methoden für eine gerichtete Kopplungsreaktion zu derivatisieren. So besteht die Möglichkeit, scFv-Fragmente mit Cysteinen zu modifizieren,

um sie über deren Thiol-Gruppen an Liposomen zu koppeln (Marty et al., 2002; Nielsen et al., 2002; Marty und Schwendener, 2005).

Peptide weisen dagegen den Vorteil auf, daß sie im Gegensatz zu Antikörpern, Antikörperfragmenten und Proteinen mittels chemischer Synthese dargestellt werden können. Dies sollte im Hinblick auf ein späteres up-scaling betrachtet werden, da die Erzeugung von Liganden in biologischen Systemen in Bezug auf eine GMP-gerechte Herstellung aufwändiger ist. Darüber hinaus sind sie auf Grund ihrer Größe relativ leicht für eine gerichtete Kopplungsreaktion zu derivatisieren. Peptide werden im Vergleich mit Antikörpern nur in geringem Ausmaß von Zellen des retikulo-endothelialen Systems aufgenommen. Deshalb besteht die Hoffnung, daß liposomale Systeme mit Peptiden als Zielsteuerungsmotiven in großen Mengen im Tumorgewebe akkumulieren (Aina et al., 2002). Allerdings verfügen Peptide meist nicht über dieselbe Affinität wie Antikörper zu ihren Zielstrukturen (Kodadek et al., 2004). Um dies zu optimieren, könnten zwei verschiedene Peptid-Liganden, die gegen dieselbe Zielstruktur gerichtet sind, chemisch gekoppelt werden. Solche bivalente Liganden sollten eine erhöhte Affinität zu ihren Zielstrukturen aufweisen.

2.8. Erzeugung von zielgerichteten Liposomen

Es bestehen verschiedene Methoden, Liganden auf der Oberfläche von Liposomen zu verankern. Meistens werden dazu spezielle Lipide, die über aktive chemische Gruppen verfügen, in die liposomale Membran eingebaut. Beim Einbau von Kopplungslipiden in Liposomen orientieren sich statistisch die Hälfte in die innere hydrophile Phase, nur die andere Hälfte wird auf der Oberfläche präsentiert und steht für die Kopplungsreaktion zur Verfügung. Bei diesen handelt es sich z. B. um 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-Glutaryl (N-Glut-PE), das über eine Carbonsäurefunktion verfügt und die Maleimid-haltigen Kopplungslipide 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoetanolamin-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramid] (MPB-PE) bzw. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoetanolamin-N-[4-(p-maleimidomethyl)cyclohexan-carboxamid] (MCC-PE). Da die reaktiven Gruppen dieser Kopplungslipide nicht über die Liposomenoberfläche hinausragen, sind die gekoppelten Liganden direkt auf der liposomalen Oberfläche lokalisiert. Dieses kann deren Fähigkeit reduzieren optimal mit den Antigenen in Wechselwirkung zu treten.

Die nach der Kopplungsreaktion unkonjugierten Lipide können immunogen wirken und zu einer unselektiven Zellbindung beitragen (Boeckler et al., 1996). Oftmals sind die Kopplungslipide, wie z. B. N-Glut-PE, MPB-PE und MCC-PE, negativ geladen, da der negativ geladenen Phosphatgruppe keine positiv geladene Kopfgruppe gegenübersteht. Durch diese Eigenschaften kann die Blutverweildauer der Liposomen reduziert werden. Um die Verweildauer solcher Liposomen im Blut zu verlängern, besteht die Möglichkeit, PEG-Ketten in die liposomale Membran einzubauen. Zwar konnte durch diese Methode die Blutverweildauer der Liposomen erhöht werden, aber die Abschirmung der Liganden war mit einem Aktivitätsverlust der zielgerichteten Liposomen verbunden (Allen, 1994; Mori et al., 1991; Klibanov et al., 1991). Liganden können aber auch an die Enden von funktionalisierten PEG-Ketten gekoppelt werden, wodurch sich diese in einem gewissen Abstand zur Liposomenoberfläche befinden (Blume et al., 1993; Hansen et al., 1995). In einer Studie von Allen et al. (1995) zeigte sich aber, daß sich die Verweildauer im Blut solcher PEG-ylierter Immunliposomen mit steigender Antikörperdichte stark verringerte. Somit kann durch die alleinige Kopplung von Liganden an PEG-Ketten noch kein optimales System erzeugt werden.

Liganden können aber auch zuerst an Lipide gekoppelt werden bzw. es können Ligand-Lipid-Konjugate (z. B. Lipoproteine) in biologischen Systemen exprimiert werden und danach entweder als Konjugate mit den restlichen liposomalen Bestandteilen bei der Herstellung zusammengegeben werden (Yagi et al., 2000) oder die Konjugate werden in bestehende Liposomen inkorporiert (de Kruif et al., 1996). Letzteres wird als Postinsertionsmethode bezeichnet (Iden und Allen, 2001).

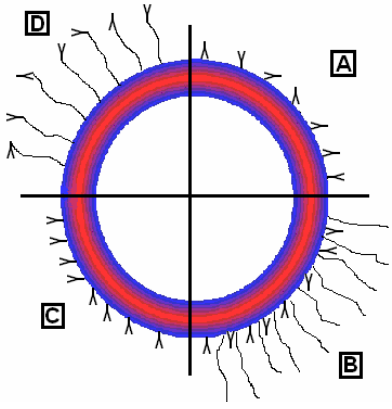


Abb. 2-9: Liganden auf der Oberfläche eines Liposoms. Als Liganden sind hier Antikörper dargestellt. A) Die Antikörper befinden sich direkt auf der Liposomenoberfläche und zeigen keine spezifische Orientierung. B) Um die Verweildauer im Blut zu verlängern, sind PEG-Ketten mit in die liposomale Membran eingebaut. C) Die Antikörper sind direkt auf der Liposomenoberfläche lokalisiert und zeigen alle dieselbe Orientierung. D) Hier sind die Antikörper an das Ende von funktionalisierten PEG-Ketten gekoppelt

Die Liganden werden entweder kovalent oder aber nicht-kovalent an Lipide gekoppelt. Proteine können z. B. mittels des Biotin-Avidin Systems an Liposomen gebunden werden. Bei dieser Methode werden biotinylierte Lipide in die Liposomen eingebaut und auch die Liganden werden biotinyliert. Die nicht-kovalente Bindung erfolgt dann über das Brückenmolekül Avidin, das über 4 Bindungsstellen für Biotin verfügt (Urdal und Hakomori, 1980). Nachteilig ist, daß die Liganden durch die notwendige Biotinylierung verändert werden können. Des weiteren besteht die Gefahr von Quervernetzungen und Aggregationen der Liposomen und Liganden.

Für die kovalente Konjugation von Liganden wurden verschiedene Methoden entwickelt (Hermanson, 1996). Oftmals besteht das Problem, daß der Ligand über mehrere funktionelle Gruppen verfügt, über die die Kopplung an ein Lipid erfolgen kann. Dann sind eine gerichtete Kopplung und ein reproduzierbares Kopplungsergebnis nicht zu erreichen, da die Liganden sich auf der Liposomenoberfläche unterschiedlich orientieren. Besonders problematisch ist es, wenn die Kopplung über das aktive Zentrum oder die Bindungsstelle des Liganden erfolgt. Als Folge kann die Aktivität des Liganden verringert werden oder er kann die Fähigkeit, Antigene zu binden, komplett verlieren.

Eine häufig verwendete Methode, um Proteine kovalent an die liposomale Oberfläche zu binden, ist die Kopplung über eine Thioetherbindung. Dabei erfolgt die Kopplung meistens über eine Maleimidgruppe eines Lipids an eine Thiolgruppe des Liganden, hierbei handelt es sich um eine nukleophile Addition (Martin et al., 1981; Hansen et al., 1995; Nielsen et al., 2002). Da in Proteinen die vorhandenen Thiol-Gruppen meistens in ihrer oxidierten Form als Disulfid-Brücken vorliegen, müssen diese erst erzeugt werden. Es besteht die Möglichkeit, Proteine mit Reagenzien, wie z. B. dem 2-Iminothiolan (Trauts Reagenz) oder SATA, zu derivatisieren und so Thiolgruppen zu erzeugen (Vingerhoeds et al., 1996). Dabei werden diese Reagenzien an Aminfunktionen des Proteins gekoppelt. Nachteilig ist hier, daß die Kopplung der Liganden dann über verschiedene Thiolgruppen verlaufen kann, wodurch keine gerichtete Kopplung garantiert werden kann. Alternativ kann gentechnisch ein zusätzliches Cystein in Proteine eingefügt werden. Bei der Expression erhält man so ein derivatisiertes Protein, das über eine Thiolgruppe verfügt (Zhao et al., 1999; Nielsen et al., 2002). Um die Aktivität des Zielsteuerungmotivs zu erhalten, dürfen solche Derivatisierungen nicht am aktiven Zentrum oder an der Bindungsstelle des Liganden vorgenommen werden.

Bei zwei weit verbreiteten kovalenten Kopplungsmethoden erfolgt die Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung: Zum einen werden N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin-haltige (N-Glut-PE) Lipide verwendet, bei denen die Carboxylgruppe mit einem Carbodiimid

(z. B. Ethyl-Dimethylaminopropyl Carbodiimid = EDC) aktiviert wird. Die entstandene reaktive Gruppe kann in einer nukleophilen Substitution mit einer Aminfunktion des Liganden reagieren (Weissig et al., 1986; Bogdanov et al., 1988). Zum anderen werden mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) modifizierte Lipide benutzt. Mit der NHS-Gruppe reagieren ebenfalls Aminfunktionen der Liganden in einer nukleophilen Substitution (Huang et al., 1980). Von Vorteil bei diesen Methoden ist, daß viele Liganden vor der Kopplung nicht modifiziert werden müssen. Da in einem Protein meistens mehrere Aminfunktionen vorkommen, ist die Kopplungsreaktion allerdings nicht steuerbar.

3. Ziele der Arbeit

Liposomen sind in der Lage, die pharmakokinetischen Eigenschaften sowie die Stabilität von Zytostatika zu verbessern und oft beobachtete Nebenwirkungen dieser Substanzen in der Tumortherapie zu verringern. Die Anreicherung in Tumorgeweben erfolgt jedoch rein passiv und basiert auf dem EPR-Effekt. Um die Selektivität solcher Trägersysteme für das Tumorgewebe zu erhöhen und um damit höhere Dosen von Zytostatika ins Tumorgewebe liefern zu können, besteht die Möglichkeit, Liposomen mit Liganden zu modifizieren. So können diese zu den Tumorzellen bzw. den Endothelzellen der neu gebildeten Tumorblutgefäße gelenkt werden (Sapra und Allen, 2003). Das Ziel der Arbeit bestand darin, neue zielgerichtete liposomale Trägersysteme für den Transport von zytotoxischen Substanzen ins Tumorgewebe zu erzeugen. Für die Zielsteuerung zu den Endothelzellen wurde ein humanes scFv-Fragment, das gegen Endoglin gerichtet ist, und ein gegen die α_v-Integrine gerichtetes RGD-Peptid verwendet. Als ein gegen die Tumorzellen gerichteter Ligand wurde ein EGF-Protein benutzt. In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst verschiedene Kopplungs- bzw. Insertionsmethoden zur Erzeugung zielgerichteter Liposomen basierend auf diesen Liganden evaluiert werden. Bei der Entwicklung sollte besonders darauf geachtet werden, daß die Eigenschaften der Liposomen durch die Modifikationen nicht negativ verändert werden. Dabei war es das Ziel, Systeme mit möglichst einheitlich orientierten Liganden zu erzeugen. Mittels *in vitro*- und *in vivo*-Studien sollte dann untersucht werden, ob die erzeugten zielgerichteten liposomalen Systeme für eine therapeutische Verwendung in Frage kommen. Danach sollten die zielgerichteten Liposomen mit dem Zytostatikum Doxorubizin beladen und mit diesen untersucht werden, ob die Zielsteuerung zu einer erhöhten Zytotoxizität bzw. zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt führt.

Darüber hinaus wurde das zellzyklusphasenspezifische Zytostatikum Cytarabin in eine neue liposomale Formulierung verkapselt. Hier wurde untersucht, ob die liposomale Verpackung des Cytarabins zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt führt.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene zielgerichtete liposomale Systeme für die Zytostatikatherapie von Tumorerkrankungen entwickelt. Zwei dieser liposomalen Formulierungen waren gegen neu gebildete Blutgefäße gerichtet, die solide Tumoren mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen. Dieses wird als vaskuläre Therapie bezeichnet. Als Zielstrukturen auf den Endothelzellen der Blutgefäße dienten zum einen das Endoglin und zum anderen die α_v-Integrine. Zur Zielsteuerung gegen das Endoglin wurden die Liposomen mit einem humanen Antikörperfragment (scFv-Fragment) und gegen die Integrine mit einem RGD-Peptid modifiziert. Bei dem dritten liposomalen System waren die Liposomen gegen den auf Tumorzellen lokalisierten EGF-Rezeptor gerichtet. Dabei diente als Ligand ein humanes und modifiziertes EGF-Protein. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit das Nukleosid-Zytostatikum Cytarabin in Liposomen verpackt.

Da diese Arbeit in einem industriellen Umfeld entstanden ist, wurden verschiedene, in der laufenden Entwicklung befindliche liposomale Formulierungen, verwendet. Die Entwicklung der patentgeschützten Formulierungen erstreckte sich von den AVE 3, über die AVE 7 und AVE 9 bis hin zu den AVE 95. Darüber hinaus wurden Versuche mit klassischen netto-ungeladenen Lipsomen, z. B. aus Ei-Phosphatidylcholin (EPC) und Cholesterol bestehend, durchgeführt. Die Liposomen wurden routinemäßig mit einem Gesamtlipidgehalt von 10 µmol/ml hergestellt. Um Liganden an bestehende Liposomen zu koppeln, wurden standardmäßig
je 10 mol% von einem der Kopplungslipide in die liposomalen Formulierungen inkorporiert (Tab. 4-1). Für Bindungs- und Aufnahmestudien wurden die fluoreszierenden Lipide Rhodamin-PE oder NBD-PE in einer Konzentration von 0,3 mol% in die liposomale Membran integriert. Standardmäßig wurde für die Erzeugung der zielgerichteten Liposomen kein PEG verwendet, da dieses aus patentrechtlichen Gründen innerhalb des industriellen Umfeldes nicht genutzt werden konnte. Eine verlängerte Zirkulationsdauer und eine geringere Permeabilität konnte aber auch durch die Verwendung von Sphingomyelin in den Formulierungen AVE 7, AVE 9 und AVE 95 erreicht werden, da dessen Einbau in Liposomen zu einer rigideren Struktur der Doppelschicht führt (Webb et al., 1995; Allen und Chonn, 1987; Gregoriadis und Senior, 1980).

	AVE 3	**AVE 4**	**AVE 7**	**AVE 8**	**AVE 9**	**AVE 95**	**AVE 10**	**AVE 14**	**Klassische Liposomen**	**Klassische Liposomen + Kopplungslipid**
Chol	33,30	30,00	35,00	31,50	35,00	50,00	31,50	30,00	33,00	29,70
POPC	-	-	15,40	13,90	32,10	24,70	28,90	-	-	-
DLPE	33,30	30,00	14,70	13,20	14,70	11,30	13,20	30,00	-	-
SM	-	-	18,20	16,40	18,20	14,00	16,40	-	-	-
DOPS	33,30	30,00	16,70	15,00	-	-	-	-	-	-
EPC oder DSPC	-	-	-	-	-	-	-	30,00	67,00	60,30
N-Glut-PE oder MCC-PE oder MPB-PE oder NHS-PEG-PE	-	10,00	-	10,00	-	-	10,00	10,00	-	10,00

Tab. 4-1: Zusammensetzungen der Liposomen (Angaben in mol%). Die liposomalen Bestandteile sind in Tab. 6-3 näher beschrieben. Die „klassische Liposomen“ besteht neben Cholesterol aus EPC oder DSPC. Die Formulierungen AVE 4, AVE 8, AVE 10, AVE 14 und die Formulierung „klassische Liposomen + Kopplungslipid“ enthalten 10 mol% von einem der folgenden Kopplungslipide: N-Glut-PE, MCC-PE, MPB-PE oder NHS-PEG-PE. Zur genauen Beschreibung wird in dieser Arbeit der abgekürzte Name des jeweiligen Kopplungslipids an die Bezeichnung der liposomalen Formulierung angehängt (z. B. AVE 10 N-Glut-PE, AVE 10 MCC-PE, AVE 10 MPB-PE und AVE 10 NHS-PEG-PE).

4.1. Darstellung von Immunliposomen mittels eines scFv-Fragments

Ziel dieser Versuche war es, ein zielgerichtetes liposomales System für eine optimierte Zytostatikatherapie von soliden Tumorerkrankungen zu entwickeln. Die Immunliposomen waren nicht gegen die Tumorzellen selber, sondern gegen die den Tumor versorgenden Blutgefäße gerichtet. Zur Zielsteuerung wurden die Liposomen mit Antikörperfragmenten modifiziert. Für deren Erzeugung wurde eine komplett synthetische scFv-Phagen-Bibliothek hergestellt, aus der Antikörperfragmente für die Endothelzell- und Melanomzell-Zielsteuerung gewonnen wurden. Aus der Selektion auf rekombinant exprimiertem, humanem Endoglin, wurde das scFv-Fragment A5 isoliert. Dagegen stammt das scFv-Fragment E1.3 aus einer Selektion, die direkt auf humanen proliferierenden Endothelzellen (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) und humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)) und humanen Melanomzellen (MeWo) durchgeführt wurde (Völkel et al., 2004).

4.1.1. Kopplung von scFv-Fragmenten über eine Carbonsäure-amidbindung

Bei dieser kovalenten Kopplungsmethode im wässrigen Milieu bei neutralem pH wird 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-(Glutaryl) (N-Glut-PE) als Kopplungslipid verwendet und in die liposomale Membran eingebaut. Die endständige Carboxylgruppe des N-Glut-PE´s wird im 1. Reaktionsschritt mittels eines Carbodiimids aktiviert. Hierzu wurde Ethyl-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid (EDC) verwendet. Als Reaktionsprodukt entsteht das aktive O-Acylisoharnstoff-Intermediat. Im 2. Reaktionsschritt reagiert dieses Zwischenprodukt mit einer primären Aminogruppe des scFv-Fragments, bei dieser Reaktion handelt es sich um eine nukleophile Substitution. Dabei entsteht eine Carbonsäureamidbindung (Williams und Ibrahim, 1981). Die Kopplungsreaktion kann bei saurem pH (Weissig et al., 1986) oder bei neutralem pH durchgeführt werden. Jedoch ist bei neutralem pH das EDC wesentlich stabiler als bei saurem pH (Ezpeleta et al., 1996; Nakajima und Ikada, 1995). Mit der hier beschriebenen Methode wurden erfolgreich Antikörper an Liposomen gekoppelt (Endoh et al., 1981; Bendas et al., 1998). Von Vorteil bei dieser Methode ist, daß Protein-Liganden vor der Kopplung nicht modifiziert werden müssen. Diese

verfügen über Aminfunktionen, über die die Kopplung an das aktivierte N-Glut-PE vermittelt wird. Bei diesen handelt es sich v. a. um die Aminogruppen der Lysine, die Guanidinogruppen der Arginine sowie die Aminogruppe am N-Terminus (Hermanson, 1996). Somit läßt sich die Kopplung schnell und effizient durchführen. Nach den meisten Protokollen ist eine Abtrennung von überschüssigem EDC vor der Zugabe des zu koppelnden Liganden nicht notwendig, da es mit Wasser abreagiert hat. So kann diese Kopplungsmethode in einem Schritt durchgeführt werden. Am Ende können überschüssiges EDC, nicht konjugierte scFv-Fragmente und das Isoharnstoff-Nebenprodukt gelchromatographisch mittels Sepharose 4B gemeinsam abgetrennt werden.

Aus diesen Gründen wurde versucht das scFv-Fragment mit dieser Methode an Liposomen zu koppeln. Da scFv-Fragmente aber über viele Aminfunktionen verfügen, ist davon auszugehen, daß sie nicht immer über dieselbe Aminosäure an den Lipidanker gekoppelt werden.

Das Aktivierungsreagenz EDC wird bei -20°C aufbewahrt und sollte vor dem Kontakt mit Luft erst auf Raumtemperatur erwärmt werden, um die Kondensation von Wasser zu vermeiden. Dieses könnte an Stelle der Carboxylgruppe des N-Glut-PE´s mit dem EDC reagieren. Aus diesem Grund sollte beim Umgang mit Carbodiimiden auch eine möglichst geringe Luftfeuchte herrschen.

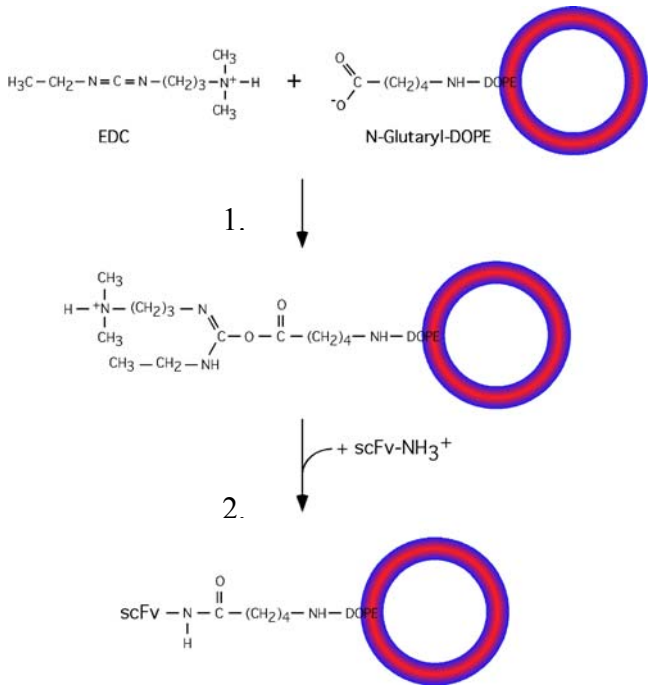


Abb. 4-1: Darstellung der Kopplungsreaktion: Im 1. Schritt findet die Reaktion zwischen dem Carbodiimid und der Carboxylgruppe des N-Glut-PE´s statt. Dabei entsteht das O-Acylisoharnstoff-Intermediat, das im 2. Schritt mit einer primären Aminogruppe des scFv-Fragments reagiert.

Für die Kopplung der endothelzellspezifischen scFv-Fragmente A5, E1.3 und des Kontroll-Fragments scFv Gal, das spezifisch an ß-Galaktosidase bindet, wurden die Formulierungen AVE 4 N-Glut-PE, AVE 8 N-Glut-PE und AVE 10 N-Glut-PE verwendet (diese werden in diesem Abschnitt nur noch als AVE 4, AVE 8 und AVE 10 bezeichnet), als Kontrolle diente die Formulierung AVE 3. Die Zusammensetzung der liposomalen Formulierungen ist in Tabelle 4-1 dargestellt. Als fluoreszierender Marker wurde diesen Formulierungen 0,3 mol% Rhodamin-PE zugesetzt. Die Liposomen wurden in einer Konzentration von 10 µmol Gesamtlipid/ml PBS hergestellt.

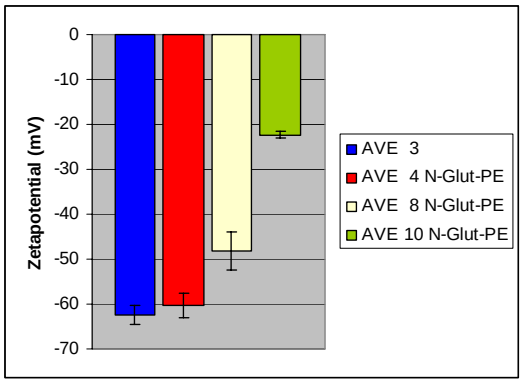


Abb. 4-2: Die Zetapotentiale der liposomalen Formulierungen AVE 3, AVE 4 N-Glut-PE, AVE 8 N-Glut-PE und AVE 10 N-Glut-PE. Die Meßmethode ist unter 6.7.3. beschrieben.

Die Formulierungen AVE 3 (- 62,3 ± 2,1 mV), AVE 4 N-Glut-PE (-60, 2 ± 2,7 mV), AVE 8 N-Glut-PE (- 48,2 ± 4,3 mV) und AVE 10 N-Glut-PE (-22,3 ± 0,8 mV) besaßen alle ein negatives Zetapotential, das auf die anionischen Lipide DOPS und N-Glut-PE zurückzuführen war (Abb. 4-2). Die Größen betrugen für alle Formulierungen 80 nm ± 3,2 nm.

Es wurden je 200 µl Liposomen mit 1,75 mg EDC versetzt, das im Verhältnis zum N-Glut-PE in einem 45-fachen molaren Überschuß vorlag. Dieser Ansatz wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, wodurch die Carboxylgruppe aktiviert wurde. Danach wurden scFv-Fragmente in Konzentrationen zwischen 25 (1 nmol) und 100 (4 nmol) µg pro 2 µmol Gesamtlipid zugegeben und weitere 12 Stunden schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die nicht konjugierten scFv-Fragmente gelchromatographisch mittels Sepharose 4B abgetrennt.

Um die erfolgreiche Kopplung des scFv-Fragments A5 zu überprüfen, wurden die gelfiltrierten Liposomen auf einem SDS-Polyacrylamidgel (12%-ig) elektrophoretisch

aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran konnten gekoppelte scFv-Fragmente durch Verwendung des α-Histidin-Tag-Antikörpers detektiert werden.

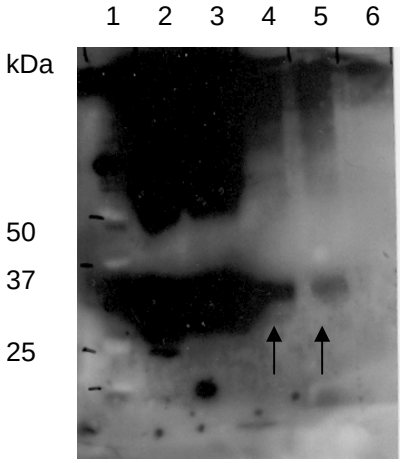


Abb. 4-3: Immunoblot der gelfiltrierten Liposomen
Spur 1: Marker (Precision Plus Protein Standard, BioRad), Größenangaben in kDa, Spur 2: 0,5 µg scFvA5, Spur 3: 1 µg scFvA5, Spur 4: AVE 4 + 25 µg scFvA5, Spur 5: AVE 8 + 25 µg scFvA5, Spur 6: AVE 10 + 25 µg scFvA5. Es wurden 20 µl der gelfiltrierten Liposomen (20µl Liposomen + 20 µl nicht reduzierender Probenpuffer) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose- Membran transferiert (Western-Blot). Als detektierender Antikörper wurde ein Peroxidase-markierter α-Histidin-Tag-Antikörper verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die Banden des an die AVE 4 und AVE 8 gekoppelten scFv-Fragments A5 auf einer Höhe von 27 kDa.

Der Immunoblot (Abb. 4-3) deutete auf eine erfolgreiche Kopplung des scFv-Fragments A5 an die liposomalen Formulierungen AVE 4 und AVE 8 hin. Dagegen schien keine Kopplung an die Liposomen der Formulierung AVE 10 stattgefunden zu haben. Wurden im Reaktionsansatz 50 µg (2 nmol) scFv-Fragment verwendet, kam es zu Ausfällungen bei den Formulierungen AVE 4 und AVE 8. Dies deutete auf eine Aggregatbildung und Quervernetzung der Liposomen durch die scFv-Fragmente hin. Nach der Inkubation der Formulierung AVE 10 mit dem scFv-Fragment A5 war dies nicht zu beobachten. Vor der Inkubation mit EDC und 25 µg scFv-Fragment A5 wiesen die AVE 4 und AVE 8 eine Größe von ca. 80 nm auf, nach der Inkubation stieg diese auf ca. 130 nm. Dies deutete darauf hin, daß während der Inkubation eine Reaktion stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu war bei den AVE 10 keine Änderung der Größe vor und nach der Inkubation mit dem EDC und dem scFv-Fragment A5 zu beobachten.

FACS-Analysen wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die mit den scFv-Fragmenten A5 und E1.3 erzeugten Immunliposomen (AVE 4 scFvA5) spezifisch an Endoglin-exprimierende Zellen binden. Zur Kontrolle wurde ebenfalls das Fragment scFv-Gal an die

Formulierung AVE 4 gekoppelt. Die fluoreszenzspektroskopische Detektion gebundener Liposomen erfolgte über das eingebaute Rhodamin-PE.

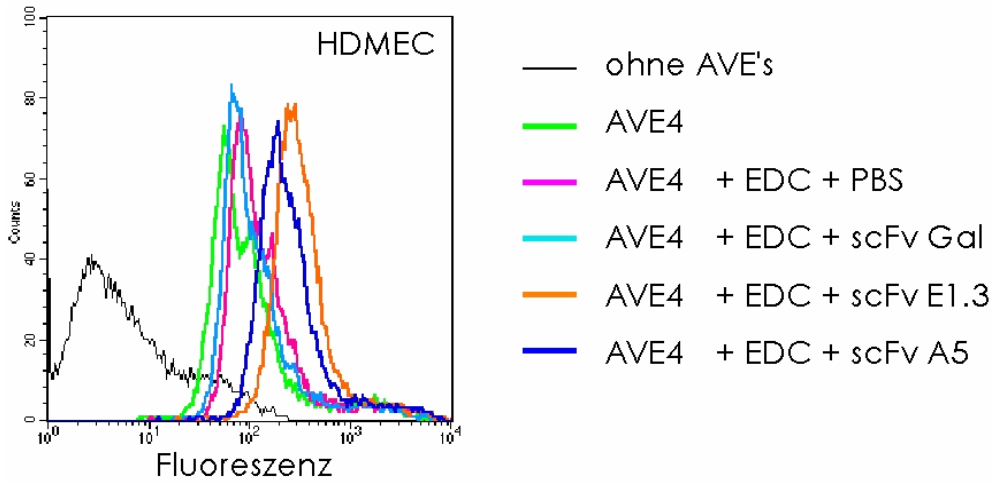


Abb. 4-4: Bindung von Immunliposomen an humane Endothelzellen (HDMEC)
Je 200000 Zellen wurden jeweils mit 50 nmol Gesamtlipid (Marker: Rhodamin-PE) bei 4°C 1h inkubiert und anschließend wurde im FACS-Calibur die Fluoreszenzintensität analysiert. Als Kontrollen wurden folgende Formulierungen verwendet: AVE 4, AVE 4 + EDC, AVE 4 + EDC + scFv Gal. Das scFv-Fragment E1.3 ist gegen Endothelzellen gerichtet und das scFv-Fragment A5 gegen Endoglin, das auf Endothelzellen exprimiert wird.

Die gegen Endoglin gerichteten Immunliposomen haben im Vergleich zu den Liposomen mit dem gekoppelten Kontroll-scFv-Fragment (scFv-Gal) stärker an HDMEC gebunden (Abb. 4-4). Dies deutete auf eine spezifische Bindung durch die scFv-Fragmente A5 und E1.3 hin. Allerdings zeigte schon die Formulierung AVE 4 eine starke Bindung an HDMEC, die durch die Behandlung mit EDC noch verstärkt wurde. Dies könnte auf ein Reaktionsprodukt zwischen dem N-Glut-PE und dem EDC hinweisen, das für die gesteigerte aber unspezifische Bindung verantwortlich gewesen sein könnte. In einer weiteren FACS-Analyse mit der Zell-Linie HEK 293, die kein Endoglin exprimiert, war diese unspezifische Bindung der Formulierung AVE 4 sowie eine Verstärkung durch die Aktivierung mit EDC ebenfalls nachweisbar, allerdings konnte hier keine zusätzlicher Effekt durch das scFv-Fragment A5 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis konnte mit HUVEC bestätigt werden (Abb. 4-5): Die stärkste Bindung an diese Zellen wurde mit Immunliposomen (AVE 4 + EDC + scFvA5) erreicht. Die Formulierung AVE 4 zeigte auch hier wieder alleine eine starke Bindung, die durch die Behandlung mit EDC noch gesteigert werden konnte.

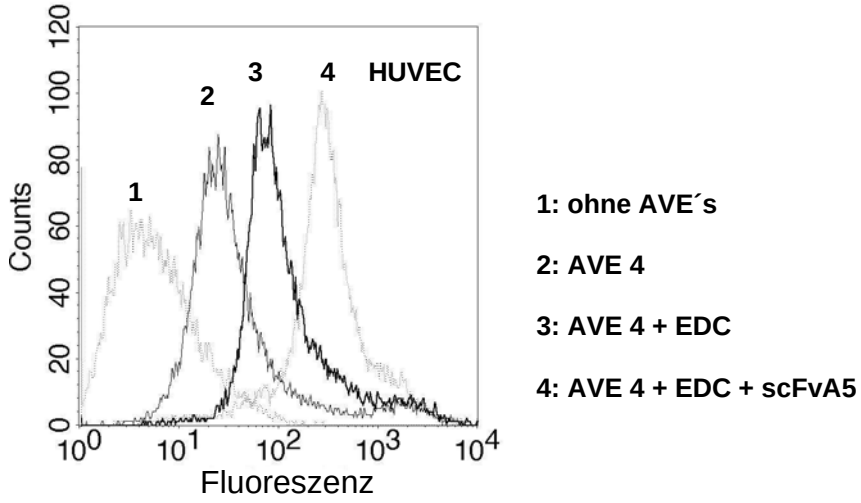


Abb. 4-5: Bindung von Immunliposomen an humane Endothelzellen (HUVEC): Je 200000 HUVEC wurden jeweils mit 50 nmol Gesamtlipid (Marker: Rhodamin-PE) bei 4ºC 1h inkubiert und anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität im FACS. Es wurden die liposomalen Formulierungen AVE 4, AVE 4 + EDC und AVE 4 + EDC + scFvA5 analysiert.

Durch weitere FACS-Analysen mit HUVEC konnte bestätigt werden, daß für die Kopplung der scFv-Fragmente das Kopplungslipid N-Glut-PE benötigt wurde und daß die scFv-Fragmente nicht nur unspezifisch an der Liposomenoberfläche „klebten“: Die Formulierung AVE 3, die kein N-Glut-PE enthält, zeigte auch schon eine starke Bindung, welche aber weder durch die Inkubation mit EDC noch mit dem scFv-Fragment A5 gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Für die Immunliposomen AVE 10 scFvA5 konnte keine Bindung an Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb. 4-6). Darüber hinaus zeigte diese Bindungsstudie, daß weder die AVE 10 selbst noch die mit EDC inkubierten AVE 10 an die Endothelzellen gebunden haben. Dies deutet darauf hin, daß das Kopplungslipid N-Glut-PE in dieser Formulierung nicht optimal auf der liposomalen Oberfläche präsentiert wird und für Liganden nicht zugänglich ist.

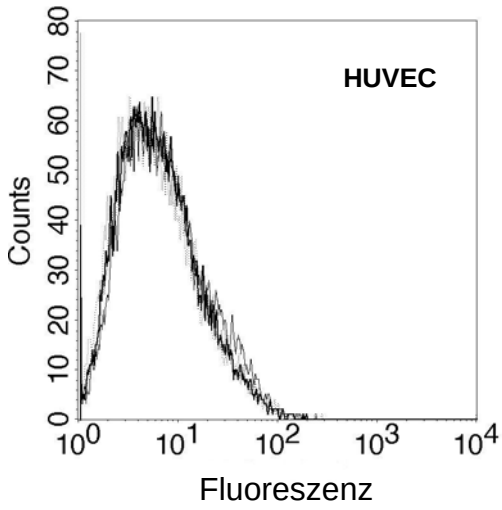


Abb. 4-6: Inkubation von humanen Endothelzellen (HUVEC) mit Immunliposomen (AVE 10): Folgende Formulierungen wurden analysiert: 1. ohne AVE´s, 2. AVE 10, 3. AVE 10 + EDC 4. AVE 10 + EDC + scFvA5. Die Kurven liegen alle übereinander. Es wurden je 200000 HUVEC mit je 50 nmol Gesamtlipid (Marker: Rhodamin-PE) bei 4ºC 1h inkubiert und anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität im FACS.

Da eine erfolgreiche Erzeugung von Immunliposomen mit dieser Kopplungsmethode nicht mit allen verwendeten Formulierungen möglich war, wurde sie nicht weiter verfolgt. Darüber hinaus war einerseits von Nachteil, daß die Aktivierung des Kopplungslipids durch EDC schon zu einer verstärkten, aber unspezifischen Zellbindung der Liposomen führte und andererseits, daß scFv-Fragmente über viele Aminfunktionen verfügen, über die sie an das Kopplungslipid N-Glut-PE gekoppelt werden können. Falls die Kopplung in der Nähe zur Antigenbindestelle oder über diese erfolgt, kann so die Aktivität des scFv-Fragments reduziert werden. Selbst bei einer erfolgreichen Kopplung ist ein spezifisches und reproduzierbares Produkt mit dieser Methode nicht zu erzielen.

4.1.2. Kopplung von scFv-Fragmenten über eine Thioetherbindung

Mit dieser Methode können Liganden, die über eine Thiolgruppe verfügen, kovalent an Maleimid-haltige Lipide gekoppelt werden (Hermanson, 1996). Bei den Lipiden handelt es sich um mit Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat (SMPB) oder Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) modifiziertes 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin (DOPE). Durch diese Derivatisierungen entstehen

die Kopplungslipide 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramid] (MPB-PE) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[4-(p-maleimidomethyl)cyclohexan-carboxamid] (MCC-PE), die endständig eine funktionelle Maleimid-Gruppe besitzen (Abb. 4-7).

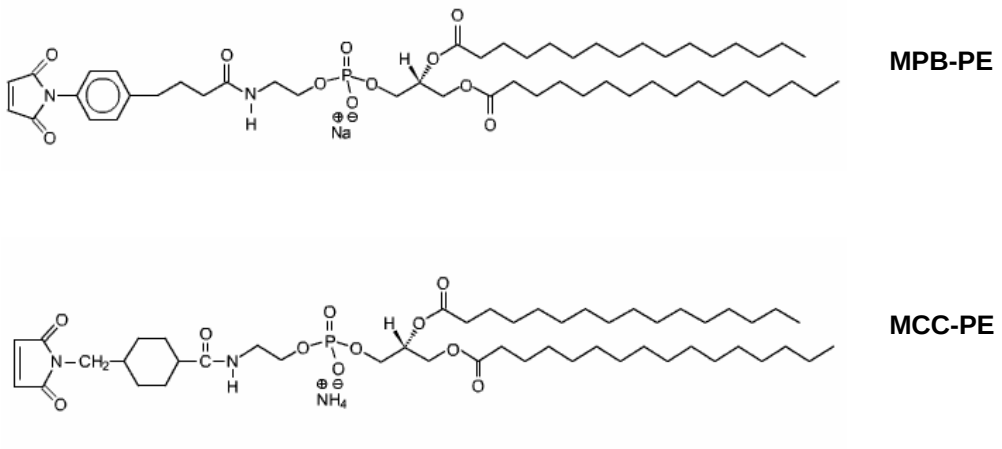


Abb. 4-7: Strukturformeln der Maleimid-haltigen Kopplungslipide MPB/MCC-PE. Beide Kopplungslipide besitzen eine negativ geladene Phosphatgruppe. Das MCC-PE ist durch den Cyclohexanring im Vergleich zum MPB-PE, das an derselben Position einen Benzolring aufweist, stabiler gegenüber Hydrolyse (Hermanson, 1996).

Diese Kopplungslipide müssen im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen N-Glut-PE nicht zusätzlich mit einem Reagenz wie dem EDC aktiviert werden (siehe 4.1.1.). Da Liganden oftmals über keine freien Thiolgruppen (bei Proteinen liegen diese meistens in ihrer oxidierten Form als Disulfide vor) verfügen, müssen sie oftmals zuerst modifiziert werden. Antikörper können mit Reagenzien (z. B. mit SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat) und SATA (N-succinimidyl-S-acetylthioacetat)), derivatisiert werden, die über geschützte Thiolgruppen verfügen. Direkt vor der Inkubation mit reaktiven Liposomen kann die Schutzgruppe abgespalten werden und die Thiol-Gruppen liegen in freier Form vor (Schwendener et al., 1990). Martin et al. (1981) koppelten Fab'-Fragmente über deren Thiolgruppen an Maleimid-haltige Liposomen. Die Thiol-Gruppen der Liganden reagieren in einer nukleophilen Addition mit den Maleimid-Gruppen der Kopplungslipide, dabei entsteht eine Thioetherbindung (Abb. 4-8). Diese Reaktion läßt sich im wässrigen Milieu bei neutralem pH einfach und effizient durchführen. Nicht konjugierte Liganden können danach gelchromatograpisch abgetrennt werden.

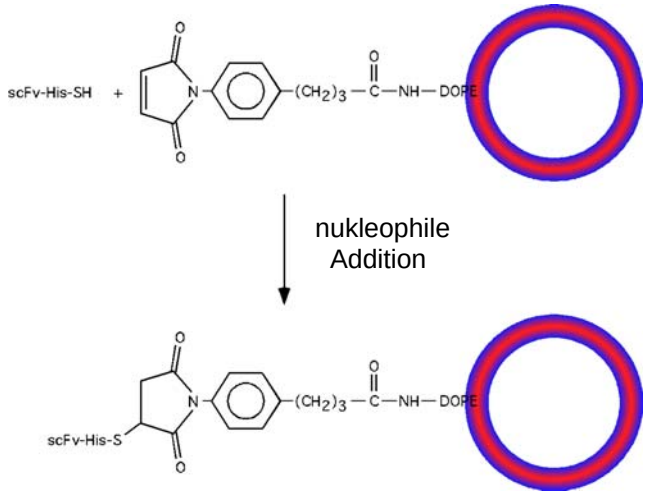
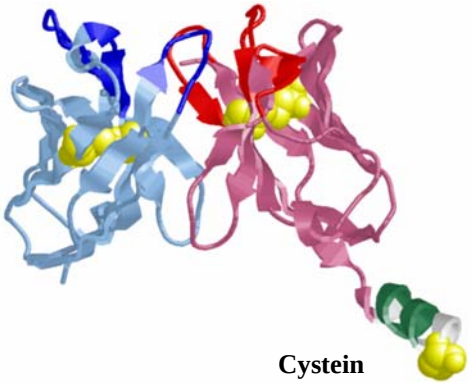


Abb. 4-8: Darstellung der Kopplungsreaktion von scFv-Fragmenten mit einer freien Thiol-Gruppe an die Maleimid-Gruppe des Kopplungslipids MPB-PE.

4.1.2.1. Erzeugung von scFv-Fragmenten mit einer freien Thiol-Gruppe

Das für die Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung verwendete scFv-Fragment A5 verfügte allerdings nicht über eine frei zugängliche Thiolgruppe. Um es über eine Thioetherbindung an Liposomen koppeln zu können, mußte es zuerst modifiziert werden: Diese Fragment erhielt auf DNA-Ebene die Information für einen Cystein-Rest am C-Terminus (Abb. 4-9).




```
scFv:              ...FGQGTKLEIKRAAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH*
scFv-His-Cys:      ...FGQGTKLEIKRAHHHHHHGGAC*
```

Abb. 4-9: Das modifizierte scFv-Fragment und die Gegenüberstellung der C-terminalen Aminosäuren-Sequenz des ursprünglichen scFv-Fragments (scFv) im Vergleich zu dem für die Kopplungsreaktion modifizierten scFv-Fragments (scFv-His-Cys).

Das modifizierte scFv-Fragment zeigte eine deutliche Tendenz zur Dimerisierung (ca. 20-50%), die im SDS-Polyacrylamidgel unter nicht-reduzierenden Bedingungen deutlich zu sehen war (Abb. 4-10). Unter reduzierenden Bedingungen mit β-Mercaptoethanol, das Disulfid-Brücken spaltet, war nur die Monomer-Bande bei 27 kDa nachzuweisen. Dies deutete darauf hin, daß die Dimerbildung durch Oxidation zweier C-terminaler Cystein-Reste zustande kam.

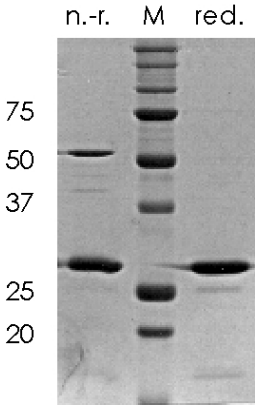


Abb. 4-10: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12%) des modifizierten scFv-Fragments A5: Das scFv-Fragment wurde unter reduzierenden (red.) und unter nicht reduzierenden (n.-r.) Bedingungen aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. M = Marker, Angabe der Größen in kDa, aufgetragene Menge scFv-Fragment: 1 µg, Reduktionsmittel: β-Mercaptoethanol

Damit das modifizierte scFv-Fragment an Maleimid-haltige Lipide gekoppelt werden konnte, mußte die Thiol-Gruppe in ihrer reduzierten Form vorliegen. Deshalb wurde vor der Kopplung ein geeignetes Reduktionsmittel gesucht, das die Disulfidbrücken der Dimere selektiv spalten konnte. Um das Reduktionsmittel vor der Kopplungsreaktion nicht abtrennen zu müssen, wurden Sulfhydryl-haltige Reagenzien, wie z. B. Cysteamin nicht in Betracht gezogen. Falls diese nicht vollständig umgesetzt werden, besteht die Gefahr, daß sie über ihre Sulfhydryl-Gruppen mit den Maleimid-Gruppen der Kopplungslipide reagieren. Deshalb wurde ein Phosphin-haltiges Reduktionsmittel, Tris(2-Carboxyethyl)Phosphin Hydrochlorid (TCEP, 2 mM) ausgewählt, daß theoretisch vor der Inkubation des scFv-Fragments mit den Liposomen nicht hätte abgetrennt werden müssen. Die Reduktion wurde unter Schutzgasatmosphäre mittels Argon bei Raumtemperatur (1h) durchgeführt, um eine Re-oxidation des scFv-Fragments A5 durch Luftsauerstoff weitgehend zu vermeiden. Es zeigte sich aber, daß das scFv-Fragment A5 ohne vorherige Abtrennung des TCEP´s nicht an Maleimid-haltige Liposomen gekoppelt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde

anschließend das TCEP mittels Gelfiltration (Sephadex G-25) von dem scFv-Fragment abgetrennt, um eine Reaktion mit den Lipiden zu vermeiden. Danach wurde die Kopplungsreaktion angesetzt.

4.1.2.1.1. Überprüfung der Aktivität der freien Thiolgruppen

Um zu überprüfen, ob das modifizierte scFv-Fragment A5 an Maleimid-Gruppen gekoppelt werden kann, wurde das mittels TCEP behandelte scFv-Fragment A5 zuerst mit einem 25-fachen molaren Überschuß an Fluorescein-Maleimid versetzt. Bei einer erfolgreichen Kopplung sollte sich das scFv-Fragment durch den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein detektieren lassen. Nicht gekoppeltes Fluorescein-Maleimid wurde mittels Gelfiltration über eine Sephadex G-25 Säule abgetrennt. Als Kontrolle wurde das nicht modifizierte scFv-Fragment A5 verwendet. Danach wurde die Fluoreszenz vermessen.

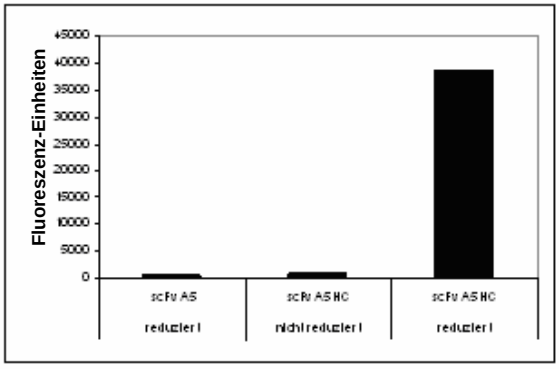


Abb. 4-11: Überprüfung der Kopplungseffizienz von Fluorescein-Maleimid an verschiedene scFvA5 Fragmente. Die Durchführung ist unter 6.8.5.2. beschrieben.

In Abb. 4-11 ist zu sehen, daß die Kopplung von Fluorescein-Maleimid nur an das modifizierte und reduzierte scFv-Fragment (scFv-A5-HC reduziert) erfolgreich gewesen ist. Dagegen ist die Kopplung weder bei dem unmodifizierten scFv-Fragment A5 (das ebenfalls mit TCEP inkubiert wurde) noch bei dem nicht reduzierten scFv Fragment A5-HC erfolgreich gewesen. Allerdings lag das nicht reduzierte scFv-Fragment A5-HC nicht zu 100% in dimerisierter Form vor (Abb. 4-10), theoretisch hätte man also eine erfolgreiche Kopplung

des monomeren Anteils erwarten können. Daß diese nicht stattgefunden hat, könnte daran liegen, daß während der Inkubationszeit von 12 Stunden auch noch die Sulfhydryl-Gruppen des monomeren Anteils oxidiert wurden und sich scFv-Dimere gebildet haben, die keine Kopplungsreaktion eingehen können. Auf Grund der nicht mehr vorhandenen Sulfhydryl-Gruppe können diese Dimere nicht mit den Maleimid-Gruppen der Kopplungslipide reagieren. Das Cystein könnte aber auch am C-Terminus protektiert bzw. abgespalten worden sein.

4.1.2.1.2. Überprüfung der Aktivität der Maleimid-Gruppen

Neutrale Liposomen, bestehend aus DSPC und Chol, wurden wieder in einer Konzentration von 10 µmol Gesamtlipid/ml PBS hergestellt, der Anteil der Kopplungslipde MPB-PE oder MCC-PE betrug 10 mol%. Um zu überprüfen, ob die Maleimid-Gruppen der Kopplungslipide frei zugänglich und aktiv waren, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Die Liposomen wurden mit dem fluoreszierenden und aktivierten Reagenz S-Acetylmercaptosuccinoyl-amino-fluorescein (SAMSA-Fluorescein) inkubiert. Bei SAMSA-Fluorescein wurden durch die Behandlung mit Natronlauge Thiolgruppen generiert, die mit Maleimid-Gruppen in einer nukleophilen Addition reagieren konnten. Nicht gebundenes SAMSA-Fluorescein wurde gelchromatographisch mittels Sephadex G-25 abgetrennt. Die gelfiltrierten Liposomen wurden anschließend fluoreszenzspektroskopisch vermessen (siehe 6.8.5.1.). Hier zeigte sich, daß nur die Liposomen mit den inkorporierten Kopplungslipiden eine eindeutige Fluoreszenzintensität aufwiesen, bei den Lipsosomen ohne Kopplungslipid war nur eine schwache Hintergrundfluoreszenzintensität zu beobachten (Abb. 4-12)

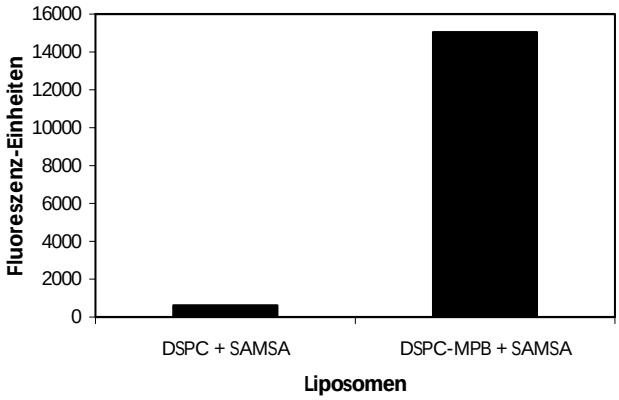


Abb. 4-12: Fluoreszenzintensität von SAMSA-behandelten Liposomen: Die Liposomen und das aktivierte SAMSA-Fluorescein wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 gemischt und 30 min inkubiert. Die mit SAMSA-Fluorescein inkubierten DSPC:Chol:MPB-PE Liposomen wiesen eine Fluoreszenzintensität von über 15000 Einheiten auf. Als Kontrolle wurden DSPC:Chol (6,7:3,3) Liposomen mit SAMSA-Fluorescein inkubiert, diese zeigten eine Fluoreszenz von ca. 600 Einheiten. Anregungswellenlänge: 495 nm, Emissionswellenlänge: 520 nm.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß die Maleimid-Gruppen des Kopplungslipids zugänglich und aktiv waren sowie mit freien Thiolgruppen reagieren konnten.

4.1.2.2. Kopplung des modifizierten scFv-Fragments an Maleimid-haltige Liposomen

Die Kopplung des scFv-Fragments A5 mit freier Thiol-Gruppe wurde folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurde das scFv-Fragment A5 reduziert (s. 3.1.2.1.) und sofort nach der gelchromatographischen Reinigung (Sephadex G-25) mit den Maleimid-haltigen Liposomen über einen Zeitraum von 12 Stunden unter Argon inkubiert. Anschließend erfolgte mittels Sepharose 4B die gelchromatographische Reinigung der Immunliposomen. Als Kopplungslipid wurde nur noch das MCC-PE verwendet, da dieses durch seinen Cyclohexanring eine größere Stabilität gegenüber Hydrolyse im Vergleich zum Benzolring-tragenden MPB-PE aufweist (Hermanson, 1996).

4.1.2.2.1. Versuche zum Nachweis der Kopplung

Für erste Versuche wurden 10 mol% des Kopplungslipids MCC-PE in die liposomale Formulierung AVE 9 (= AVE 10 MCC-PE) eingebaut. Diese Liposomen (1 µmol Gesamtlipid) wurden mit dem modifizierten und reduziertem scFv-Fragment A5 (1 nmol) inkubiert und nach der gelchromatographischen Reinigung wurde die Kopplung mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot überprüft: Dazu wurden Proben der Immunliposomen vor und nach der Gelfiltration mittels Sepharose 4B auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Danach wurde ein Western-Blot durchgeführt und die Detektion der scFv-Fragmente erfolgte mit einem α-Histidin-Tag-Antikörper.

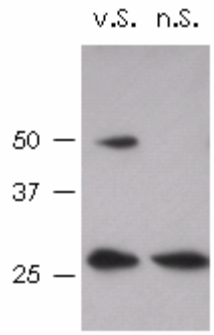


Abb. 4-13: Nachweis der Kopplung mittels Immunoblot: Für dieses Experiment wurden AVE 10 MCC-PE (10 mol%) verwendet und mit 1 nmol scFv-Fragment A5 inkubiert. Links wurden 10 µl des Reaktionsansatzes vor der Gelfiltration (v.S.) aufgetragen, rechts die 3-fache Menge des Reaktionsansatzes nach der Gelfiltration (Verdünnung 1:3) (n.S.). Größenangaben in kDa.

Der Immunoblot in Abbildung 4-13 zeigte, daß während der Inkubation der Liposomen mit dem reduzierten scFv-Fragment A5 über 12 Stunden eine Reoxidation stattgefunden hatte (Dimer-Bande bei ca. 50 kD). Nach der Abtrennung von unkonjugiertem scFv-Fragment A5 war diese Dimer-Bande nicht mehr vorhanden und nur noch die Monomer-Bande bei 27 KDa zu sehen. Bei der Inkubation von Liposomen ohne Kopplungslipid mit dem scFv-Fragment A5 war nach der Gelfiltration keine Bande zu sehen (Daten nicht gezeigt). Dies wies eindeutig darauf hin, daß das scFv-Fragment A5 über das Maleimid-haltige Lipid MCC-PE gekoppelt wurde.

Um dies zu bestätigen, wurden neutrale Liposomen (DSPC:Chol) ohne Kopplungslipid mit dem scFv-Fragment A5 inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen. Als Kontrolle wurden die DSPC:Chol Liposomen verwendet. Daneben wurden DSPC:Chol:MCC-PE Liposomen mit dem reduzierten scFv-Fragment A5 inkubiert und Zell-Bindungsstudien im FACS durchgeführt. Zur Detektion wurden 0,3 mol% des grün fluoreszierenden Markers NBD-PE in die liposomale Membran eingebaut.

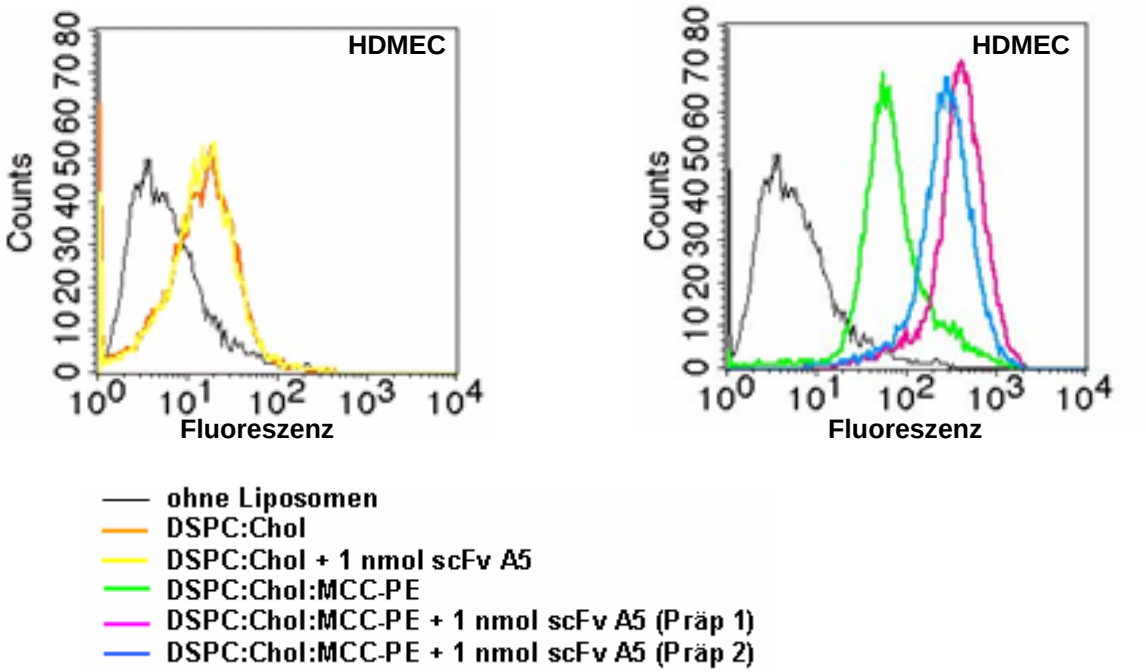


Abb. 4-14: Bindungsstudien von ungekoppelten und gekoppelten neutralen Liposomen (DSPC:Chol) an HDMEC. Zur Analyse der Zellbindung wurden je 200000 Zellen mit je 50 nmol Gesamtlipid versetzt und bei 4ºC 1h im Wasserbad inkubiert. Als Marker enthielten die liposomalen Formulierungen Rhodamin-PE. Danach erfolgte die Analyse im FACS.

Die FACS-Analyse (Abb. 4-14) zeigte, daß die DSPC:Chol Liposomen schon alleine an Endothelzellen gebunden haben, durch die Inkubation mit dem scFv-Fragment A5 konnte diese Bindung aber nicht weiter gesteigert werden. Durch den Einbau des Kopplungslipids MCC-PE in die Formulierung DSPC:Chol wurde die unspezifische Bindung an Endothelzellen erhöht. Es wurden zwei Präparationen DSPC:Chol:MCC-PE Liposomen mit dem scFv-Fragment A5 inkubiert (Verhältnis Gesamtlipid: scFv-Fragment A5 = 1 µmol : 1 nmol). Diese Formulierungen zeigten eine deutlich gesteigerte Bindung. Daraus konnte geschlossen werden, daß die Kopplung des scFv-Fragments A5 durch die Maleimid-haltigen Kopplungslipide vermittelt wurde.

4.1.2.2.2. Bestimmung der Kopplungseffizienz

Nachdem nachgewiesen war, daß das Antikörperfragment A5 über das Maleimid-haltige Kopplungslipid MCC-PE an Liposomen gekoppelt werden konnte, wurde die Kopplungseffizienz bestimmt. Dazu wurden gelchromatographisch gereinigte Immunliposomen wieder auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Vor der Säule betrug das Verhältnis 1 µmol Gesamtlipid zu 1 nmol scFv-Fragment A5. Auf demselben Gel wurden verschiedene Mengen an freiem scFv-Fragment A5 aufgetragen. Durch den optischen Vergleich der Bandenstärke des Immunoblots wurde die Kopplungseffizienz bestimmt.

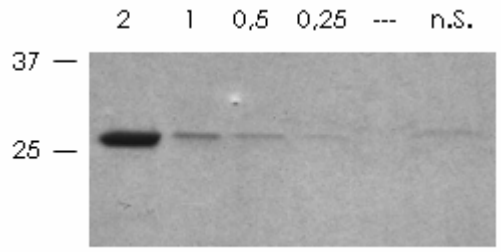


Abb. 4-15: Bestimmung der Kopplungseffizienz mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot. Aufgetragen wurden verschiedene Mengen scFv-Fragment A5 (0,25; 0,5; 1 und 2 µg) und 30 µl (Verdünnung 1:3) der gelfiltrierten Immunliposomen AVE 10 (n. S.). Die Gelelektrophorese (12%-iges SDS-Polyacrylamidgel) fand unter reduzierenden Bedingungen statt. Danach wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran überführt und dort mit einem α-Histidin-Tag-Antikörper detektiert. Größenangaben in kDa.

Durch den Vergleich der Bandenstärke unter Einbeziehung der Verdünnung ergab sich eine Kopplungseffizienz von ca. 10-20% (Abb. 4-15). Dies entspricht unter der Annahme, daß 80000 Lipide ein Liposom von 100 nm Durchmesser bilden (Kirpotin et al., 1997), einer Anzahl von 10-20 scFv-Fragmenten pro Liposom.

4.1.2.2.3. Titration des Kopplungslipids und des scFv-Fragments

Zur Ermittlung der Menge Kopplungslipid, die für eine nachweisbare Kopplung des scFv-Fragments A5 mindestens notwendig ist, wurden verschiedene Mengen des Kopplungslipides MCC-PE (0,1; 0,3; 1; 3 oder 10 mol%) in die liposomale Formulierung AVE 10 eingebaut.

Da aus der Literatur (Boeckler et al., 1996) bekannt war, daß Maleimid-Gruppen immunogen wirken können, wurden nicht mehr als 10 mol% des MCC-PE´s verwendet. Bei diesen Versuchen wurde die Menge scFv-Fragment A5 (1 nmol = 25 µg) sowie das molare Verhältnis von Gesamtlipid zu scFv-Fragment (1000 : 1) konstant beibehalten. Die Liposomen enthielten als Marker Rhodamin-PE und wurden im FACS analysiert.

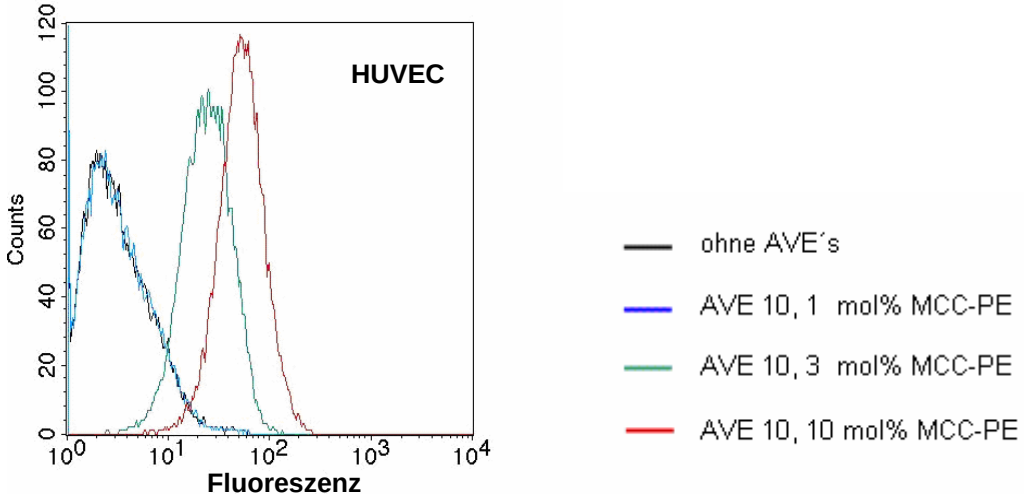


Abb. 4-16: Titration des Kopplungslipids MCC-PE. Zur Analyse der Zellbindung wurden je 200000 Zellen mit je 50 nmol Gesamtlipid (Marker: Rhodamin-PE) versetzt und bei 4ºC 1h im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität im FACS bestimmt.

Die FACS-Analyse (Abb. 4-16) zeigte, daß die stärkste Bindung mit 10 mol% MCC-PE erreicht wurde. Schon bei der Formulierung mit 3 mol% MCC-PE war ein deutlicher Rückgang der Bindung zu erkennen. Bei den AVE 10 mit 1 mol% MCC-PE war überhaupt keine Bindung mehr nachweisbar, dieses war ebenso bei den Formulierungen mit 0,1 und 0,3 mol% MCC-PE der Fall (Daten nicht gezeigt). Bei allen weiteren Experimenten wurden deshalb 10 mol% Kopplungslipid in die liposomalen Formulierungen inkorporiert.

Im nächsten Experiment wurde der Anteil des Kopplungslipids in den Liposomen konstant gehalten (10 mol% MCC-PE) und die zu koppelnde Menge des scFv-Fragments A5 variiert. Es wurden jeweils 1 µmol Gesamtlipid mit 0,5; 1 oder 2 nmol frisch reduziertem scFv-Fragment A5 versetzt. Die Analyse erfolgte wieder im FACS.

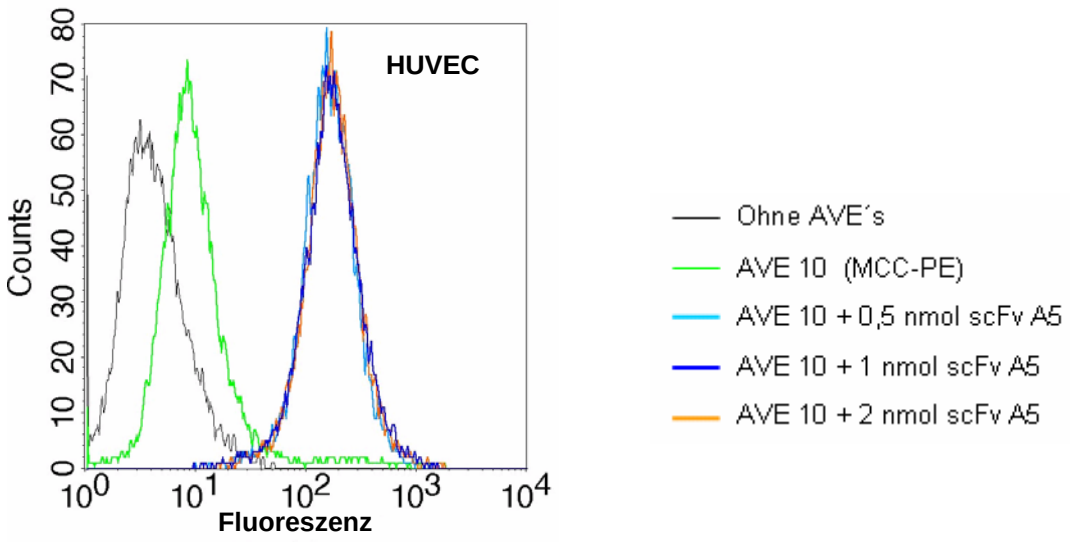


Abb. 4-17: Titration des scFv-Fragments A5: Je 200000 HUVEC wurden mit Rhodamin-markierten Liposomen (50 nmol Gesamtlipid) bei 4°C im Wasserbad für 1 h inkubiert und anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität im FACS.

In Abb. 4-17 ist ersichtlich, daß die gekoppelten Liposomen deutlich stärker gebunden haben als die ungekoppelten Liposomen. Allerdings war die Stärke der Bindung bei 0,5; 1 und 2 nmol scFv-Fragment A5 gleich. Dies deutete darauf hin, daß bereits mit 0,5 nmol scFv-Fragment A5 eine Zellsättigung erreicht wurde. Die ungekoppelten Liposomen zeigten nur eine schwache Hintergrundbindung. Für weitere Experimente wurden deshalb 0,5 oder 1 nmol scFv-Fragment pro µmol Gesamtlipid eingesetzt.

4.1.2.2.4. Absättigung von nicht-konjugierten Maleimid-Gruppen mit Cystein

Ein weiterer Schritt um die Formulierung zu optimieren bestand darin, die vorhandene Zell-Bindung der Maleimid-haltigen Liposomen zu verringern. Da diese Bindung vermutlich auf unkonjugierte Maleimid-Gruppen zurückzuführen war, wurden die mit Rhodamin-markierten Liposomen AVE 10 einer zehnminütigen Inkubation mit 0,5 mM Cystein unterzogen. Die Maleimid-Gruppen sollten durch die Reaktion mit dem Cystein inaktiviert werden. Durch diese „Maskierung“ sollten sie nicht mehr mit Strukturen auf den Zielzellen wechselwirken können. Nicht konjugiertes Cystein wurde gelchromatographisch mittels Sephadex G-25 abgetrennt. Danach wurde erneut eine Bindungsstudie durchgeführt.

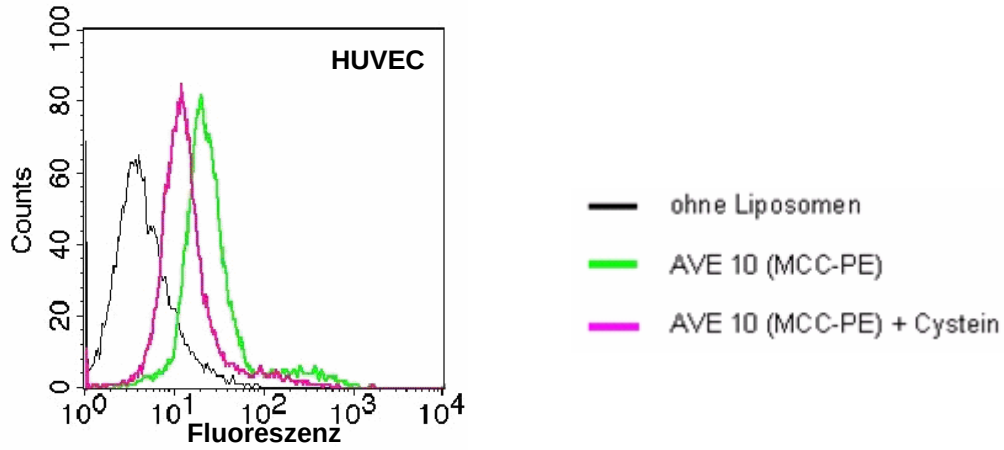


Abb. 4-18: Reduzierung der unspezifischen Bindung von ungekoppelten Liposomen mittels Cystein: Es wurde die Bindungsstärke von AVE 10 mit AVE 10, die einer vorherigen Inkubation mit Cystein unterzogen wurden, verglichen. Dazu wurden je 200000 HUVEC mit je 50 nmol Gesamtlipid (AVE 10 MCC-PE, markiert mit Rhodamin-PE) bei 4ºC 1h inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität im FACS vermessen.

Mit dieser FACS-Analyse (Abb. 4-18) konnte nachgewiesen werden, daß die Stärke der Zellbindung von Liposomen mit integriertem Maleimid-haltigem Kopplungslipid an Endothelzellen durch die Inkubation mit Cystein reduziert werden kann.

Um zu überprüfen, ob die Inkubation der gekoppelten Liposomen (AVE 10 MCC-PE scFvA5) mit Cystein einen Einfluß auf die Zellbindung hat, wurde wieder eine FACS-Analyse durchgeführt. Die Rhodamin-markierten Liposomen wurden nach der Inkubation über Nacht mit dem scFv-Fragment A5 für 10 min mit 0,5 mM Cystein versetzt. Nicht umgesetztes Cystein wurde zusammen mit den unkonjugierten scFv-Fragmenten gelchromatographisch mittels Sepharose 4B abgetrennt.

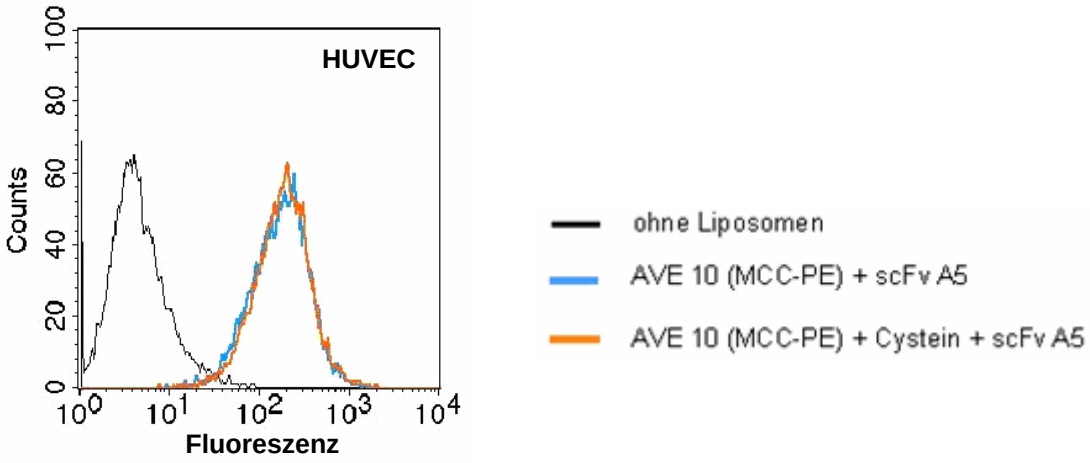


Abb. 4-19: Untersuchung zur Auswirkung von Cystein auf die Zielzell-Bindung von Immunliposomen. Es wurden je 200000 HUVEC mit je 50 nmol Gesamtlipid (AVE 10 MCC-PE) bei 4ºC 1h inkubiert und anschließend im FACS analysiert.

In Abbildung 4-19 ist ersichtlich, daß die Inkubation der Immunliposomen mit Cystein weder die Zielzell-Bindung erhöht oder erniedrigt. Deshalb wurde diese Methode bei der Erzeugung von Immunliposomen standardmäßig angewendet, um die Hintergrundaktivität zu reduzieren.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, daß das scFv-Fragment A5 über eine Thiolgruppe an Liposomen mit Maleimid-haltigen Lipiden gekoppelt werden kann. Im Gegensatz zur Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung, wie unter 4.1.1. beschrieben, konnte das scFv-Fragment A5 an die liposomale Formulierung AVE 10 gekoppelt werden. Ein weiterer Vorteil bestand darin, daß für diese Kopplung kein zusätzliches Aktivierungsreagenz wie das EDC gebraucht wurde, durch das die unspezifische Zellbindung wesentlich erhöht wurde. Die Zellbindung der Liposomen mit Maleimid-haltigen Kopplungslipiden konnte hier durch die Behandlung mit Cystein verringert werden. Auf Grund dieser vorteilhaften Eigenschaften wurde für alle weiteren Versuche diese Kopplungsmethode verwendet.

4.1.2.3. Physikochemische Charakterisierung

Um die Größen und das Zetapotential verschiedener liposomaler Formulierungen zu bestimmen, wurde ein Malvern Zetasizer 3000 HS verwendet.

.

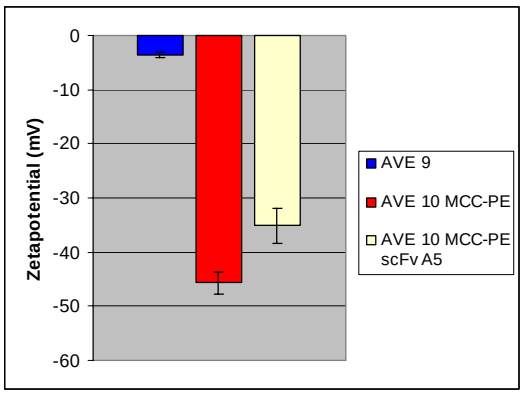


Abb. 4-20: Zetapotentiale der Formulierungen AVE 9, AVE 10 MCC-PE und AVE 10 MCC-PE scFvA5. Die Methode zur Bestimmung des Zetapotentials ist unter 6.7.3. beschrieben.

Die Formulierung AVE 9 (ohne Kopplungslipid) wies nur ein sehr gering negatives Zetapotential von -3,6 ± 0,4 mV auf. Durch die Inkorporation von 10 mol% MCC-PE in die Formulierung AVE 9 (= AVE 10 MCC-PE) fiel das Zetapotential auf -45,7 ± 2,1 mV, nach der Kopplung des scFv-Fragments A5 erreichte es wieder einen leicht weniger negativen Wert von -35,1 ± 3,2 mV (Abb. 4-20). Die Formulierungen wiesen folgende Größen auf: AVE 9: 94,1 ± 1,2 nm; AVE 10 MCC-PE: 99,8 ± 0,4 nm; AVE 10 MCC-PE scFvA5: 109,9 ± 2,1 nm. Die hier nicht dargestellten Polydispersitätsindizes lagen alle unter 0,08.

Bei den Formulierungen aus der EPC:Chol Gruppe zeigte sich ein ähnliches Bild:

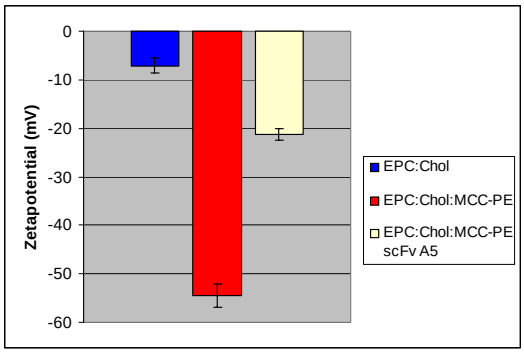


Abb. 4-21: Zetapotentiale der Formulierungen EPC:Chol, EPC:Chol:MCC-PE und EPC:Chol:MCC-PE scFvA5

Die Grundformulierung EPC:Chol besaß ein Zetapotential von -7,1 ± 1,5 mV, dieses wurde durch die Inkorporation von 10 mol% MCC-PE wieder stark negativ: -54,4 ± 2,4 mV. Durch die Kopplung des scFv-Fragments konnte es auf einen Wert von -21,3 ± 1,2 mV reduziert werden (Abb. 4-21). Die Formulierungen zeigten folgende Größen: EPC:Chol: 68 ± 0,6 nm; EPC:Chol:MCC-PE: 69,9 ± 0,4 nm; EPC:Chol:MCC-PE scFvA5: 94,9 ± 15,7 nm. Die Werte der hier nicht dargestellten Polydispersitätsindizes waren alle kleiner als 0,1.

Das stark negative Zetapotential der Liposomen mit dem Kopplungslipid MCC-PE war auf die Phosphatgruppe im MCC-PE Molekül zurückzuführen, da deren negative Ladung nicht von einer positiv geladenen Kopfgruppe kompensiert wird.

4.1.2.4. Bindungsstudien

Für diese Experimente wurden mit dem endothelzellspezifischen scFv-Fragment A5 Immunliposomen erzeugt. Standardmäßig wurden 1 nmol reduziertes scFv-Fragment/µmol Gesamtlipid eingesetzt (siehe 6.8.4.). Dabei wurde dieses scFv-Fragment über eine Thioetherbindung an verschiedene liposomale Formulierungen gekoppelt. Im wesentlichen wurden die Formulierungen AVE 10 MCC-PE und EPC:Chol:MCC-PE zur Erzeugung von Immunliposomen verwendet.

4.1.2.4.1. Spezifität der Immunliposomen für Endothelzellen

Zuerst sollte überprüft werden, ob die Immunliposomen noch dieselbe Zielzell-Spezifität wie das scFv-Fragment A5 (Völkel et al., 2004) alleine aufweisen. Dazu wurden FACS-Analysen mit verschiedenen Zell-Linien durchgeführt. Als Kontrolle diente das nicht endothelzellspezifische scFv-Fragment M5.2, das gegen murine Melanomzellen selektioniert wurde (Völkel et al., 2004). Dieses scFv-Fragment verfügte ebenfalls über ein C-terminales Cystein und konnte analog zum scFv-Fragment A5 an Liposomen gekoppelt werden (Kontroll-Immunliposomen). Es wurden jeweils 1 nmol scFv-Fragmnet zur Kopplung eingesetzt. Als Zielzellen dienten HUVEC, die Zell-Linien HEK 293 (humane Nierenzellen), bEND3 (murine Endothelzellen) und 3T3 (murine Fibroblasten) wurden als Kontrolle benutzt. Zusätzlich wurden noch MeWo (humane Melanomzellen), die auch in geringen Mengen Endoglin exprimieren, eingesetzt. Als liposomale Formulierung wurden mit Rhodamin markierte EPC:Chol:MCC-PE Liposomen verwendet.

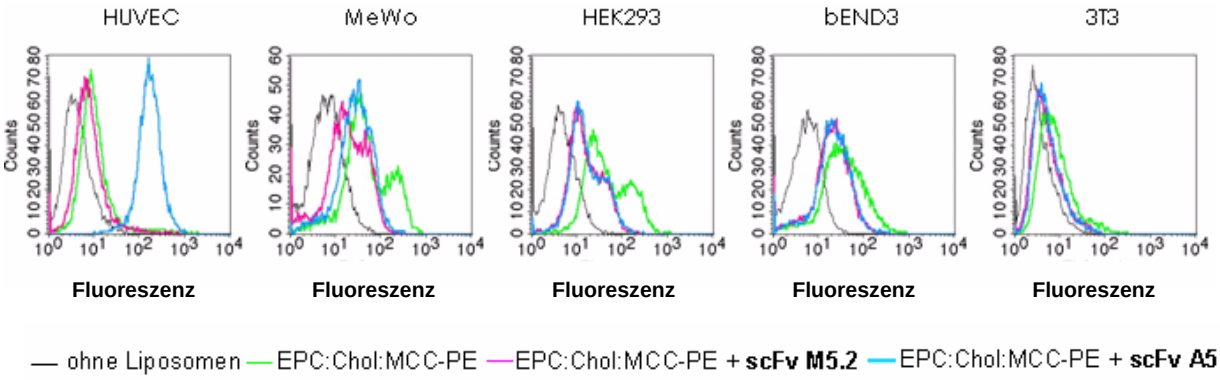


Abb. 4-22: Überprüfung der Zielzell-Spezifität der Immunliposomen: Es wurden jeweils 200000 Zellen mit 50 µl gelfiltrierten Immunliposomen (Marker: Rhodamin-PE) bei 4°C über 1h inkubiert, danach erfolgte die Analyse der Fluoreszenzintensität im FACS.

Die ungekoppelten Liposomen wiesen eine Größe von 65,1 ± 5,2 nm, die gekoppelten eine Größe von 80,3 ± 5,6 nm auf. Die FACS-Analyse (Abb. 4-22) zeigte, daß die Immunliposomen sehr stark an HUVEC, schwach an MeWo und nicht an die Kontrollzell-Linien HEK 293, bEND3 sowie 3T3 gebunden haben. Damit konnte bestätigt werden, daß diese Immunliposomen spezifisch an Endoglin-exprimierende Zellen binden. Die Kontroll-Immunliposomen zeigten wie die ungekoppelten Liposomen auf allen Zell-Linien eine schwache Hintergrundaktivität. Bei den MeWo und den HEK 293 waren Doppel-Peaks zu erkennen, das auf zwei Zellpopulationen (einen Anteil lebender und einen toter Zellen) hindeutete, die die Liposomen stärker oder schwächer binden konnten. Als Ursache wurde hier die hohe Passagezahl der verwendeten Zellen vermutet.

4.1.2.4.2. Kompetitionsexperimente mit freien scFv-Fragmenten

Um zu untersuchen, ob die Bindung der Immunliposomen über das scFv-Fragment A5 vermittelt wird, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Falls dies der Fall ist, sollte durch die Vorinkubation der Zielzellen mit freien scFv-Fragmenten derselben Spezifität die Bindung der Immunliposomen verringert bzw. verhindert werden. Um dies zu untersuchen, wurden die Endothelzellen (HUVEC) im ersten Experiment zuerst mit unterschiedlichen Mengen an freiem und unmarkiertem scFv-Fragment A5 (20, 50 und 100 µg/ml) über einen Zeitraum von 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Rhodamin-markierten Immunliposomen zugegeben und weitere 60 min bei 4°C inkubiert. Die Messung der

Fluoreszenzintensitäten erfolgte anschließend im FACS. In einem zweiten Experiment wurden die Endothelzellen mit dem Kontroll-Fragment M5.2 an Stelle des scFv-Fragments A5 vorinkubiert. Als liposomale Formulierung wurden wieder Rhodamin-markierte EPC:Chol:MCC-PE verwendet.

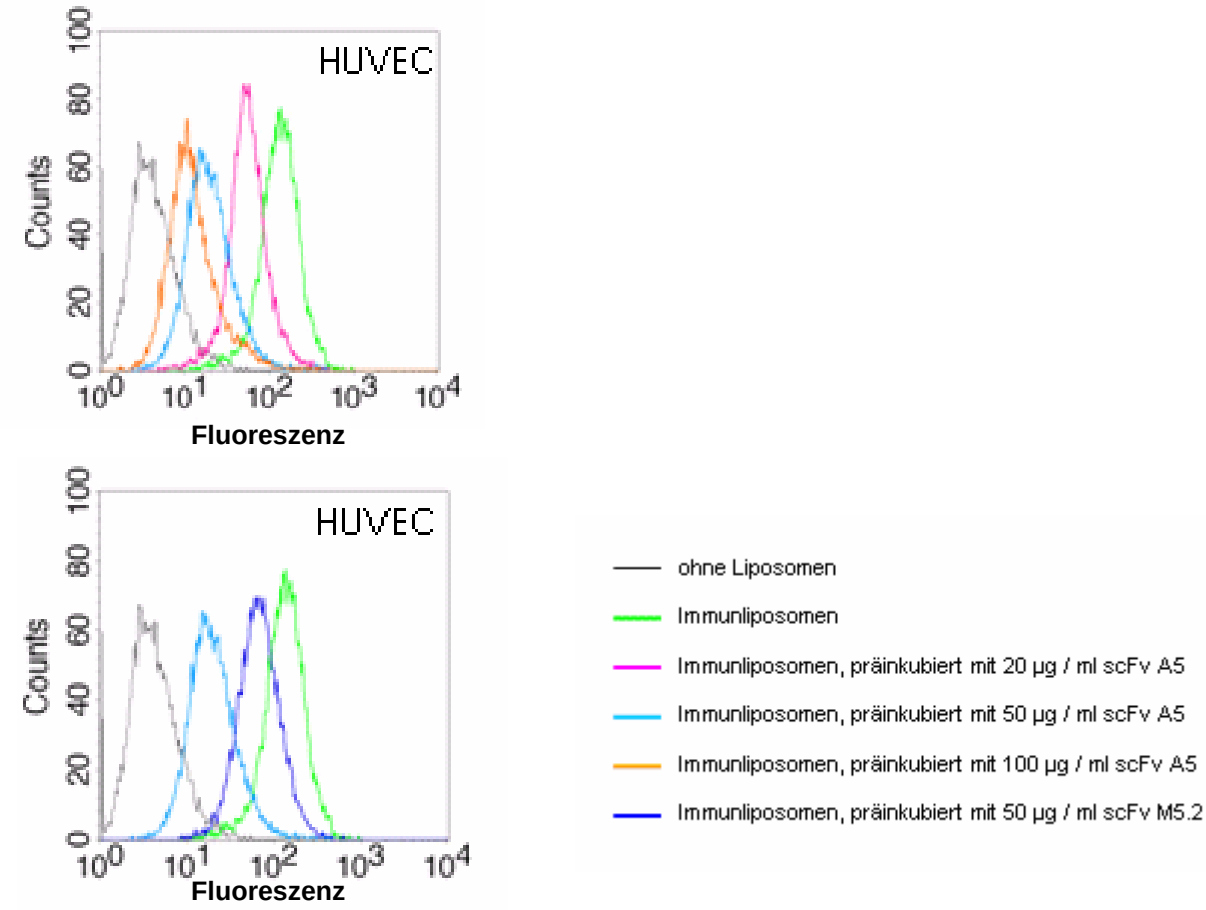


Abb. 4-23: Kompetitionsexperimente zur Überprüfung der spezifischen Bindung der Immunliposomen an Endothelzellen. Zuerst wurden je 200000 Zellen (HUVEC) entweder mit dem scFv-Fragment A5 oder mit dem scFv-Fragment M5.2 15 min bei 4°C vorinkubiert, danach erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit je 50 µl der gelfiltrierten Rhodamin-markierten Liposomen. Anschließend wurde die Fluoreszenz-Intensität im FACS vermessen.

Die Analyse im FACS (Abb. 4-23) ergab, daß die Stärke der Bindung der endothelzell-spezifischen Immunliposomen durch die Präinkubation mit freiem scFv-Fragment gleicher Spezifität konzentrationsabhängig verringert werden konnte. Die stärkste Kompetition der Bindung wurde durch die höchste Konzentration an freiem scFv-Fragment A5 (100 µg/ml) erreicht. Durch die Präinkubation mit dem Kontroll-scFv-Fragment M5.2 (50 µg/ml) wurde die Bindung der Immunliposomen nur leicht verringert, während die Bindung durch die

Präinkubation (50 µg/ml) mit dem scFv-Fragment A5 stark zurückgedrängt wurde. Die schwach reduzierte Bindung bei Präinkubation mit dem Kontroll-scFv-Fragment deutete darauf hin, daß das Grundgerüst des scFv-Fragments auch einen geringen Anteil zur Bindung beigetragen hatte. Überwiegend wird die Bindung zwischen den Endothelzellen und dem scFv-Fragment A5 aber durch dessen Spezifität vermittelt.

Nachdem der Beweis erbracht war, daß die Immunliposomen spezifisch an Zielzellen binden, wurden weitere Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese auch für einen späteren *in vivo*-Einsatz geeignet sind.

4.1.2.4.3. Zeitverlauf der Bindung

Da allgemein Immunliposomen im Körper relativ schnell abgebaut bzw. aus dem Blutkreislauf eliminiert werden, ist eine schnelle Bindung an die Zielzellen für einen erfolgreichen Einsatz notwendig (Mastrobattista et al., 1999). Folglich wurden kinetische Bindungsversuche mit den Immunliposomen an Endothelzellen durchgeführt. Hierzu wurden die Endothelzellen (HUVEC) über verschiedene Zeiträume (0, 15, 30, 45 oder 60 min) mit den Immunliposomen inkubiert. Als Kontrolle wurden ungekoppelte AVE 10 MCC-PE über 15 min mit den HUVEC inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der gekoppelten und ungekoppelten Rhodamin-markierten AVE 10 MCC-PE im FACS vermessen.

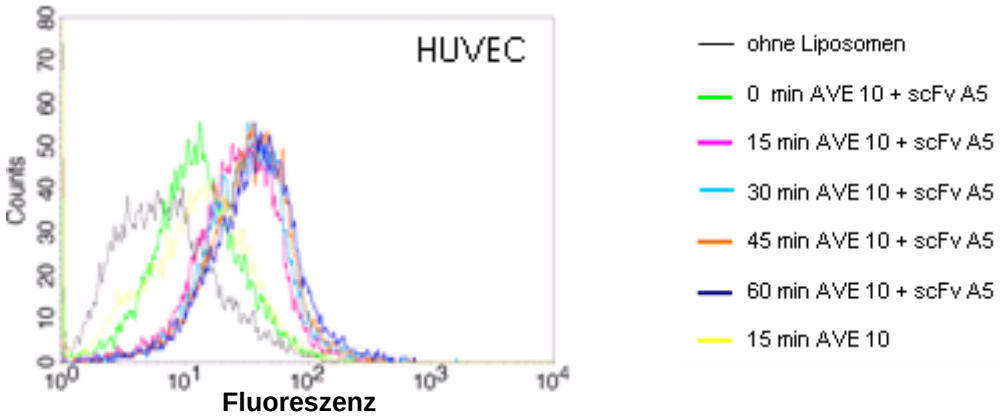


Abb. 4-24: Zeitverlauf der Bindung der Immunliposomen an Endothelzellen: Je 200000 HUVEC wurden mit den Rhodamin-markierten Immunliposomen (je 50 nmol) über verschiedene Zeiträume bei 4ºC inkubiert. Die Inkubation der ungekoppelten Kontroll-Liposomen erfolgte über einen Zeitraum von 15 min. Anschließend erfolgte die Analyse im FACS.

Die FACS Analyse (Abb. 4-24) zeigte, daß die Immunliposomen ohne eine vorherige Inkubation (0 min) noch keine spezifische Bindung an die HUVEC erkennen ließen, da die Stärke der Bindung der der ungekoppelten Kontrolle (Inkubation 15 min) entsprach. Eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität war nach 15 min Inkubationszeit zu beobachten. Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, daß die Immunliposomen schon nach 15 min Inkubationszeit sehr stark an die Zielzellen gebunden hatten. Eine weitere Erhöhung der Inkubationszeit führte nur zu einer geringfügigen Intensitätszunahme.

4.1.2.4.4. Bindungsstudien bei erhöhter Inkubationstemperatur

Die bisherigen Bindungsstudien wurden bei 4°C durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Immunliposomen auch bei erhöhten Temperaturen, wie sie *in vivo* herrschen, binden, wurden FACS-Versuche bei 37°C durchgeführt. Es wurden wieder Rhodamin-markierte AVE 10 MCC-PE verwendet und die Fluoreszenzintensität der ungekoppelten mit den gekoppelten Liposomen einerseits bei 4°C und andererseits bei 37° im FACS verglichen.

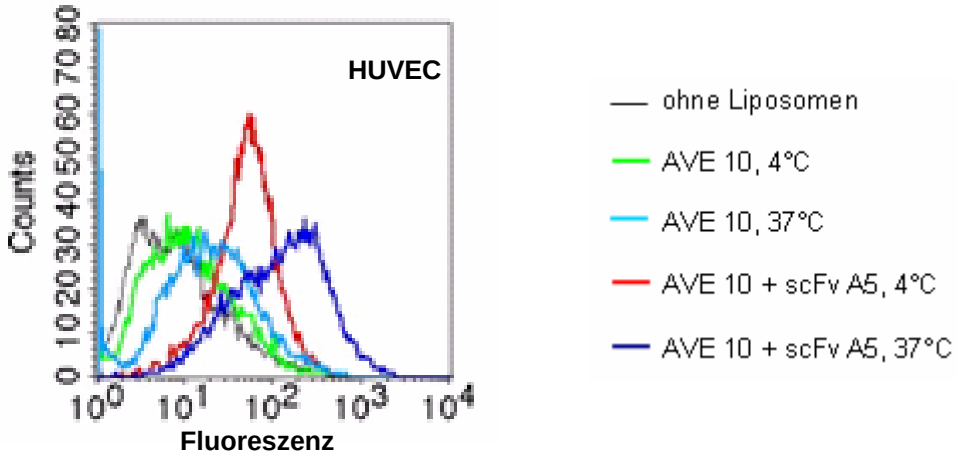


Abb. 4-25: Untersuchung des Bindungsverhaltens von Immunliposomen bei 4°C und 37°C. Es wurden je 200000 Zellen mit den Rhodamin-markierten Liposomen (je 50 nmol Lipid) bei 4°C bzw. 37°C über einen Zeitraum von 1h inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität im FACS.

Wie in Abb. 4-25 zu erkennen ist, konnte auch bei der erhöhten Inkubationstemperatur von 37ºC eine eindeutige Bindung der Immunliposomen an Endothelzellen nachgewiesen werden. Insgesamt war die Stärke der Bindung bei 37°C für die ungekoppelten wie für die gekoppelten Liposomen stärker als bei 4°C. Bei 37°C waren die Peaks der Fluoreszenzintensitäten allerdings breiter, was auf eine inhomogenere Bindung bei dieser Temperatur schließen ließ.

4.1.2.4.5. Inkubation der Immunliposomen mit humanem Plasma

Um die *in vivo*-Umgebung der Immunliposomen (AVE 10 MCC-PE scFvA5) zu simulieren, wurden diese mit humanem Plasma über verschiedene Zeiträume (1h, 2h, 3h, 6h und 24h) vorinkubiert und erst anschließend erfolgte die Inkubation mit den Endothelzellen. Danach erfolgte die Analyse im FACS. Hier sollte herausgefunden werden, ob sich die Bindungseigenschaften der Immunliposomen durch die Interaktion mit humanem Plasma verändern würden. Als Kontrolle dienten die gleichen, jedoch unbehandelten Immunliposomen.

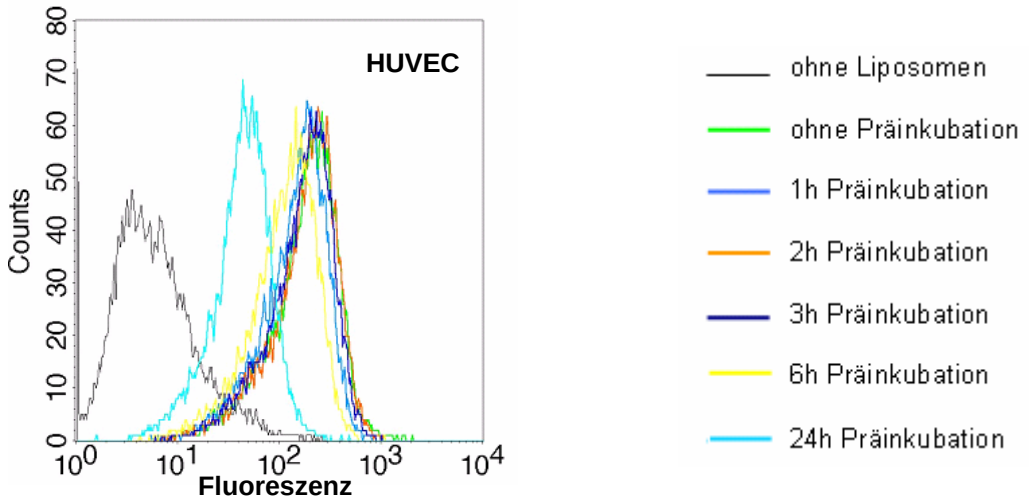


Abb. 4-26: FACS-Analyse von Immunliposomen nach Präinkubation mit humanem Plasma. Die Immunliposomen (je 50 nmol Lipid) wurden zuerst bei 37°C über verschiedene Zeiträume mit humanem Plasma inkubiert. Danach wurden je 200000 HUVEC bei 4°C über 1h mit den vorinkubierten Liposomen versetzt. Anschließend erfolgte die Analyse der Fluoreszenzintensität im FACS. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an Immunliposomen ohne vorherige Inkubation verwendet.

Bei diesem Experiment (Abb. 4-26) zeigte sich, daß sich die Stärke der Bindung der Immunliposomen bei einer Inkubationszeit von bis zu 3 Stunden mit humanem Plasma an HUVEC im Vergleich zu den Kontroll-Liposomen nicht verändert hatte. Ein leichter Rückgang der Bindung war erst nach 6 Stunden zu beobachten, der nach 24 Stunden deutlich zu sehen war. Auch diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die Immunliposomen für eine *in vivo*-Anwendung über eine ausreichend große Stabilität verfügen.

4.1.2.5. Bindungs- und Aufnahmestudien der Immunliposomen mittels Fluoreszenzmikroskop

Zuerst wurden die Immunliposomen auf ihre Bindung an Endothelzellen untersucht. Für diese Versuche wurden wieder Rhodamin-markierte EPC:Chol:MCC-PE Liposomen verwendet, an die das scFv-Fragment A5 gekoppelt wurde (siehe 6.8.4.). Die Inkubation mit HUVEC erfolgte bei 4°C. Als Kontrolle dienten die gleichen ungekoppelten Liposomen. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop.

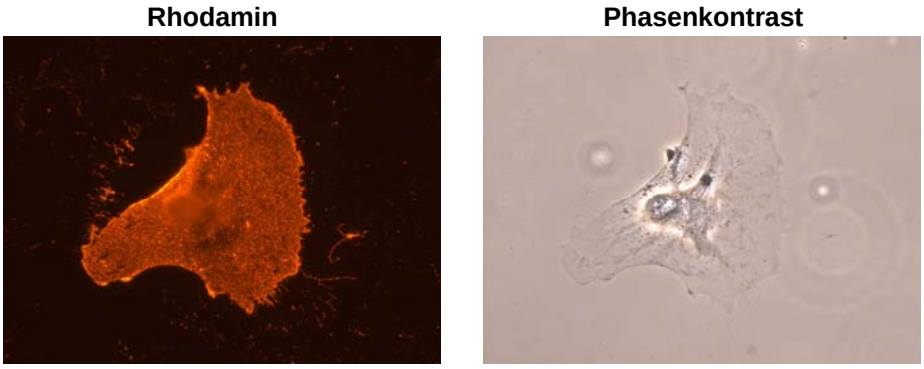


Abb. 4-27: Fluoreszenz der Immunliposomen: 200000 HUVEC wurden mit 50 µl der gelchromatographisch gereinigten und Rhodamin-markierten Immunliposomen über 1h bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen und Fixieren der Zellen mit 4%-igem Paraformaldehyd wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Belichtungszeit: 0,5 s; Vergrößerung: 400-fach.

Mit diesem Experiment konnten die Ergebnisse der FACS-Analysen bestätigt werden. Im Fluoreszenzmikroskop war eine sehr starke Fluoreszenz über die gesamte Zelloberfläche zu erkennen (Abb. 4-27). Dieses ließ auf eine Bindung der Immunliposomen an die Zellen schließen. Dagegen war in den fluoreszenzmikroskopischen Studien der ungekoppelten Kontroll-Liposomen (EPC:Chol:MCC-PE) keine Fluoreszenz zu erkennen, dies deutete auf eine nur äußerst schwache Bindung hin (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde untersucht, ob die Immunliposomen bei 37°C auch internalisiert werden. Diese Fragestellung ist in Bezug auf eine spätere Verwendbarkeit in der Tumortherapie von großer Bedeutung, da mit Zytostatika beladene Immunliposomen ihren Inhalt erst in der Zielzelle freigeben sollen.

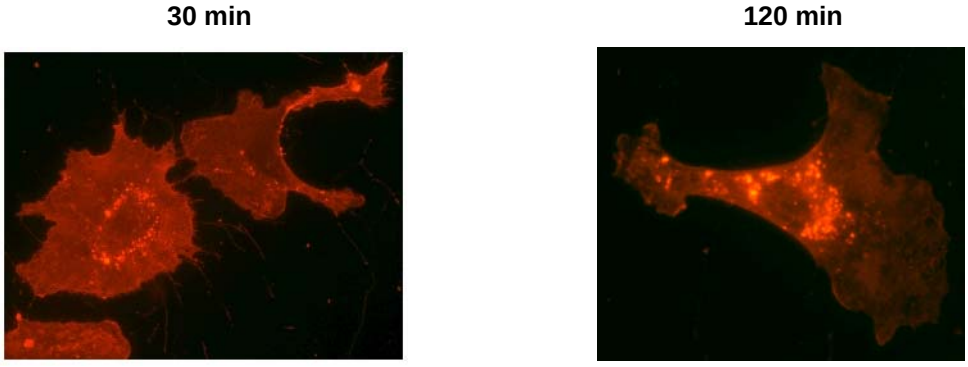


Abb. 4-28: Fluoreszenz der Immunliposomen bei 37°C: 200000 HUVEC wurden mit 50 µl der gelchromatographisch gereinigten und Rhodamin-markierten Immunliposomen bei 37°C für 30 oder 120 min inkubiert. Nach dem Waschen und Fixieren mit 4%-igem Formaldehyd in PBS erfolgte die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop. Belichtungszeit: 1s, Vergrößerung: 400-fach

Nach einer Inkubation von 30 min war einerseits eine Anreicherung der Fluoreszenz an der Zelloberfläche und damit eine Bindung zu erkennen, andererseits war aber auch schon eine beginnende Internalisierung in Form einer perinukleären Akkumulation der Fluoreszenz zu sehen (Abb. 4-28). Nach 120 min war die Internalisierung sehr weit fortgeschritten. Dies zeigte sich in der fast ausschließlich um den Zellkern lokalisierten Fluoreszenz. Bei der Verwendung von HEK als Kontrollzellen war weder bei 4°C eine Bindung noch bei 37°C eine Aufnahme der Immunliposomen zu sehen, ebenso war keine Aufnahme der ungekoppelten Kontroll-Liposomen bei 37°C zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Internalisierung der Immunliposomen in die Zielzellen gezeigt werden konnte, wurden weitere Experimente durchgeführt, um den Aufnahmemechanismus genauer zu untersuchen. Hierzu wurden die Endothelzellen mit Bafilomycin A1, einem Inhibitor der Acidifizierung von Endosomen, inkubiert. Danach wurden die Immunliposomen hinzugefügt und die Endothelzellen wurden mit diesen über verschiedene Zeiträume (1h, 2h, 4h, 8h und 20h) inkubiert. Falls die Immunliposomen über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden, sollten sie zuerst in den Endosomen verbleiben, bevor sie ins Zytosol freigesetzt werden. Hierzu wurden Rhodamin-markierte AVE 10 MCC-PE Immunliposomen verwendet.

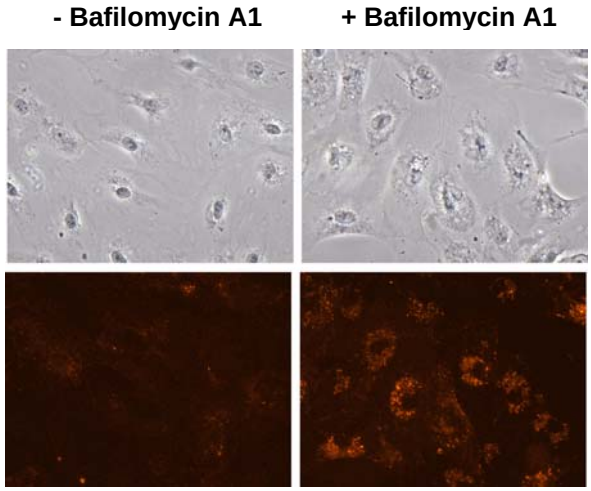


Abb. 4-29: Fluoreszenz der Immunliposomen mit und ohne vorheriger Inkubation der Endothelzellen mit Bafilomaycin A1: Die HUVEC wuchsen auf Deckgläschen und wurden im Falle einer vorherigen Inkubation für 30 min bei 37°C mit Bafilomycin A1(300 nM) inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit je 50 µl gelchromatographisch gereinigten und Rhodamin-markierten Immunliposomen für 20 h bei 37°C. Nach dem Waschen und Fixieren mit 4%-iger Paraformaldehydlösung in PBS wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Belichtungszeit: 1s, Vergrößerung: 200-fach.

Durch die Behandlung der Endothelzellen mit Bafilomycin A1 veränderte sich das Verteilungsmuster der Fluoreszenz von den Rhodamin-markierten Immunliposomen (Abb. 4-29). Ohne Bafilomycin A1 schienen die Immunliposomen wesentlich breiter über die ganze Zelle verteilt zu sein, während mit Bafilomycin A1 eine deutliche vesikuläre Akkumulation zu sehen war. Diese wurde mit zunehmender Inkubationsdauer immer stärker und war nach 20 Stunden besonders deutlich zu erkennen. Das Muster deutete darauf hin, daß die Immunliposomen über Endozytose aufgenommen wurden.

4.1.2.6. Beladung der Immunliposomen mit Doxorubizin

Liposomen können mittels des Remote-Loading-Verfahrens mit Doxorubizin beladen werden Mayer et al., 1986). Um dies zu erreichen, wird der Lipidfilm mit Citrat-Puffer (pH 4, 300 mM) hydratisiert und nach der Extrusion der Liposomen wird der pH-Wert im äußeren Medium durch die Zugabe von Natronlauge auf einen Wert von ca. 7,5 angehoben. Wird nun zu dieser Phase gleichzeitig Doxorubizin hinzugefügt, kann es in neutraler Form durch die liposomale Membran diffundieren und wird dann im Inneren der Liposomen protoniert. In dieser Form ist es nicht mehr permeabel und wird im Liposom in einem gelartigen Zustand „festgehalten".

Zuerst wurde untersucht, ob die Liposomen vor oder nach der Kopplung mit Doxorubizin beladen werden sollten. Das molare Verhältnis von Gesamtlipid zu Doxorubizin betrug vor der Beladung 5:1. Der Doxorubizin-Gehalt der Liposomen wurde photometrisch bestimmt. Die Liposomen, die erst nach der Kopplungsreaktion mit Doxorubizin beladen wurden, wiesen eine Kopplungseffizienz von ca. 20% auf. Wurde das scFv-Fragment A5 erst nach der Beladung an die Liposomen gekoppelt, konnte eine Kopplungseffizienz von ca. 50-60% erreicht werden. Diese Ergebnisse wurden mit der Formulierung AVE 10 erzielt, zwischen den Kopplungslipiden MPB-PE und MCC-PE zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Beladungseffizienz. Standardmäßig erfolgte die Kopplung des scFv-Fragments A5 an die Liposomen deshalb erst nach deren Beladung. Diese geringen Beladungseffizienzen sind vermutlich auf die Maleimidgruppen zurückzuführen (Hansen et al., 1995). Mittels eines Immunoblots konnte nachgewiesen werden, daß die Kopplungseffizienz durch den Beladungsvorgang nicht beeinträchtigt wurde (Daten nicht gezeigt).
Um nicht verkapseltes Doxorubizin von den Immunliposomen abzutrennen, wurden folgende Methoden verglichen: Zum einen die Abtrennung in Vivaspins® mittels Zentrifugation und zum anderen eine gelchromatographische Reinigung (Säulenmaterial: Sepharose 4B). Anschließend wurden die Größen der Liposomen bestimmt, dabei wurden zwischen den beiden Methoden aber keine wesentlichen Unterschiede festgestellt. Standardmäßig wurde der Abtrennung mittels Vivaspin der Vorzug gegeben, da diese Methode schnell und effizient durchzuführen ist. Des weiteren kommt es verglichen mit der gelchromatographischen Reinigung zu keiner Verdünnung. Letzteres ist für spätere *in vivo*-Versuche besonders wichtig, da das zu applizierende Volumen möglichst klein sein sollte.

4.1.2.7. Untersuchung der Zytotoxizität von Doxorubizin-beladenen Immunliposomen

Um zu überprüfen, ob die Internalisierung der Immunliposomen auch zu einer gesteigerten Zytotoxizität führen würde, wurden AVE 10 MCC-PE zuerst mittels des Remote-Loading-Verfahrens (siehe 6.7.6.1.) mit Doxorubizin beladen und anschließend wurde daran das scFv-Fragment A5 gekoppelt. Das Doxorubizin wurde photometrisch quantifiziert (siehe 6.7.8.). Danach wurden Kristallviolett-Tests (Bonnekoh et al., 1989; siehe 6.10.) mit verschiedenen Zell-Linien durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden je 10000 HUVEC pro well einer 96 well-Platte ausgesät und mit den verschiedenen Formulierungen in einer Verdünnungsreihe, ausgehend von 10 µM Doxorubizin, versetzt und für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Effekte durch aus den Liposomen außerhalb der Zellen freigesetztes Doxorubizin zu minimieren. Anschließend wuchsen die Zellen für weitere 48 Stunden. Nach dem Waschen wurden die verbliebenen Zellpellets mit Kristallviolett angefärbt und photometrisch bei 540 nm vermessen. Aus den ermittelten Werten konnten graphisch die IC_{50}-Werte (die Konzentration, bei der 50% der Zellen abgestorben sind) ermittelt werden.

Formulierung	HUVEC	HDMEC	HEK
Dox	3	1,4	0,4
AVE 10 A5 Dox	1,2	0,1	›10
AVE 10 Dox	›3	›10	›10
AVE 10 A5	›10	›10	›10

Tab. 4-2: Darstellung der IC_{50}-Werte (µM) des Kristallviolett-Tests: Als Endothelzell-Linien wurden HUVEC sowie HDMEC und als Kontrollzell-Linien HEK verwendet. Das Experiment wurde mit den folgenden Formulierungen durchgeführt: freies Doxorubizin (Dox), beladene Immunliposomen (AVE 10 A5 Dox), beladene ungekoppelte Liposomen (AVE 10 Dox) und unbeladene Immunliposomen (AVE 10 A5). Als Kopplungslipid wurde das MCC-PE in einer Konzentration von 10 mol% verwendet.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß die Immunliposomen im Vergleich zu den anderen Formulierungen auf Endothelzellen am stärksten zytotoxisch wirkten. Dies ist vermutlich auf eine Internalisierung und verstärkte Freisetzung des Doxorubizins innerhalb der Zellen zurückzuführen. Freies Doxorubizin wirkte stärker zytotoxisch als liposomal

verkapseltes ohne Targeting. Durch die Verpackung des Doxorubizins in Liposomen ohne Zielsteuerungsmotiv wird also dessen Toxizität vermindert. Der zytotoxische Effekt von den nicht zielgerichteten Liposomen war vermutlich auf in das Medium freigesetztes Doxorubizin zurückzuführen. Daß diese Liposomen nicht von Zellen internalisiert werden, konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer Studien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte hier gezeigt werden, daß die Toxizität durch das Doxorubizin und nicht durch die liposomalen Bestandteile vermittelt wurde, denn die unbeladenen Immunliposomen zeigten keine toxische Wirkung auf die Zellen. Bei der Verwendung von Kontrollzellen (HEK) zeigte sich zwischen den mit Doxorubizin beladenen Immunliposomen und den gleichen, ebenfalls mit Doxorubizin beladenen, Liposomen ohne Zielsteuerung kein Unterschied in der Toxizität.

4.1.2.8. Untersuchungen zur Pharmakokinetik

Für diese Versuche wurden die Immunliposomen radioaktiv markiert, indem ^{3}H-Cholesteryl-oleoyl-ether in die liposomalen Formulierungen AVE 9, AVE 10 MCC-PE und AVE 10 MCC-PE scFvA5 eingebaut wurde. Die Liposomen wurden in die Schwanzvene von Nacktmäusen appliziert und die Blutproben wurden zu verschiedenen Zeiten retrobulbär entnommen.

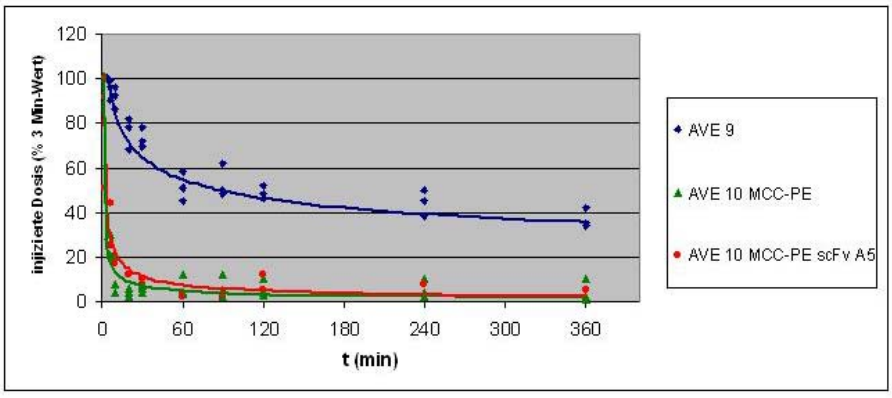


Abb. 4-30: Plasmaspiegelkurven der liposomalen Formulierungen AVE 9, AVE 10 MCC-PE und AVE 10 MCC-PE scFvA5. Je Maus wurden 1000 nmol Gesamtlipid entsprechend 10 µCi Tritium-markiertem Cholesteryl-oleoyl-ether in die Schwanzvene injiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Blutproben retrobulbär entnommen. Die Werte nach 3 min wurden auf 100% normiert. In jeder Gruppe befanden sich 3 Mäuse.

Formulierung	Halbwertszeit
AVE 9	$t_{1/2}\alpha$ = 45min, $t_{1/2}\beta$ = 9h
AVE 10 MCC-PE	< 3 min
AVE 10 MCC-PE scFvA5	< 3 min

Tab. 4-3: Berechnete Halbwertszeiten der Formulierungen AVE 9, AVE 10 MCC-PE und AVE 10 MCC-PE scFvA5 in Mäusen. Es wurden 10 mol% MCC-PE verwendet. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem Tierarzt S. Hoffmann, vectron therapeutics AG, durchgeführt.

Da die ungekoppelten Liposomen AVE 10 MCC-PE eine vergleichbar kurze Verweildauer (< 3 min) im Blut wie die Immunliposomen aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, daß für die stark verkürzte Halbwertszeit das Maleimid-haltige Kopplungslipid verantwortlich ist.

4.1.2.9. Verwendung von PEG-ylierten Liposomen

Um die Formulierung AVE 10 im Hinblick auf eine längere Blutverweildauer zu optimieren wurde das Kopplungslipid MCC-PE gegen MPB-PEG(2000)-DSPE ausgetauscht. Bei diesem Lipid ist zwischen der Maleimid-Gruppe und dem in der liposomalen Membran verankertem DSPE eine PEG-Kette eingebaut. Es wurden 5mol% dieses Kopplungslipids in die Liposomen eingebaut. Die Kopplung des scFv-Fragments A5 erfolgte an das MPB-PEG(2000)-DSPE unter denselben Bedingungen wie an die Kopplungslipide MPB- bzw. MCC-PE (siehe 6.8.4.). Für PEG-ylierte Immunliposomen wurde in der Literatur eine verlängerte Zirkulationsdauer beschrieben (Mastrobattista et al., 1999). Um zu überprüfen, ob diese Immunliposomen (AVE 10 MBP-PEG-PE scFvA5) auch an Endothelzellen binden, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

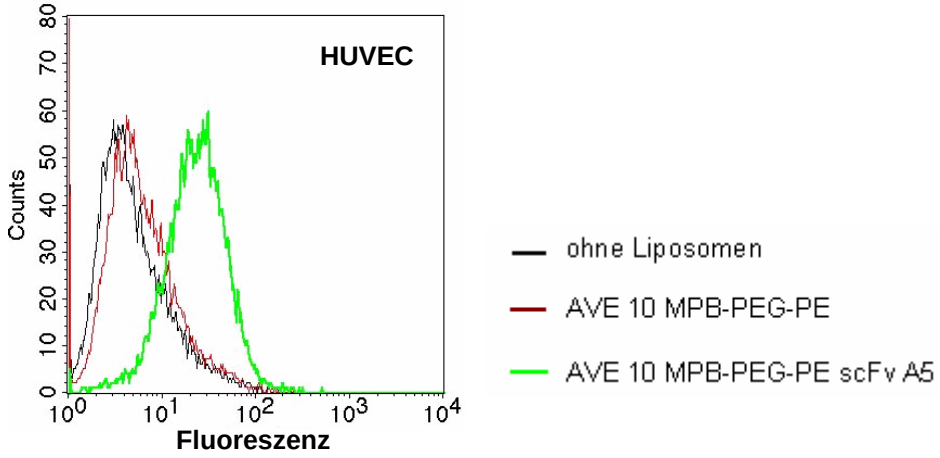


Abb. 4-31: Bindungsstudie von PEG-ylierten Liposomen: Je 200000 HUVEC wurden bei 4ºC für 1h mit je 50 nmol der Rhodamin-markierten Liposomen inkubiert und anschließend im FACS analysiert.

Mit der FACS-Studie (Abb. 4-31) konnte gezeigt werden, daß die Kopplung des scFv-Fragments A5 an das Kopplungslipid DSPE-PEG(2000)-Maleimid ebenfalls zu einer starken Bindung an Endothelzellen führte. Durch die PEG-ylierung konnte die Bindung der ungekoppelten Liposomen (AVE 10 MPB-PEG-PE) im Vergleich zu den MCC-PE Kopplungsliposomen reduziert werden. Weiter wurden die Zetapotentiale und Größen dieser Formulierungen untersucht:

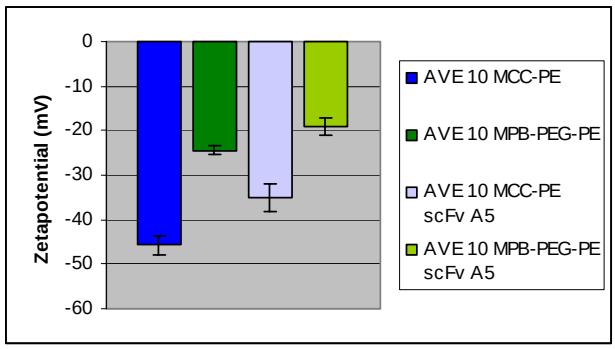


Abb. 4-32: Die Zetapotentiale der PEG-ylierten im Vergleich zu den nicht PEG-ylierten Liposomen. Die Methode zur Bestimmung des Zetapotentials ist unter 6.7.3. beschrieben.

Im Vergleich zu der Formulierung AVE 10 MCC-PE (-45,7 ± 2,1 mV) wiesen die PEG-ylierten Kopplungsliposomen ein weniger stark negatives Zetapotential von -24,4 ± 0,9 mV auf. Das Zetapotential der gekoppelten PEG-ylierten Liposomen betrug -19,2 ± 1,9 mV,

dagegen wiesen die gekoppelten nicht PEG-ylierten Liposomen einen Wert von -35,1 ± 3,2 mV auf (Abb. 4-32). Dies deutete darauf hin, daß die ebenfalls vorhandene negative Ladung der Phosphatgruppe des Kopplungslipids MPB-PEG-PE durch die PEG-Ketten abgeschirmt wurde und deshalb das Zetapotential weniger stark negativ war. Die Größen der PEG-ylierten Formulierungen betrugen: AVE 10 MPB-PEG-PE: 112,3 ± 2,1 nm; AVE 10 MPB-PEG-PE scFvA5: 122,3 ± 1,7 nm.

4.1.2.10. Diskussion

In diesem Teil der Arbeit konnten erfolgreich Immunliposomen für die vaskuläre Therapie erzeugt werden. Das Ziel dieser Immunliposomen stellen die neu gebildeten Blutgefäße, die solide Tumoren mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, dar. Diese sind für Therapeutika leicht zugänglich, da sie mit dem bestehenden Blutgefäßsystem direkt verbunden sind (Augustin, 1998). Um diese Zielsteuerung zu erreichen, wurden die Liposomen mit einem humanen und endothelzellspezifischen scFv-Fragment (Völkel et al., 2004) modifiziert. Dieser Ligand wurde kovalent an bestehende Liposomen gekoppelt. Im Vergleich zu Antikörpern als Liganden sind scFv-Fragmente auf Grund ihrer Größe nur gering immunogen und sie weisen im Vergleich zu Antikörpern keinen Fc-Teil auf, über den weitere biologische Effekte, z. B. die Aufnahme durch Zellen des retikulo-endothelialen Systems, vermittelt werden (Harding et al., 1997). Auf Grund ihrer geringen Größe sollten sie ebenfalls Vorteile gegenüber Fab'-Fragmenten aufweisen. Deshalb sollten scFv-Fragmente, besonders wenn sie humanen Ursprungs sind, die Verweildauer von Immunliposomen in der Zirkulation nicht wesentlich beeinträchtigen. Dadurch sollten die zielgerichteten Liposomen verstärkt in den Zielzellen akkumulieren und so zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt führen (Sapra et al., 2004).

In der Literatur wurden nur wenige liposomale Systeme, die für eine zielgerichtete Tumortherapie mit scFv-Fragmenten modifiziert wurden, beschrieben. Darunter befinden sich folgende Arbeiten: Nielsen et al. (2002) koppelten ein humanes scFv-Fragment, das gegen den ErbB-2 Rezeptor gerichtet ist, an mit Doxorubizin beladene Liposomen um ein therapeutisches System für das Tumorzell-Targeting zu erzeugen. Marty et al. (2002) erzeugten mittels eines gegen die ED-B Domäne von Fibronektin gerichteten scFv-Fragments ein zielgerichtetes liposomales System. Diese Zielstruktur wird von Tumorzellen selber und von den Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße überexprimiert. Diese Liposomen wurden mit einem lipophilen Derivat des Antimetaboliten Cytarabin beladen. Beide Gruppen konnten *in vivo* mit ihren Immunliposomen verglichen mit den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerung eine signifikant stärkere Inhibierung des Tumorwachstums beobachten.

4.1.2.10.1. Kopplung von scFv-Fragmenten an Liposomen

Die Kopplungsmethode, mit der Liganden an Liposomen gekoppelt werden, sollte einfach und in wenigen Reaktionsschritten durchführbar sein. Durch die Kopplungsreaktion sollten weder die Liposomen verändert noch sollte die Antigenbindungsfähigkeit des Liganden beeinträchtigt werden.

Zu den am häufigsten in der Literatur beschriebenen Methoden zählen die Kopplung über eine Carbonsäureamid- und die über eine Thioether-Bindung (Nobs et al., 2004; Hansen et al., 1995; Bendas, 2000). Mit diesen Methoden wurde auch in der vorliegenden Arbeit versucht, scFv-Fragmente an Liposomen zu koppeln. Da aber größtenteils liposomale Formulierungen benutzt wurden, die sich von denen in der Literatur beschriebenen unterscheiden, muß auch deren Einfluß auf das Ergebnis der Kopplungsreaktion berücksichtigt werden.

Erste Experimente befaßten sich mit dem Versuch scFv-Fragmente über eine Carbonsäureamidbindung an die Liposomen zu koppeln. Da die Kopplung hier über eine Aminfunktion des Liganden erfolgt, mußten die scFv-Fragmente nicht modifiziert werden. Es wurde N-Glut-PE als Kopplungslipid in die Liposomenmembran integriert und mit Ethyl-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid (EDC) aktiviert. Die Darstellung von N-Glut-PE und erfolgreiche Kopplung von α-Chymotrypsin an diesen in Liposomen inkorporierten Anker wurde zuerst von Weissig et al. (1986) beschrieben. Bei der Aktivierungsreaktion des N-Glut-PE´s inkubierten wir 200 µl Liposomen (= 2 µmol Lipid, darin sind 0,2 µmol N-Glut-PE enthalten) mit 9,1 µmol EDC. Ezpeleta et al. (1996) fanden, daß bei diesem Verhältnis eine Sättigung der Aktivierung der N-Glutaryl-Gruppe stattgefunden hat. Mit dieser Methode gelang es allerdings nicht, an alle in dieser Arbeit verwendeten liposomalen Formulierungen erfolgreich scFv-Fragmente zu koppeln. Zuerst wurde vermutet, daß die Kopplung an die Liposomen AVE 3 und AVE 8 nicht über das N-Glut-PE erfolgte, sondern daß die scFv-Fragmente nur an der Oberfläche der alleine schon durch das DOPS negativ geladenen Liposomen „klebten“. Dies bestätigte sich aber nicht: Bei der Inkubation dieser Formulierungen in Abwesenheit des N-Glut-PE´s mit scFv-Fragmenten konnte mittels Immunoblot keine Kopplung nachgewiesen werden. Schon alleine der Einbau des N-Glut-PE´s in die Formulierung AVE 3 führte zu einer verstärkten, aber unspezifischen Zellbindung. Diese konnte durch die Inkubation mit EDC noch weiter gesteigert werden.

Dagegen war es nicht möglich, scFv-Fragmente mit dieser Methode an die Formulierung AVE 10 zu koppeln. Möglicherweise wurde das N-Glut-PE in diese Liposomen so integriert, daß die endständige Carboxylgruppe nicht frei zugänglich war und deshalb für eine Kopplung

nicht zur Verfügung stand. Weiterhin von Nachteil bei dieser Methode ist, daß grundsätzlich alle primären Aminfunktionen eines Liganden die Kopplungsreaktion eingehen können. Bei den verwendeten scFv-Fragmenten kommen alleine in den nicht-randomisierten Bereichen einschließlich des N-Terminus 20 Aminogruppen vor (Völkel et al., 2004). Auf Grund ihrer dreidimensionalen Orientierung im Raum können zwar nicht alle Aminogruppen eine Kopplungsreaktion eingehen, aber es ist dennoch nicht möglich, ein reproduzierbares Kopplungsprodukt zu erhalten. Dadurch besteht bei dieser Kopplungsmethode die Gefahr, daß ein Ligand mit mehreren Liposomen koppelt und daß dies zu Quervernetzungen und Aggregatbildung führt. Dieses konnte bei der Verwendung von 50 und 100 µg scFv-Fragment/2 µmol Lipid beobachtet werden. Um dies zu umgehen, muß mit verdünnten Lösungen gearbeitet werden. Falls die Kopplung über die Antigenbindestelle oder in deren Nähe erfolgt, kann dies die Aktivität des Liganden beeinträchtigen. Torchilin et. al (1996) koppelten Antimyosin Fab'-Fragmente an N-Glut-PE und integrierten diese Konjugate in bestehende Liposomen. Durch die Kopplung verringerte sich *in vitro* die Immunreaktivität des N-Glut-PE-Fab' Konjugats verglichen mit dem freien Fab'-Fragment um den Faktor 15-20. Kritisch zu bewerten ist auch das Aktivierungsreagenz EDC: Carbodiimide können im wässrigen Milieu zu verschiedenen Produkten (Nakajima und Ikada, 1995) reagieren und stehen dann nicht mehr für die Aktivierungsreaktion zur Verfügung. Falls überschüssiges EDC noch bei der Zugabe des scFv-Fragments aktiv sein sollte, könnten einerseits auch Carboxylgruppen von scFv-Fragmenten aktiviert werden. Diese aktivierten Carboxylgruppen könnten dann mit primären Aminogruppen von anderen scFv-Fragmenten reagieren. Folglich könnte dies zu Quervernetzungen und Aggregationen von scFv-Fragmenten führen. Andererseits könnten auf diese Art aktivierte scFv-Fragmente über die Amino-Kopfgruppen von Ethanolamin-haltigen Lipiden an Liposomen gekoppelt werden. Hierdurch könnte kein gerichtetes Kopplungsprodukt erzielt werden.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich mit dieser Methode nicht an alle liposomalen Formulierungen scFv-Fragmente koppeln ließen, daß durch das N-Glut-PE eine unspezifische Zellbindung vermittelt wurde und daß die scFv-Fragmente sich nicht in einer einheitlichen Orientierung an Liposomen koppeln ließen. Aus diesen Gründen wurde die Entscheidung getroffen, diese Kopplungsmethode nicht weiter zu verfolgen.

Antikörper und deren Fragmente werden oftmals über eine Thioetherbindung an Liposomen gekoppelt. Für diese Kopplungsmethode müssen die Liganden über eine Thiolgruppe verfügen, die oftmals erst erzeugt werden muß. Es besteht die Möglichkeit, Liganden mit

heterobifunktionellen Reagenzien, wie z. B. N-hydroxysuccinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP) zu aktivieren und eine freie Thiolgruppe zu erzeugen (Nobs et al. 2004). Dabei wird das Reagenz über Aminogruppen des Liganden gebunden. Bei dieser nachträglichen Modifikation kann aber durch das Reagenz die Aktivität des Liganden beeinträchtigt werden (Uyama et al., 1994) und es ist kaum möglich, ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten, da Aktivierungsreagenzien wie das SPDP an allen vorhandenen bzw. zur Kopplung zur Verfügung stehenden Aminogruppen des scFv-Fragments angreifen können. Falls die Kopplung über den antigenbindenden Bereich oder in dessen Nähe erfolgt, können die Antigenbindungseigenschaften beeinträchtigt werden und so inaktive scFv-Fragmente entstehen. Da Fab'-Fragmente über eine Thiol-Gruppe verfügen, können sie an Maleimid-haltige Liposomen gekoppelt werden (Martin et al., 1981).

Die von uns verwendeten scFv-Fragmente wiesen allerdings keine freie Thiolgruppe auf, deshalb mußten sie zuerst derivatisiert werden. Mittels gentechnischer Methoden war es möglich, scFv-Fragmente mit einer freien Thiol Gruppe zu exprimieren. Derartige Modifikationen wurden auch schon von anderen Gruppen beschrieben. Marty et al. (2001) erzeugten auf diese Weise ein gegen die ED-B Domäne des Fibronectin gerichtetes scFv-Fragment, Nielsen et al. (2002) modifizierten ein gegen ErbB-2 gerichtetes scFv-Fragment auf dieselbe Weise. In unserer Arbeitsgruppe wurde auf DNA-Ebene die Sequenz für ein endständiges Cystein am C-Terminus eingefügt, um eine nachträgliche Modifikation zu umgehen. Da die Antigenbindungsseite diesem genau gegenüber lag, wurde dessen Aktivität nicht beeinträchtigt (Völkel et al., 2004). Vor der Kopplung mußte das scFv-Fragment noch reduziert werden, da sich durch die Oxidation der Thiol-Gruppen Dimere gebildet hatten. Hierzu wurde Tris(2-Carboxyethyl)Phosphin Hydrochlorid (TCEP) verwendet. Die Oxidation von derivatisierten scFv-Fragmenten wurde auch von anderen Gruppen beobachtet. Marty et al. (2002) reduzierten ebenfalls erfolgreich mit einem Phosphin-haltigen Reagenz (Tributylphosphin) solche scFv-Dimere.

Als Kopplungslipide wurde zuerst MPB-PE und dann MCC-PE verwendet, die beide über endständige funktionelle Maleimid-Gruppen verfügen. Das MCC-PE ist im Vergleich zum MPB-PE gegenüber Hydrolyse unempfindlicher, da es an Stelle des Benzolringes einen Cyclohexanring aufweist (Hermanson, 1996). Die Stabilität der Maleimid-Gruppe ist auch pH-Wert abhängig, nach Schmidt (1997) sollte der pH-Wert des Hydratationsmediums nicht über 6,8 liegen. Park et al. (1995) und Sugano et al. (2000) erzeugten mit dieser Methode erfolgreich Immunliposomen auch bei pH-Werten von > 7. Unsere Liposomenformulierungen

wurden standardmäßig mit PBS (pH 7,4) hydratisiert und das scFv-Fragment A5 konnte unter diesen Bedingungen erfolgreich gekoppelt werden.

Die Kopplung von scFv-Fragmenten an Maleimid-haltige Lipide wurde schon in der Literatur beschrieben: Xu et al. (2002) verwendeten MPB-PE, um ein gegen den humanen Transferrin-Rezeptor gerichtetes scFv-Fragment zu koppeln, Mamot et al. (2003) benutzten DSPE-PEG-MPB, um ein anti-EGFR scFv-Fragment zu koppeln. Nielsen et al. (2002) koppelten ein anti-ErbB-2 scFv-Fragment gerichtet an MPB-PEG-DSPE und die Immunreaktivität des Konjugats betrug auch nach der Kopplung noch über 80%.

Das derivatisierte scFv-Fragment A5 konnte in dieser Arbeit über das Cystein gerichtet an Maleimid-haltige Liposomen gekoppelt werden. Mit dieser Methode wurde eine Kopplungseffizienz von 10-20 % erreicht. Dabei betrug das molare Verhältnis von scFv-Fragment zu Lipid 1:1000, dies wurde ebenfalls von Hansen et al. (1995) als optimal beschrieben. Marty et al. (2002) erreichten in ihrer Studie, in der sie ein gegen die ED-B Domäne des Fibronektins gerichtetes scFv-Fragment an in Liposomen inkorporiertes Maleimid-PEG-PE koppelten, eine ähnliche Kopplungseffizienz. Hansen et al. (1995) koppelten in ihrer Studie Antikörper mit einer Effizienz von 72 ± 7 % an MPB-PE-haltige Liposomen. Dieser hohe Wert ist aber vermutlich auf die verwendete Methode zurückzuführen: Die Antikörper wurden mit SPDP thioliert. Da das SPDP an allen zugänglichen primären Aminogruppen angreifen kann, ist der Antikörper an mehreren Stellen derivatisiert worden. Allein hieraus ergibt sich eine höhere Kopplungseffizienz. Die geringe Koplungseffizienz des scFv-Fragments A5 in dieser Arbeit ist vermutlich auf die verwendeten Kopplungslipide MPB-PE und MCC-PE zurückzuführen. Möglicherweise befinden sich die reaktiven Maleimidgruppen zu dicht an der liposomalen Oberfläche, so daß sie für scFv-Fragmente nicht gut zugänglich sind. Auch könnte der kurze unpolare Spacer der Kopplungslipide mit den hydrophoben Teilen des Bilayers wechselwirken und so den Abstand der Maleimid-Gruppen von der Liposomenoberfläche reduzieren. Fleiner et al. (2001) koppelten IgG, das mittels 2-Iminothiolan thioliert wurde, an verschiedene in Liposomen inkorporierte Maleimid-haltige Lipide. Dabei konnten sie zeigen, daß die Kopplungseffizienz durch die Verwendung von Kopplungslipiden mit einem hydrophilen Spacer im Vergleich zum MPB-PE gesteigert werden konnte. Darüber hinaus koppelten sie BSA und IgG an dieselben Lipide und es ergaben sich deutlich unterschiedliche Kopplungseffizienzen. Dies zeigt, daß verschiedene Systeme nicht uneingeschränkt miteinander verglichen werden können.

4.1.2.10.2. Charakterisierung der Immunliposomen

Mit FACS-Studien konnte nachgewiesen werden, daß die Immunliposomen stark und spezifisch an Endoglin-exprimierende Endothelzellen binden und von diesen aufgenommen werden. Bei einer Kopplungseffizienz von 10-20% (standardmäßig wurden 1 nmol scFv-Fragment mit 1 µmol Gesamtlipid inkubiert) ergibt dies (unter der Annahme, daß 80000 Lipide ein Liposom mit einem Durchmesser von 100 nm bilden, (Kirpotin et al., 1997)) eine theoretische Anzahl von 10 - 20 scFv-Fragmenten pro Liposom. Die Anzahl der scFv-Fragmente A5 pro Liposom, die zu einer maximalen Internalisierung der Immunliposomen führt, muß noch experimentell ermittelt werden. Nielsen et al. (2002), die ein gegen den ErbB-2-Rezeptor gerichtetes scFv-Fragment an MPB-PEG-DSPE koppelten und dann in bestehende Liposomen inkorporierten, konnten zeigen, daß sie mit ca. 30 scFv-Fragmenten pro Liposom eine maximale Zellaufnahme erreichten. Eine weitere Erhöhung der Anzahl der scFv-Fragmente pro Liposom führte zu einer reduzierten Internalisierung der Immunliposomen. Diese Ergebnisse lassen sich aber nicht uneingeschränkt auf das in dieser Arbeit beschriebene System übertragen: Es ist vermutlich nicht generell möglich, absolute Mengen für scFv-Fragmente anzugeben, sondern die optimalen Mengen werden je nach Zielstruktur, je nachdem ob diese mehr oder weniger stark exprimiert wird, variieren. Für die Kopplung wurden im wesentlichen entweder AVE 10 MCC-PE oder EPC:Chol:MCC-PE Liposomen verwendet. Bei beiden gekoppelten Formulierungen konnte eine ähnlich starke Bindung an Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die Immunliposomen banden schon nach ca. 15 min sehr stark an die Zielzellen. Die Bindungseigenschaften der Immunliposomen veränderten sich auch nicht bei einer erhöhten Inkubationstemperatur von 37°C und bei der Präinkubation mit humanem Plasma war eine reduzierte Bindung erst nach sechs Stunden nachzuweisen. Dies deutete darauf hin, daß die Aktivität der Immunliposomen durch Wechselwirkungen mit Plasmabestandteilen nur wenig beeinflußt wurde bzw. daß es nur zu einer langsamen Degradation der scFv-Fragmente kam. Dies deutete darauf hin, daß die Immunliposomen für eine *in vivo*-Anwendung über eine ausreichende Stabilität verfügen. Diese Ergebnisse müssen *in vivo* noch bestätigt werden und es muß untersucht werden, ob die Immunliposomen z. B. eine Komplementaktivierung auslösen und ob sie mit zellulären Blutbestandteilen interagieren.

Allerdings war die Verweildauer der gekoppelten wie der ungekoppelten Liposomen im Blutkreislauf extrem kurz. Dafür verantwortlich waren vermutlich die Maleimid-haltigen Kopplungslipide: Diese verfügen über eine überschüssige negative Ladung an der

Phosphatgruppe. Dies zeigte sich bei der Messung des Zetapotentials der ungekoppelten Liposomen, das stark negativ war (ca. -45 mV). In der Arbeit von Nahde (2004) konnte gezeigt werden, daß Liposomen mit einem stark negativen Zetapotential sehr kurze Halbwertszeiten aufweisen. Durch die Ladung ist das Ausmaß der Opsonierung sehr stark, wodurch solche Liposomen besonders „auffällig" für Zellen des retikulo-endothelialen Systems werden. Auch die Maleimid-Gruppe selber könnte auf Grund ihrer Immunogenität (Peeters et al., 1988; Boeckler et al., 1996) für die kurze Verweildauer verantwortlich sein. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Maleimid-haltige Kopplungslipide zu einer unselektiven Zellbindung beitragen. Um diese Effekte zu minimieren wurden in dieser Arbeit die nach der Kopplungsreaktion noch vorhandenen Maleimid-Gruppen mit Cystein abgesättigt (Shahinian et al., 1995) und es konnte mittels Bindungsstudien eine reduzierte Hintergrundaktivität solcher Liposomen nachgewiesen werden.
Durch die Verwendung von PEG-ylierten Immunliposomen (Marty et al., 2002) könnte die Verweildauer verlängert werden, da das PEG einen abschirmenden Effekt auf die negativ geladene Phosphatgruppe des Kopplungslipids ausübt: In ersten Versuchen wurde das scFv-Fragment A5 an in Liposomen inkorporiertes MPB-PEG-PE gekoppelt. In FACS-Studien konnte eine starke Bindung dieser Liposomen an Endothelzellen nachgewiesen werden. Dieses wirkte sich auch auf das Zetapotential aus, das mit einem Wert von ca. -24 mV für die ungekoppelten Liposomen deutlich weniger negativ ausfiel und sich somit günstig auf eine längere Verweildauer auswirken müßte. Die Kopplung von scFv-Fragmenten mittels MPB-PE oder MCC-PE direkt an die Oberfläche der Liposomen und der zusätzliche Einbau von PEG zur Verlängerung der Halbwertszeit sollte eher nachteilig sein. Einerseits ist die Kopplungseffizienz durch die PEG-Ketten sehr schlecht und andererseits werden die gekoppelten scFv-Fragmente durch die PEG-Ketten abgeschirmt. Damit sind sie als Zielsteuerungsmotiv nicht mehr optimal zugänglich (Hansen et al., 1995).

Um mit einem solchen System einen verstärkten Anti-Tumoreffekt zu erreichen, müssen die zielgerichteten Liposomen nicht nur an die Zielzellen binden, sondern sie müssen auch aufgenommen werden, damit die Wirkstoffe erst in den Zielzellen aus den Liposomen freigesetzt werden (Sapra et al., 2004). Die Internalisierung der A5-Immunliposomen konnte durch Studien im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Danach wurde ein Zytotoxizitäts-Test mit Doxorubizin beladenen Immunliposomen durchgeführt, um nachzuweisen, daß die Internalisierung auch zu einer gesteigerten toxischen Wirkung führt.

Hierfür wurden die Liposomen mittels eines pH-Gradienten mit Doxorubizin beladen („Remote-Loading“) (Mayer et al., 1986). Die Beladungseffizienz war mit 50-60% allerdings sehr gering, dieses korrelierte aber mit den Ergebnissen von Hansen et al. (1995), die bei der Inkorporation von 1mol% MPB-PE in eine andere liposomale Formulierung nur einen Wert von 40% erreichten. Da die Beladungseffizienz der Formulierung AVE 9, die keine Maleimid-haltigen Lipide enthält, 90-95% betrug, konnte davon ausgegangen werden, daß die großen lipophilen Maleimidgruppen für die geringe Beladungseffizienz verantwortlich waren. Danach konnte das scFv-Fragment mit einer Effizienz von ca. 10-20%, die ebenfalls bei der Kopplung an unbeladene Liposomen erreicht wurde, an die liposomale Oberfläche gekoppelt werden.

Die Kristallviolett-Tests zur Bestimmung der Toxizität ergaben, daß die Zellsterblichkeit durch die Immunliposomen im Vergleich zu den ungekoppelten Liposomen bei der Verwendung von HUVEC ca. 3-fach und bei HDMEC ca. 10-fach höher war. Bei Sugano et al. (2000), die gegen β_1-Integrine gerichtete Fab'-Fragmente an PEG-ylierte Liposomen koppelten, waren diese im Vergleich zu den ungekoppelten ca. 30-fach zytotoxischer. Mamot et al. (2003) modifizierten die auf dem Markt erhältliche Formulierung Doxil® mit einem gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Fab'-Fragment und verglichen sie mit Doxil®: Die Formulierung mit dem Zielsteuerungsmotiv erwies sich hier um den Faktor 29 zytotoxischer. In dieser Arbeit waren die Unterschiede allerdings weit weniger groß. Dies könnte zum einen daran liegen, daß das Endoglin nicht in demselben Ausmaß überexprimiert wird wie z. B. das ErbB-2-Motiv oder zum anderen, daß die Internalisierung dieses Systems noch nicht optimal abläuft. Deshalb muß die Menge an scFv-Fragmenten, die zu einer maximalen Internalisierung der Immunliposomen führt, noch experimentell bestimmt werden. Möglicherweise kann auch die Kopplung der scFv-Fragmente an PEG-Ketten, wodurch diese auf der liposomalen Oberfläche zugänglicher präsentiert werden, zu einer stärkeren Zellaufnahme führen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmestudien mit Bafilomycin A1, einem Inhibitor der Acidifizierung von Endosomen wie der Endosom-Lysosom Fusion (Bayer et al., 1998), wiesen darauf hin, daß die Rhodamin-markierten Immunliposomen über Endozytose aufgenommen wurden. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden zeigte sich bei den mit Bafilomycin A1 behandelten Zellen eine deutliche vesikuläre Akkumulation der Fluoreszenz. Dies wurde auch von Straubinger et al. (1983) beschrieben. Daß die Fluoreszenz aber nicht nur ausschließlich auf die Vesikel beschränkt gewesen ist, könnte folgenden Grund haben: Es sollte berücksichtigt werden, daß man bei diesem Versuch die Fluoreszenz des

Rhodamin-PE´s verfolgt und daß selbst bei mit Bafilomycin A1 blockierten Endosomen solche Lipide mit der endosomalen Membran wechselwirken und auf diese Art ins Zytosol gelangen könnten. Der genaue endozytotische Aufnahmemechanismus kann z. B. mit spezifischen Inhibitoren für die einzelnen Wege genauer analysiert werden. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß noch andere Aufnahmemechanismen, wie z. B. Makropinozytose oder Plasma-Membran-Fusion, existieren (Huang et al., 1983; Kessner et al., 2001).

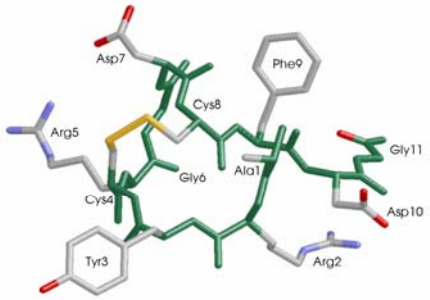
4.1.2.10.3. Ausblick

Hier wurde erfolgreich ein zielgerichtetes liposomales System mittels eines humanen scFv-Fragments für die die vaskuläre Therapie von soliden Tumoren erzeugt. Im Vergleich zu murinen scFv-Fragmenten sollte die Immunogenität reduziert sein (Carter und Merchant, 1997), allerdings gibt es bis jetzt noch keine Studien mit solchen Immunliposomen im menschlichen Organismus. Die Durchführung von *in vivo*-Versuchen gestaltet sich schwierig, da das scFv-Fragment A5 nicht an murines Endoglin bindet (Völkel et al., 2004). Um dieses Problem zu lösen, besteht zum einen die Möglichkeit, humane Haut auf immuninkompetente Mäuse zu transplantieren (Juhasz et al., 1993). Auf dieser transplantierten Haut kann man einen Tumor züchten, der dann durch murine und humane Blutgefäße versorgt wird. Ein solches Modell wurde für Untersuchungen über einen gegen humanes Endoglin gerichteten monoklonalen Antikörper von Takahashi et al. (2001) verwendet. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung von knock-in Mäusen, denen das Gen für humanes Endoglin eingepflanzt wird. Die erfolgreich verlaufenen *in vitro*-Versuche lassen eine weitere Verwendung dieses Systems für *in vivo*-Versuche sinnvoll erscheinen. Um es weiter zu optimieren sollte zum einen das scFv-Fragment an PEG-Ketten gekoppelt werden. Dabei sollten Immunliposomen auch mittels der Post-Insertions-Methode (Iden und Allen, 2001) erzeugt werden: Bei dieser Methode werden die scFv-Fragmente zuerst an einen Lipidanker, wie z. B. MPB-PEG-DSPE, gekoppelt und danach in die fertigen Liposomen integriert (Nielsen et al., 2002). Diese Methode bietet den Vorteil, daß auf der Liposomenoberfläche keine unkonjugierten und immunogenen Maleimidgruppen zurückbleiben. Zum anderen sollten das scFv-Fragment an pH-sensitive Liposomen gekoppelt werden, damit verpackte Wirkstoffe nach einer erfolgreichen endozytotischen Aufnahme die Endosomen in Richtung Zytosol und Zellkern wieder verlassen können (Ishida et al., 2001).

4.2. Darstellung von zielgerichteten Liposomen mittels eines Peptidliganden

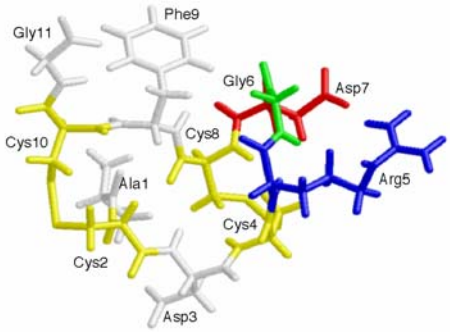
In diesem Teil der Arbeit wurden liposomale Oberflächen mit einem RGD-Peptid modifiziert, um ein zielgerichtetes System für die vaskuläre Therapie zu erzeugen. Dieses RGD-Peptid (RGD-10) wurde aus einer komplett synthetischen Phagenbibliothek durch Selektionen auf humanen Endothel (HUVEC)- und Melanomzellen (MeWo) sowie murinen Melanomzellen (B16.F10) isoliert (Bach, 2002). Diese Zellen exprimieren α_v-Integrine, die auf den Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße, die einen Tumor versorgen, überexprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß dieses RGD-Peptid verglichen mit dem in der Literatur als Standard beschriebenen RGD-4C (Koivunen et al., 1995) ebenso potent bezüglich der Affinität gegenüber Endothelzellen war, dabei weist es jedoch eine vorteilhaft einfachere Struktur auf.

RGD 10



GARYCRGDCFDG

RGD 4C



$AC_2DC_4RGDC_8FC_{10}G$

Abb. 4-33: Die Strukturen und Sequenzen der Peptide RGD-10 und RGD-4C. Beim RGD-10 ist die erste Aminosäure, das Glycin, im Strukturmodell nicht dargestellt. Vom RGD-4C ist die Konformation (die Disulfidbrücken befinden zwischen den Aminosäuren 2 und 10 sowie 4 und 8), die hoch affin an $\alpha_v\beta_3$-Integrine bindet, gezeigt.

Unser selektioniertes RGD-10 weist nur eine Disulfidbrücke auf, dadurch gestaltet sich die Synthese einfacher als beim RGD-4C. Bei diesem ist eine gerichtete 2-stufige Oxidation notwendig, da neben der hoch affinen Konformation (2:10 / 4:8) auch eine schwach affine (2:8 / 4:10) existiert (Assa- Munt et al., 2001).

4.2.1. Kopplung des RGD-Peptides über eine Carbonsäure-amidbindung

Beim RGD-10 kann die Aminogruppe am N-Terminus als reaktive Gruppe für die Kopplung an entsprechend geeignete Liposomen genutzt werden. Deshalb beschäftigten sich erste Versuche mit der kovalenten Kopplung dieses Peptids an das in Liposomen inkorporierte Lipid N-Glut-PE, da es für diese Reaktion nicht modifiziert werden mußte. Es wurde wieder wie in 4.1.1. nach dem Protokoll von Ezpeleta et al. (1996) vorgegangen: 200 µl Liposomen (in diesen 2 µmol Gesamtlipid waren 0,2 µmol N-Glut-PE enthalten) wurden mit 1,75 mg EDC (=9,1 µmol) versetzt und nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden wurden 100 nmol des RGD-10 Peptides zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 12 Stunden erfolgte die gelchromatographische Reinigung mittels Sephadex G-25. Das RGD-Peptid wurde an die mit Rhodamin markierten liposomalen Formulierungen AVE 4 N-Glut-PE und AVE 14 N-Glut-PE gekoppelt. Die Zusammensetzung der Liposomen ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Um die Kopplung zu überprüfen wurden FACS-Studien durchgeführt:

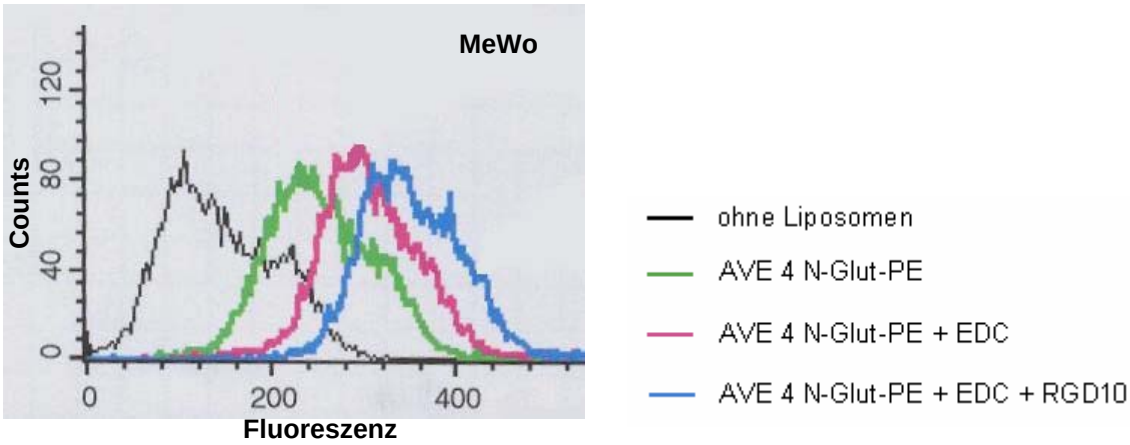


Abb. 4-34: Bindungsstudien der zielgerichteten Liposomen: Humane Melanomzellen (je 200000 Zellen) wurden für 1h bei 4ºC mit den Rhodamin-markierten Liposomen (je 50 nmol Lipid) inkubiert und danach wurde die Fluoreszenzintensität im FACS vermessen.

Die Formulierung AVE 4 zeigte bereits eine sehr starke Bindung an humane Melanomzellen (MeWo). Diese konnte bereits durch die alleinige Behandlung mit EDC gesteigert werden und verstärkte sich nochmals durch die Inkubation mit RGD-10 Peptid (Abb. 4-34). Allerdings wies schon die Formulierung AVE 3 eine starke Bindung an MeWo auf. Jedoch konnte diese weder durch die Inkubation mit EDC alleine noch durch die anschließende Zugabe von RGD-10 Peptid gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Bei den Formulierungen AVE 14, AVE 14 + EDC und AVE 14 + EDC + RGD-10 war nur eine gleich starke leichte Hintergrundaktivität zu beobachten. Die liposomale Formulierung AVE 14 N-Glut-PE zeigte dagegen eine deutlich erhöhte Bindung, die durch die Inkubation mit EDC gesteigert werden konnte. Die Kopplung von RGD-10 verursachte hier keine weitere Verstärkung der Bindung (Daten nicht gezeigt). Diese Studien wurden ebenfalls mit MeWo durchgeführt. Bei der Formulierung AVE 14 wurde das negativ geladene DOPS gegen EPC ausgetauscht, um Liposomen mit einem weniger stark negativen Zetapotential zu erhalten und eine damit verbundene unspezifische Bindung zu reduzieren: Das Zetapotential betrug bei den AVE 3 -47 ± 2,1 mV und bei den AVE 14 -22,3 ± 1,8 mV. Durch diese Potentialreduktion konnte vermutlich die Bindung der Formulierung AVE 14 an die Melanomzellen reduziert werden. Allerdings kam es durch den Einbau des N-Glut-PE´s in die Formulierung AVE 14 wieder zu einer stärkeren Bindung. Sehr negativ bei dieser Kopplungsmethode ist, daß die Bindung auch noch durch die Aktivierung der N-Glut-PE-haltigen Liposomen mittels EDC unspezifisch gesteigert wurde. In einem weiteren Versuch wurde nicht umgesetztes bzw. nicht mit Wasser abreagiertes EDC nach der Aktivierungsreaktion gelchromatographisch mittels Sephadex G-25 abgetrennt. Aber auch dies führte zu einer verstärkten Bindung der aktivierten Liposomen (Daten nicht gezeigt). Da es unwahrscheinlich ist, daß an alle aktivierten Kopplungslipide ein RGD-10 Peptid gebunden hatte, war die Bindung der zielgerichteten Liposomen vermutlich auf einen durch das RGD-Peptid vermittelten spezifischen und auf einen durch das mit EDC aktivierte Kopplungslipid vermittelten unspezifischen Anteil zurückzuführen. Aus diesen Gründen ist es mit dieser Methode nicht möglich, hochspezifisch bindende zielgerichtete Liposomen zu erzeugen. Da die Kopplung des RGD-10 auch über die beiden Arginine erfolgen kann, kann keine gerichtete Kopplung über den N-Terminus garantiert werden.

4.2.2. Einbau von RGD-10 Lipopeptiden in Liposomen

Danach wurde ein anderer Ansatz für die Erzeugung von zielgerichteten Liposomen entwickelt: Das RGD-10 Peptid wurde zuerst an verschiedene Lipidanker gekoppelt. Die Strukturen der Lipopeptide wurden von uns entwickelt, synthetisiert wurden sie von emc microcollections. Die Lipopeptide wurden bei der Herstellung der Liposomen mit den anderen liposomalen Bestandteilen zusammengegeben. Bei dieser Methode muß also weder ein Kopplungslipid in die Liposomen integriert werden noch müssen die Liposomen einer Kopplungsreaktion ausgesetzt werden. Besonders ist hier von Vorteil, daß keine unkonjugierten Kopplungslipide in der liposomalen Membran zurückbleiben über die eine unselektive und unspezifische Bindung der Liposomen an Zellen vermittelt werden könnte und die immunogen wirken könnten. Mit dieser Methode besteht die Möglichkeit ein definierteres System zu erhalten. Auch im Hinblick auf ein späteres up-scaling sollten sich hier Vorteile ergeben.

4.2.2.1. Lipopeptide der 1. Generation

Bei den Lipopeptiden der 1. Generation wurden an den C-Terminus des RGD-10 Peptids (GARYCRGDCFDG) synthetisch 2 Glycine und 2 Lysine angefügt. Die endständigen Aminogruppen in den Seitenketten der 2 Lysine wurden je mit einem Stearinsäuremolekül verknüpft. Diese dienten als Anker, um das Lipopeptid (RGD-10 2S) in der liposomalen Membran zu verankern.

GARYCRGDCFDG-GG-Lys(Stearinsäure)-Lys(Stearinsäure)-amid

Abb. 4-35: Struktur des Lipopeptids der 1. Generation

Zuerst wurde überprüft, ob das Lipopeptid (RGD-10-2S) in Liposomen eingebaut werden konnte. Hierzu wurden EPC:Chol:RGD-10-2S (6,37:3,13:0,5) Liposomen hergestellt. Zur fluoreszenzspektroskopischen Detektion wurden mit Fluorescein markierte Lipopeptide

(F-RGD-10-2S) verwendet. Die in Liposomen inkorporierte gesamte Menge des Lipopeptids bestand zu 90 % aus unmarkiertem und zu 10% aus fluoreszenzmarkiertem Lipopeptid. Das in Chloroform/Methanol gelöste Lipopeptid wurde mit EPC und Cholesterol, die in Chloroform gelöst waren, gemischt und mittels der Film-Hydratationsmethode (siehe 6.7.1. und 6.8.6.) wurden Liposomen erzeugt. Danach wurden die Liposomen gelchromatographisch mittels Sepharose 4B gereinigt. Anschließend wurden die Liposomen mit Triton X aufgelöst und die Konzentration des Fluoresceins bestimmt. Die fluorimetrische Messung ergab eine Inkorporationseffizienz von 49%. Hiermit konnte nachgewiesen werden, daß das Lipopeptid in die Liposomen integriert worden war.
Im Anschluß wurden FACS-Studien durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Liposomen auch an Zielzellen binden. Als Zellen wurden Endothelzellen (HUVEC) verwendet und als liposomale Formulierung wieder EPC:Chol. Bei der Erzeugung der Liposomen wurden entweder 1% oder 5% des Lipopeptides RGD-10-2S inkorporiert.

Trotz des nachweislichen Einbaus der Lipopeptide mittels Fluoreszenzmarkierung in die Liposomen, konnte keine Bindung der Liposomen an HUVEC nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich auf die Struktur des Lipopeptides zurückzuführen: Das Peptid-Motiv sitzt möglicherweise zu dicht auf der Liposomenoberfläche auf, da zwischen dem Lipidanker und dem RGD-10 kein zusätzlicher Spacer eingebaut ist. Das verwendete Lipopeptid wurde in weiteren Versuchen in die neutrale liposomale Formulierung DSPC:Chol eingebaut. Auch hier konnte zwar über die Fluoreszenzmarkierung ein Einbau in die Liposomen bestätigt werden, aber an HUVEC konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.2. Lipopeptide der 2. Generation

Da die Inkorporation des Lipopeptids der 1. Generation in liposomale Membranen zu keiner Zielsteuerung geführt hatte, wurde das RGD-10 Peptid danach an ein anderes Lipid gekoppelt (Abb. 4-36). Dabei wurde zwischen dem Ankerlipid 1,2-Dipalmitoyl-Glycero-3-Succinyl-Lysin und dem am N-Terminus acetylierten Peptid ein hydrophiler Spacer (entweder ein oder drei 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure-Einheiten = doo) eingefügt. Diese Lipopeptide wurden in Chloroform/Methanol (1:1) gelöst.

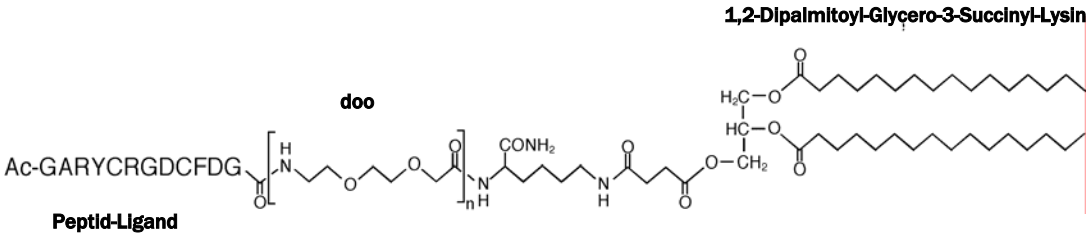


Abb. 4-36: Strukturformel des Lipopeptids der 2. Generation

Für diese Versuche wurden die beiden Lipopeptide (mit 1 (LP1) oder 3 (LP3) doo-Einheiten) in die Formulierung AVE 9 (AVE 9 LP1 und AVE 9 LP3) in verschiedenen Konzentrationen eingebaut. Bei der Herstellung wurden die Bestandteile, die alle in organischen Lösungsmitteln gelöst waren, zusammengegeben und daraus dann mittels der Film-Hydratationsmethode Liposomen erzeugt. Bei der Messung der Größen und des Zetapotentials konnte kein Einfluß des Lipopeptids festgestellt werden: Für die Formulierung AVE 9 ergab sich eine Größe von 78,3 ± 1,2 nm, die zielgerichteten Liposomen (AVE 9 LP1 (1 mol%) und AVE 9 LP3 (1 mol%)) waren 80,2 ± 1,3 nm groß; die AVE 9 wiesen ein Zetapotential von -3,6 ± 0,4 mV und mit dem inkorporierten Lipopeptid sank der Wert nur auf -8,2 ± 0,6 mV.

4.2.2.2.1. Rasterkraftmikroskopie

Hier sollte untersucht werden, ob das RGD-10 Peptid-Motiv der inkorporierten Lipopeptide auf der Liposomenoberfläche mittels der Rasterkraftmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Für diese Versuche wurden 1 mol% des Lipopeptides RGD-10 LP3 in die liposomale Formulierung AVE 9 eingebaut.

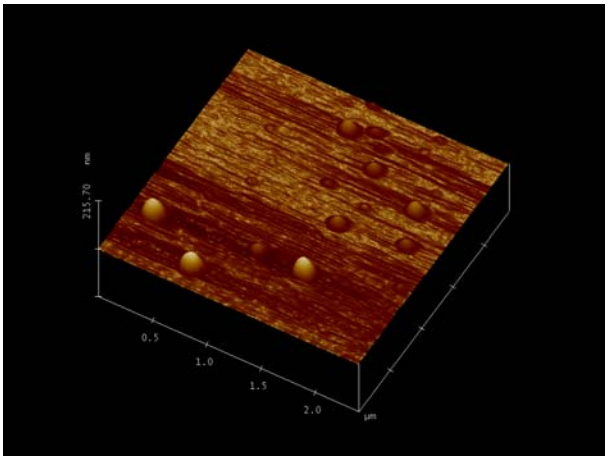


Abb. 4-37: Darstellung der AVE 9 LP3 (1 mol%) mittels Rasterkraftmikroskopie. Angaben zur Methode sind unter 6.7.4. beschrieben. Das Bild wurde von Prof. Bakowsky, Philipps-Universität Marburg, erzeugt.

Die Rasterkraftmikroskopie (Abb. 4-37) zeigte, daß die Liposomen einzeln vorlagen und nicht zu größeren Aggregaten verschmolzen sind. Allerdings war das RGD-10 Peptid nicht zu erkennen, welches vermutlich auf seine geringe Größe von ca. 2-3 nm zurückzuführen war. Es war davon auszugehen, daß die Lipopeptide in der Phospholipiddoppelschicht homogen verteilt vorlagen, da keine unterschiedlichen Bereiche auf der liposomalen Oberfläche bezüglich der Materialeigenschaften zu erkennen waren, die auf eine Clusterbildung hingedeutet hätten.

4.2.2.3. Bindungsstudien

4.2.2.3.1. Nachweis der Zielzellspezifität

Um zu überprüfen, ob die Liposomen mit den eingebauten Lipopeptiden auch an die Zielzellen binden, wurden FACS-Bindungsstudien mit Rhodamin-markierten (standardmäßig wurden 0,3 mol% Rhodamin-PE in die Liposomen eingebaut) AVE 9 durchgeführt. Als Zellen wurden HUVEC, murine Melanomzellen (B16.F10) und humane Melanaomzellen (MeWo) verwendet, von denen bekannt war, daß das RGD-10 Peptid an diese spezifisch bindet (Bach, 2002). Als Kontrolle wurden humane Vulvakarzinomzellen (A431) benutzt.

Es wurden AVE 9 mit den Lipopeptiden LP1 (Lipopeptid mit einer doo-Einheit) und LP3 (Lipopeptid mit drei doo-Einheiten) hergestellt, die in den Konzentrationen 0,1; 1 oder 5 mol% in die Liposomen eingebaut wurden.

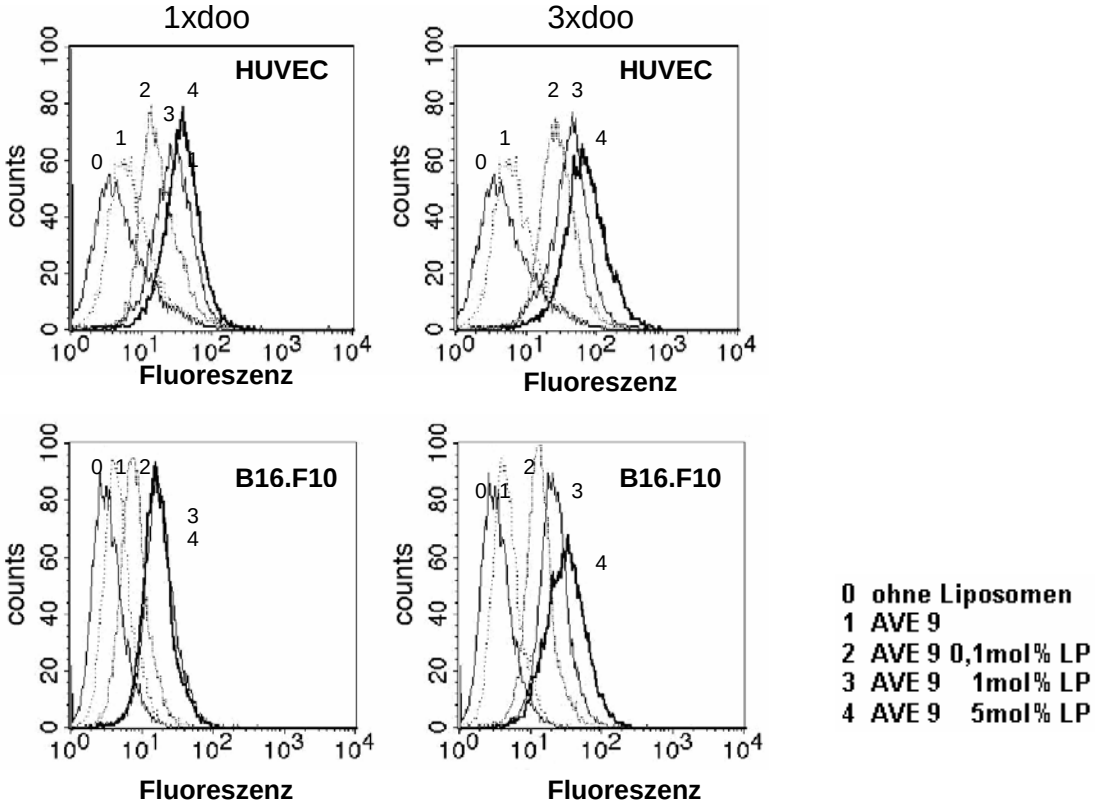


Abb. 4-38: Spezifität der zielgerichteten Liposomen: Für diesen Versuch wurden Rhodamin-markierte Liposomen verwendet. Jeweils 200000 Zellen (HUVEC oder B16.F10) wurden mit je 50 nmol Lipid bei 4ºC über 1h inkubiert und dann wurde die Fluoreszenzintensität im FACS bestimmt. 1xdoo = Lipopeptid mit einer Spacer-Einheit (LP1), 3xdoo = Lipopeptid mit drei Spacer Einheiten (LP3)

In den FACS-Studien (Abb. 4-38) konnte gezeigt werden, daß die Liposomen mit den eingebauten Lipopeptiden stark an Endothelzellen (HUVEC) gebunden haben. Die Stärke der Bindung nahm mit steigender Konzentration der LP1 und LP3 in den Liposomen zu. Dabei stieg sie zwischen den Konzentrationen 0,1 und 1 mol% ca. um den Faktor 1,5 bis 2 an. Die Bindung der Liposomen ohne Lipopeptid war dagegen äußerst schwach. Insgesamt konnte durch die Inkorporation des LP3 verglichen mit dem LP1 bei allen Konzentrationen eine stärkere Bindung der zielgerichteten Liposomen erreicht werden. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, daß durch den längeren Spacer das RGD-10 Peptid besser zugänglich ist und deshalb stärker an die Zielzellen bindet.

Diese Ergebnisse konnten auch bei der Verwendung von murinen Melanomzellen (B16.F10) bestätigt werden, nur war die Bindung der zielgerichteten Liposomen an diese Zellen insgesamt schwächer. Vermutlich werden die α_v-Integrine von verschiedenen Zell-Linien unterschiedlich stark exprimiert.

Danach wurde mittels einer Bindungsstudie untersucht, ob die zielgerichteten Liposomen auch an humane Melanomzellen (MeWo) binden.

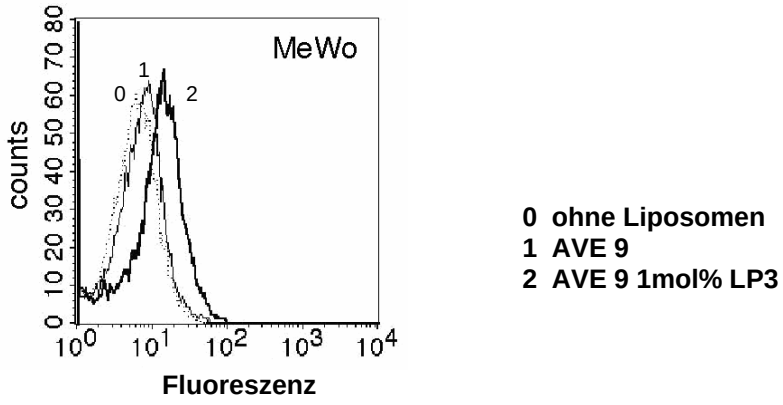


Abb. 4-39: Bindungsstudie der zielgerichteten Liposomen an humanen Melanomzellen (MeWo). Jeweils 200000 MeWo wurden mit 50 nmol Lipid (Marker: Rhodamin-PE) bei 4ºC über 1h inkubiert und dann wurde die Fluoreszenzintensität im FACS bestimmt.

Eine Bindung der Formulierung AVE 9 LP3 (1 mol%) konnte auch an die humanen Melanomzellen (MeWo) nachgewiesen werden. Allerdings fiel diese sehr schwach aus (Abb. 4-39).

Um zu überprüfen, ob die zielgerichteten Liposomen selektiv an Zielzellen binden oder ob die inkorporierten Lipopeptide „nur“ eine unselektive Zellbindung vermitteln, wurde eine Bindungsstudie mit A431 Zellen, die keine Integrine exprimieren, durchgeführt.

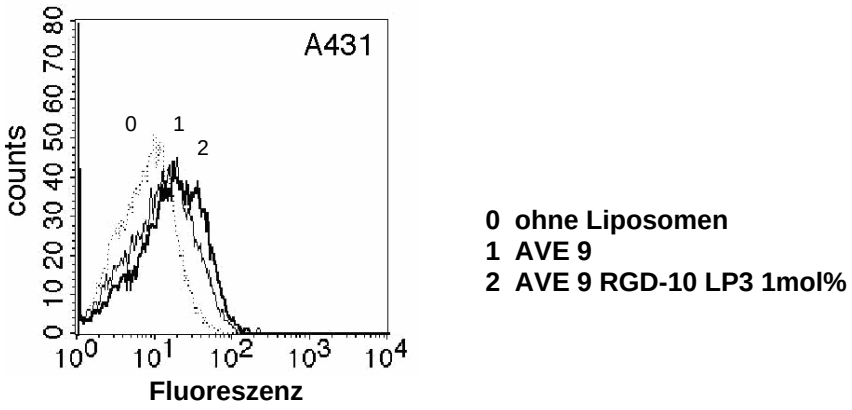


Abb. 4-40: Bindungsstudie der zielgerichteten Liposomen an A431. Es wurden jeweils 200000 A431 Zellen mit den Rhodamin-markierten Formulierungen AVE 9 und AVE 9 RGD-10 LP3 (je 50 nmol Lipid) bei 4ºC über 1h inkubiert und dann erfolgte die Analyse im FACS.

Die zielgerichteten Liposomen haben an die Kontrollzellen A431 nicht stärker als die gleichen Liposomen ohne Zielsteuerungsmotiv gebunden (Abb. 4-40). Dies zeigte, daß durch das Lipopeptid keine unselektive Zellbindung vermittelt wurde.

4.2.2.3.2. Spezifität der RGD-10 Liposomen

Um zu überprüfen, ob die Zellbindung der zielgerichteten Liposomen durch die RGD-Sequenz vermittelt wurde, wurden Liposomen mit einem RGE-10 Lipopeptid (RGE-10 LP3) erzeugt. Dieses wurde ebenfalls von emc microcollections synthetisiert. Bei diesem Lipopeptid ist das Aspartat der RGD-Sequenz gegen Glutamat ausgetauscht worden. Von dieser RGE-Sequenz ist bekannt, daß sie nicht an Integrine bindet (Cherny et al., 1993). Die Formulierungen AVE 9 RGD-10 LP3 und AVE9 RGE-10 LP3 wurden im FACS auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber HUVEC und murinen Kolonkarzinomzellen (C26), die keine Integrine exprimieren, analysiert. Die Lipopeptide wurden jeweils in einer Konzentration von 1 mol% in die Liposomen eingebaut.

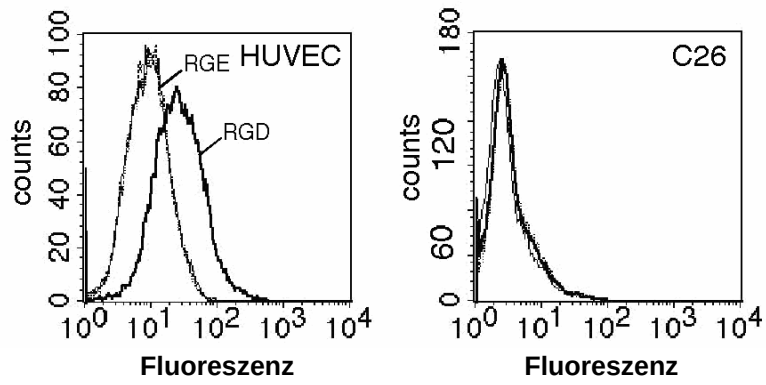


Abb. 4-41: Spezifität der zielgerichteten Liposomen: Es wurden jeweils 200000 HUVEC oder C26 mit den Rhodamin-markierten Formulierungen AVE 9 RGD-10 LP3 und AVE 9 RGE-10 LP3 (je 50 nmol Lipid) bei 4ºC über 1h inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenz im FACS vermessen. Im rechten Bild (C 26) sind alle Kurven überlagert (ohne Liposomen - AVE 9 RGD-10 LP3 - AVE 9 RGE-10 LP3)

Mit diesem Experiment (Abb. 4-41) konnte gezeigt werden, daß die Bindung an Integrin-exprimierende Zellen (HUVEC) über die RGD-Sequenz vermittelt wurde. Bei den Liposomen mit dem RGE-10 Lipopeptid als Zielsteuerungsmotiv war keine Bindung an die Endothelzellen zu erkennen, während die RGD-10 LP3 Liposomen an HUVEC gebunden haben. Beide Formulierungen zeigten keine Bindung an die murinen Kolonkarzinomzellen (C 26).

4.2.2.3.3. Kompetitionsexperimente

Um zu untersuchen, ob die Bindung der zielgerichteten Liposomen an die Zielzellen spezifisch über die RGD-Sequenz erfolgt, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Endothelzellen (HUVEC) zuerst mit den freien und nicht fluoreszenzmarkierten Peptiden RGD-10, RGD-4C, RGE oder einem Molekül, bestehend aus 5 Spacer-Einheiten (5xdoo), inkubiert. Daran schloß sich die Inkubation mit der zielgerichteten Formulierung AVE 9 RGD-10 LP3 (1 mol%) an.

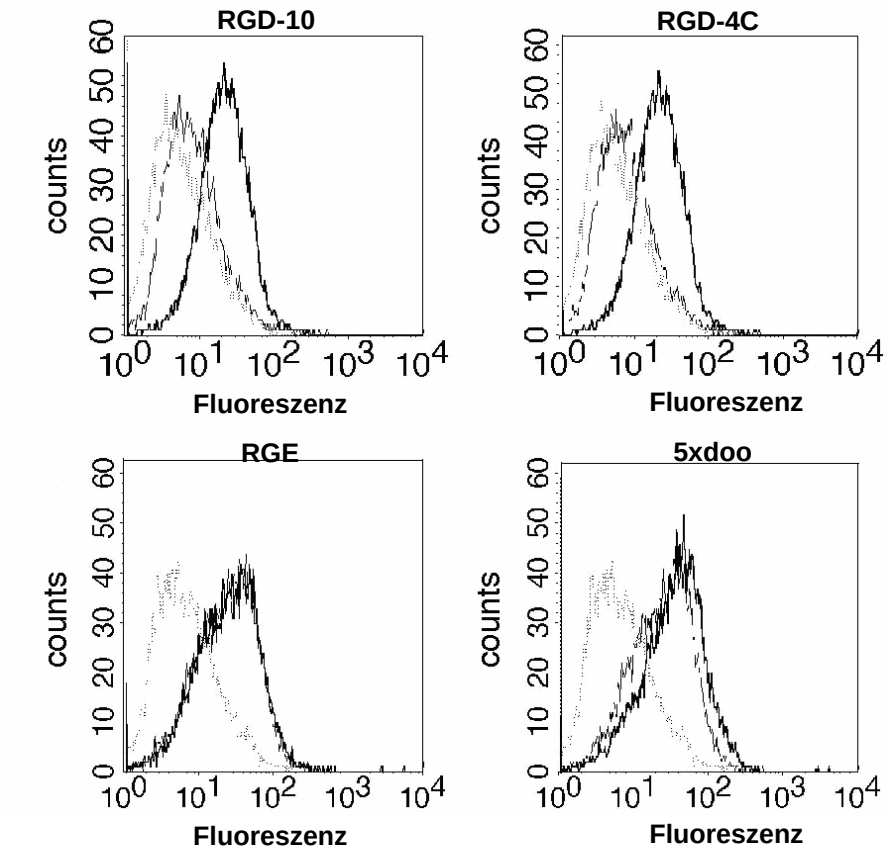


Abb. 4-42: Kompetitionsexperimente: Die HUVEC (200000 Zellen) wurden jeweils zuerst mit den freien Peptiden (RGD-10, RGD-4C und RGE, je100 µM) oder dem 5xdoo-Spacer Molekül (100 µM) bei 4ºC 30 min inkubiert. Danach schloß sich die Inkubation mit den Rhodamin-markierten Liposomen AVE 9 LP3 (1 mol%) an (50 nmol Lipid). Nach dem Waschen erfolgte die Analyse im FACS.

In Abb. 4-42 ist zu sehen, daß die freien Peptide RGD-10 und RGD-4C in der Lage waren, die Bindung der zielgerichteten Liposomen stark zu reduzieren, während das freie RGE-Peptid und das Spacer-Molekül diese Bindung nicht verringern konnten. Hieraus kann gefolgert werden, daß zum einen die Bindung der zielgerichteten Liposomen über die RGD-Sequenz vermittelt wird und daß zum anderen die Peptide RGD-10 und RGD-4C an dasselbe Epitop der Zielstruktur binden.

4.2.2.4. Bindungs- und Aufnahmestudien mittels Fluoreszenzmikroskop

4.2.2.4.1. Bindungs- und Aufnahmestudien der fluoreszenzmarkierten Liposomen

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Studien wurden die zielgerichteten Liposomen weiter untersucht. Dazu wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn 200000 Zellen pro well einer 6-well Platte auf Deckgläschen ausgesät. Zuerst wurden Endothelzellen (HUVEC) mit den Liposomen (AVE9 RGD-10 LP3 (1 mol%)) bei 4ºC und 37ºC inkubiert, um die Bindung und Aufnahme der zielgerichteten Liposomen zu verfolgen.

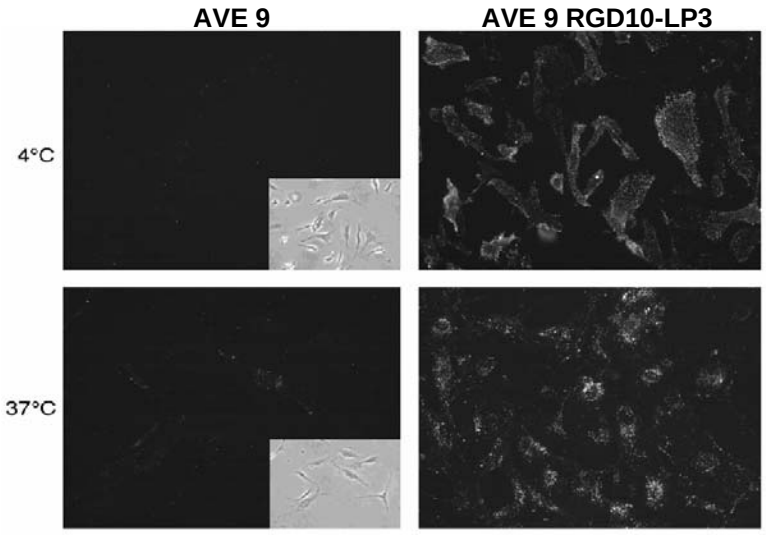


Abb. 4-43: Bindungs- und Aufnahmestudie: Je 200000 HUVEC, die auf Deckgläschen wuchsen, wurden mit Rhodamin-markierten AVE 9 und AVE 9 RGD-10 LP3 (je 50 nmol Gesamtlipid), jeweils für 1h bei 4ºC oder 37ºC inkubiert und anschließend wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Vergrößerung: 200-fach, Belichtungszeit: 1s.

Die Inkubation der AVE 9 mit den HUVEC führte bei 4ºC zu keiner Bindung, bei 37ºC war nur eine schwache Hintergrundaktivität zu beobachten. Dagegen zeigte sich bei den zielgerichteten Liposomen ein komplett anderes Bild: Bei einer Inkubationstemperatur von 4ºC war bei den HUVEC eine deutlich gefärbte Oberfläche zu erkennen. Dies ließ auf eine Bindung der zielgerichteten Liposomen an die Zelloberfläche schließen. Das Bild, das nach der Inkubation bei 37ºC erhalten wurde, korrelierte mit der Aufnahme von Liposomen: Es war eine deutliche perinukleäre Akkumulation der Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 4-43).

Um die Aufnahme genauer zu untersuchen, wurde ein Kompetitionsexperiment durchgeführt. Dabei wurden die HUVEC zuerst mit freiem und unmarkiertem RGD-10 Peptid inkubiert und danach wurden die zielgerichteten und mit Rhodamin markierten Liposomen AVE 9 RGD-10 LP3 (1 mol%) zugegeben. Falls die Aufnahme der Liposomen über das RGD-10 Peptid vermittelt wird, sollte diese in Gegenwart von freiem und überschüssigem RGD-10 Peptid unterbunden werden.

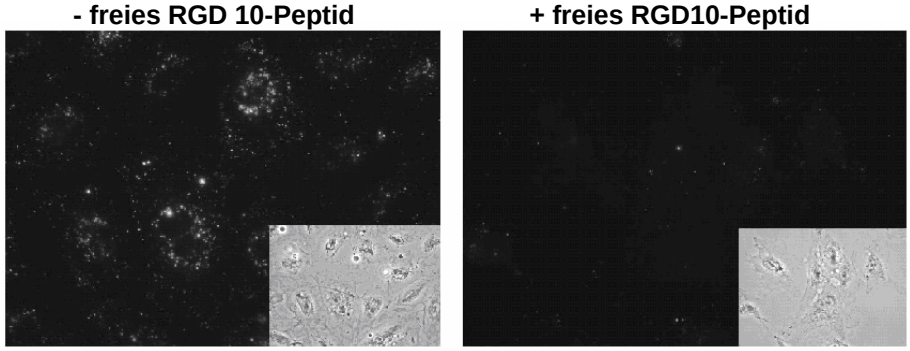


Abb. 4-44: Kompetitionsexperiment: 200000 HUVEC wurden zuerst mit freiem RGD-10 Peptid (100 µM) versetzt und danach erfolgte die Inkubation bei 37ºC für 1h mit den zielgerichteten und Rhodamin-markierten AVE 9 RGD-10 LP3 (50 nmol Gesamtlipid). Als Kontrolle wurden AVE 9 RGD-10 LP3 mit HUVEC ohne freies RGD10-Peptid inkubiert (linkes Bild). Vergrößerung: 400-fach, Belichtungszeit: 1s.

Durch die Vorinkubation mit freiem RGD-10 Peptid konnte beim Betrachten der Objekte im Fluoreszenzmikroskop weder eine Bindung noch eine Aufnahme der zielgerichteten Liposomen beobachtet werden. Es konnte also nachgewiesen werden, daß die Bindung und Aufnahme der zielgerichteten Liposomen über dieselbe Struktur vermittelt wurde, über die auch das freie RGD-10 Peptid mit den Zellen in Wechselwirkung getreten ist (Abb. 4-44).

Weiter sollte untersucht werden, ob die zielgerichteten Liposomen als Ganzes aufgenommen werden. Dazu wurden die im folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt. In die Rhodamin-markierten zielgerichteten Liposomen wurde zusätzlich der grün-fluoreszierende und wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein verpackt. Falls komplette Liposomen von den Zellen aufgenommen werden, sollten sich die beiden Farbstoffe überlagern. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop.

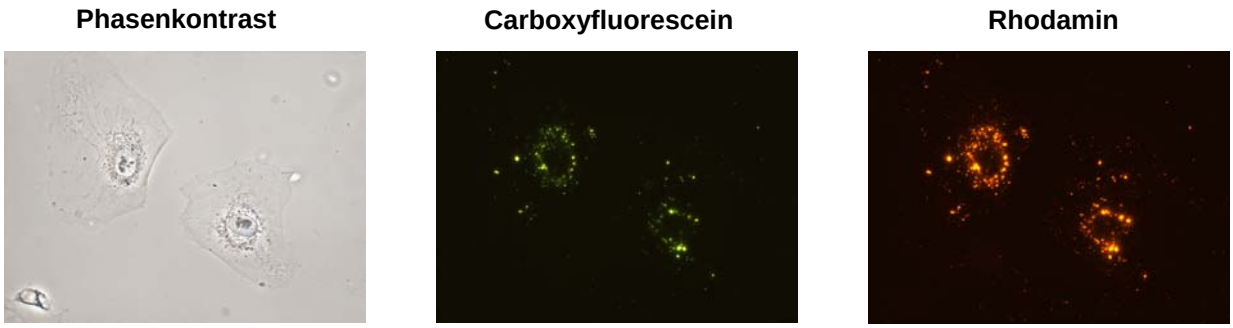


Abb. 4-45: Aufnahmestudie mit doppelt markierten Liposomen: Die Liposomen AVE 9 RGD-10 LP3 enthielten den roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin, gekoppelt an PE, in der Membran und waren gleichzeitig mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein beladen. Je 200000 HUVEC wurden bei 37ºC über 2 h mit den doppelt-markierten Liposomen (je 50 nmol Lipid) inkubiert. Vergrößerung 400-fach, Belichtungszeit: 0,5 s.

Nach einer Inkubationszeit von 2h bei 37ºC zeigte sich wieder eine perinukleäre Akkumulation der Fluoreszenz, dabei waren die Bereiche der roten und grünen Fluoreszenz weitgehend kolokalisiert. Daraus konnte geschlossen werden, daß von den Endothelzellen komplette Liposomen aufgenommen worden waren (Abb. 4-45).

4.2.2.4.2. Untersuchungen von Doxorubizin-beladenen Liposomen

Für die folgenden Versuche wurden die unmarkierten Liposomen AVE 9 und AVE 9 RGD-10 LP3 mit dem Zytostatikum Doxorubizin mittels eines pH-Gradienten beladen (AVE 9 Dox und AVE 9 RGD-10 Dox) (Mayer et al., 1986; siehe 6.7.6.1.) und der Gehalt an Doxorubizin wurde photometrisch bestimmt (siehe 6.7.8.). Anschließend wurde deren Aufnahme in HUVEC fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Größen der beladenen Liposomen bewegten sich in einem Bereich von 90-100 nm. Hier sollte herausgefunden werden, ob die Verpackung des Doxorubizins in zielgerichtete Liposomen zu einer verstärkten Akkumulation in den Zellen führt. HUVEC wurden entweder mit freiem oder liposomal verkapseltem Doxorubizin, daß in den Konzentrationen 0,1; 1 und 10 µM eingesetzt wurde, für 2h bei 37ºC inkubiert. Die Detektion im Fluoreszenzmikroskop erfolgte über das verkapselte Doxorubizin (Abb. 4-46).

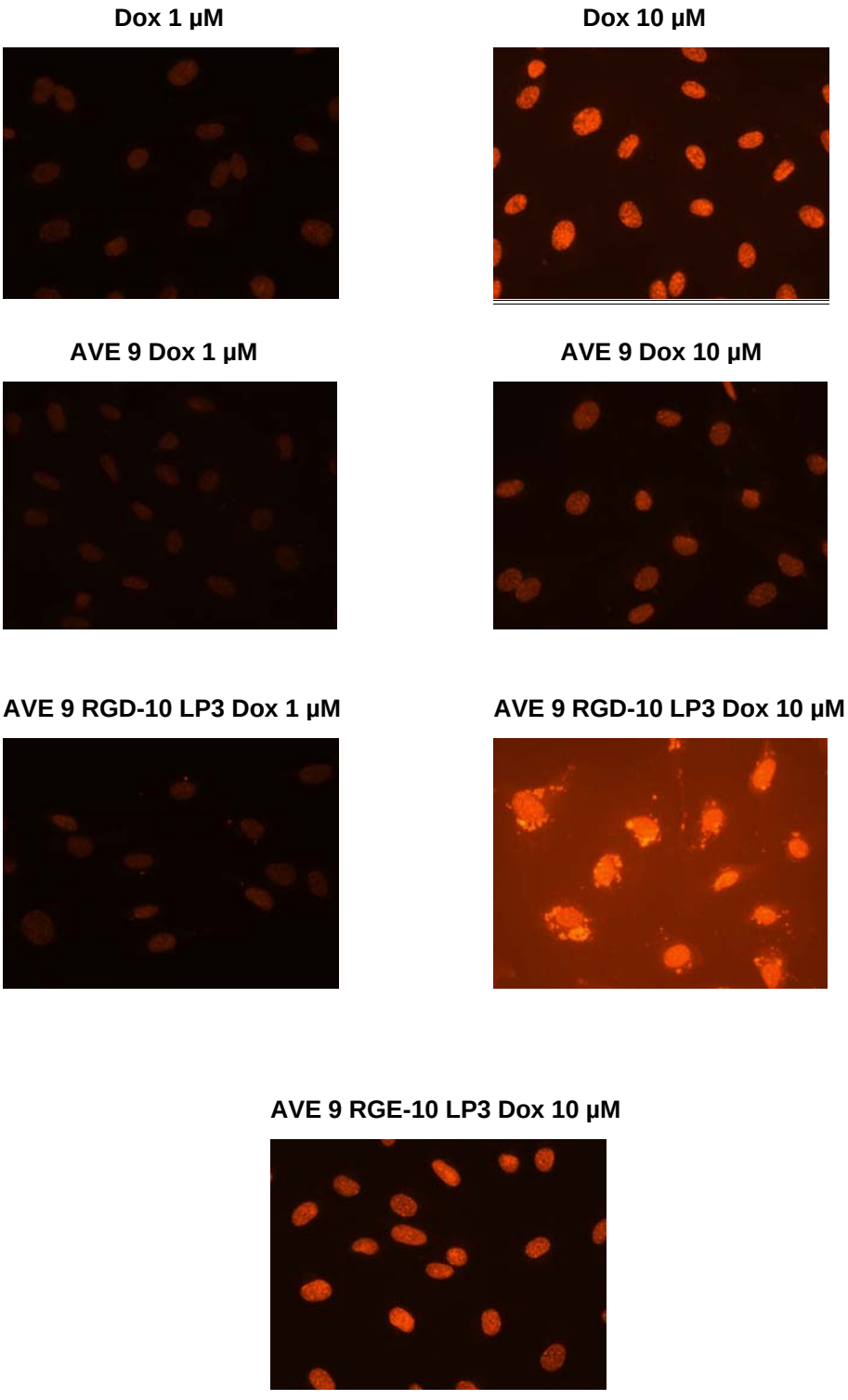


Abb. 4-46: Aufnahme von freiem und liposomal verkapseltem Doxorubizin in humane Endothelzellen (HUVEC): Je 200000 Zellen wurden mit der jeweiligen Formulierung (je 50 nmol Gesamtlipid) bei 37ºC für 2h inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf Doxorubizin, über das auch die Detektion erfolgte. Vergrößerung 200-fach, Belichtungszeit: 1 s

Bei einer Doxorubizin-Konzentration von 0,1 µM war bei allen Formulierungen keine Aufnahme in HUVEC zu sehen (Bilder nicht gezeigt). Eine schwache, aber deutlich sichtbare Aufnahme des Doxorubizins in Form einer Anfärbung des Zellkerns war bei einer Konzentration von 1 µM sowohl für das freie Doxorubizin wie auch für das liposomal verkapselte Doxorubizin nachweisbar. Bei den zielgerichteten Liposomen zeigte sich hier schon, daß das Doxorubizin nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma in vesikulären Strukturen akkumuliert war. Dieser Unterschied zum freien Doxorubizin und dem liposomal verkapseltem Doxorubizin ohne Zielsteuerung wurde bei einer Konzentration von 10 µM sehr deutlich. Hier fluoreszierten bei gleichen Aufnahmebedingungen der Bilder auch die Zellkerne wesentlich stärker und die vesikulären Akkumulationen wurden besonders deutlich. Diese vesikulären Akkumulationen waren auch bei den mit Doxorubizin beladenen Liposomen, die als Zielsteuerungsmotiv das Kontroll-Lipopeptid RGE-10 LP3 enthielten, nicht zu sehen. Diese Beobachtungen wiesen ebenfalls darauf hin, daß die Liposomen durch das Lipopeptid RGD-10 LP3 in die Zellen aufgenommen worden waren. Auch schien sich beim freien Doxorubizin verglichen mit dem AVE 9 Dox mehr Wirkstoff in den Zellkernen angereichert zu haben. Das in den Liposomen ohne Zielsteuerung verpackte Doxorubizin war vermutlich nicht in liposomaler Form von den HUVEC aufgenommen worden, sondern wurde außerhalb der Zellen aus den Liposomen freigesetzt und dann genauso wie das freie Doxorubizin in die Zellen transportiert. Diese Vermutung wurde auch durch das Resultat, das in Abb. 4-43 zu sehen ist, unterstützt: Hier konnte weder eine Bindung noch eine Aufnahme von Rhodamin-markierten AVE 9 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem mit NBD-PE markierte AVE 9 ohne Zielsteuerungsmotiv mit Doxorubizin beladen wurden. Beim NBD-PE handelt es sich um einen grünen Fluoreszenzmarker, der genauso wie das Rhodamin-PE in die liposomale Membran integriert wird. Diese wurden dann mit HUVEC inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet: Hier war nur eine rote Kernfärbung, aber keine grüne Fluoreszenz des NBD-PE´s zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies deutete ebenfalls darauf hin, daß die Liposomen ohne Zielsteuerung nicht von den HUVEC aufgenommen wurden.

Zur Kontrolle wurden murine Kolonkarzinomzellen (C26) mit freiem Doxorubizin (10 µM) und mit den mit Doxorubizin (10 µM) beladenen Formulierungen AVE 9 und AVE 9 RGD-10 LP3 inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht: Bei allen Versuchen war nur eine durch das Doxorubizin verursachte Kernfärbung sichtbar, die beim freien Doxorubizin am stärksten und bei den liposomalen Formulierungen etwa gleich stark war (Daten nicht gezeigt).

Um eine Aufnahme der zielgerichteten und beladenen Liposomen nachzuweisen, wurden AVE 9 RGD-10 LP3 Liposomen verwendet, die mit Doxorubizin beladen wurden und NBD-PE als Marker in der Membran enthielten.

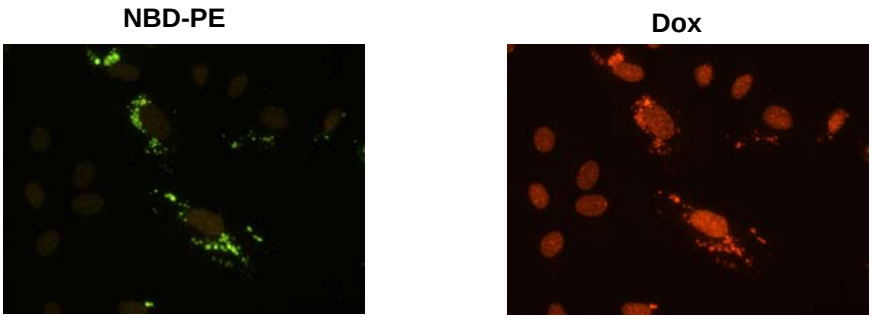


Abb. 4-47: Nachweis der Aufnahme von zielgerichteten und beladenen Liposomen: Je 200000 HUVEC wurden bei 37ºC für 2h mit NBD-PE markierten und mit Doxorubizin beladenen AVE 9 RGD-10 LP3 (1 mol%) (50 nmol Gesamtlipid) inkubiert. Danach wurde mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht, ob die rote und grüne Fluoreszenz kolokalisiert waren. Vergrößerung 200-fach, Belichtungszeit: 0,5 s.

Durch diesen Versuch (Abb. 4-47) konnte eine Aufnahme der zielgerichteten Liposomen in die Zielzellen nachgewiesen werden: Hier waren die Bereiche der roten und grünen Fluoreszenz außerhalb des Zellkerns kolokalisiert, während im Zellkern nur die rote Fluoreszenz des Doxorubizins nachweisbar war. Durch das Zielsteuerungsmotiv wurden die mit Doxorubizin beladenen Liposomen vermutlich als Ganzes aufgenommen. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, daß zusätzlich freies Doxorubizin, das außerhalb der Zellen aus den Liposomen freigesetzt wurde, von den Zellen aufgenommen wurde.

Des weiteren sollte die Kinetik der Aufnahme von zielgerichteten Liposomen in die Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurden HUVEC mit Doxorubizin (10 µM) beladenen AVE 9 RGD-10 LP3 (1 mol%) für 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h und 24h inkubiert und die Objekte im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

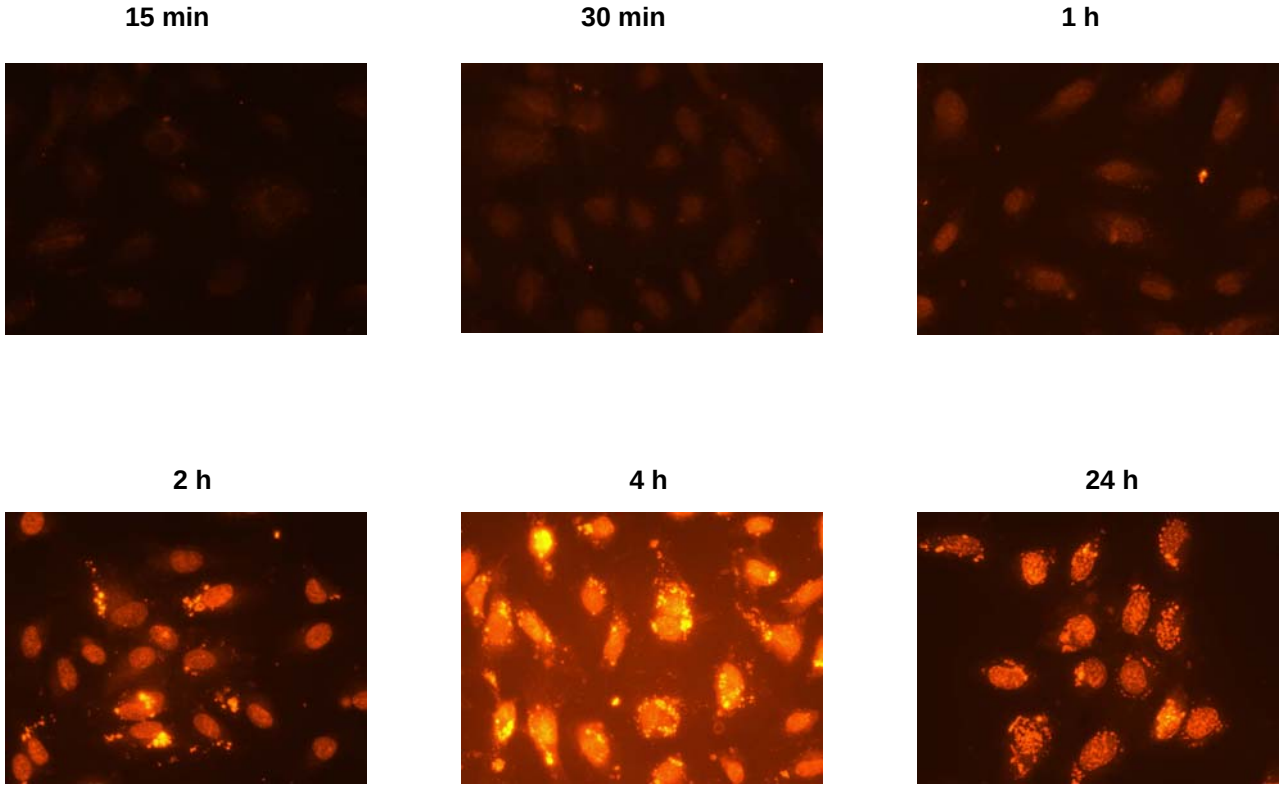


Abb. 4-48: Zeitverlauf der Aufnahme von mit Doxorubizin beladenen AVE 9 RGD-10 LP3 (1 mol%): Je 200000 HUVEC, die auf Deckgläschen wuchsen, wurden über verschiedene Zeiträume (15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h und 24h) mit den Liposomen (je 50 nmol Lipid) bei 37ºC inkubiert. Die Detektion erfolgte über das Doxorubizin im Fluoreszenzmikroskop. Vergrößerung 200-fach, Belichtungszeit: 0,5 s.

Bei dem Zeitverlaufsexperiment (Abb. 4-48) wurden folgende Beobachtungen gemacht: Nach einer 15-minütigen Inkubation war bereits eine leichte perinukleäre Färbung durch das Doxorubizin zu erkennen und nach 30 Minuten war eine schwache Kernfärbung sichtbar. Diese wurde nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde sehr deutlich und nach 2 Stunden waren zusätzlich perinukleäre vesikuläre Akkumulationen nachweisbar. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden traten diese noch deutlicher hervor. Dagegen war nach 24 Stunden ein anderes Bild zu beobachten: Die Zellkerne waren nicht mehr homogen durch das Doxorubizin gefärbt. Dies ließ auf einen beginnenden Abbau schließen.

4.2.2.5. Untersuchung zur *in vitro*-Zytotoxizität

Nachdem bewiesen war, daß die zielgerichteten und mit Doxorubizin beladenen Liposomen von den Endothelzellen aufgenommen wurden, wurde untersucht, ob dieses auch zu einer verstärkten Zytotoxizität führt. Es wurden Kristallviolett-Tests (siehe 6.10.) mit humanen Endothelzellen (HUVEC) und den Formulierungen AVE 9 (unbeladen), AVE 9 Dox und AVE 9 Dox RGD-10 LP3 durchgeführt.

Formulierung	IC_{50} (µM)
AVE 9	3,65
AVE 9 Dox	0,71
AVE 9 Dox RGD-10 LP3	0,61

Tab. 4-4: Darstellung der IC_{50}-Werte (µM) des Kristallviolett-Tests. Es wurden je 10000 Endothelzellen (HUVEC) pro well einer 96 well Platte ausgesät und mit den verschiedenen Formulierungen in einer Verdünnungsreihe, ausgehend von 10 µM Doxorubizin, versetzt und für 2 h bei 37ºC inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 48h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die verbliebenen Zellpellets mit Kristallviolett angefärbt und photometrisch bei 540 nm vermessen. Aus den ermittelten Werten konnten graphisch die IC_{50}-Werte ermittelt werden.

Mit diesem Experiment konnte keine signifikant erhöhte Zytotoxizität für die zielgerichteten Liposomen nachgewiesen werden. Dies könnte folgenden Grund haben: Vermutlich ist das Doxorubizin nach erfolgreicher Aufnahme der zielgerichteten Liposomen nicht aus den Endosomen freigesetzt worden. Für einen verbesserten therapeutischen Effekt muß aber das liposomal aufgenommene Doxorubizin die Endosomen verlassen können, um im Zellkern seine Wirkung zu entfalten.

4.2.2.6. Pharmakokinetische Studien

Um die zielgerichteten Liposomen therapeutisch nutzen zu können, müssen diese auch eine ausreichend lange Zirkulationsdauer im Blutkreislauf aufweisen (Sapra et al., 2004). Hier sollte nun der Einfluß der inkorporierten Lipopeptide auf die Verweildauer im Blutkreislauf

untersucht werden. Dazu wurden die Formulierungen AVE 9, AVE 9 RGD-10 LP1 (1 mol%), AVE 9 RGD-10 LP3 (1 mol%) und AVE 9 RGD-10 LP3 (0,1 mol%), die mit ^{3}H-Cholesteryl-oleoyl-ether markiert waren, in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Blutproben retrobulbär entnommen und die Radioaktivität gemessen. Nach 6 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Radioaktivität der einzelnen Organe bestimmt (siehe 6.11.3.).

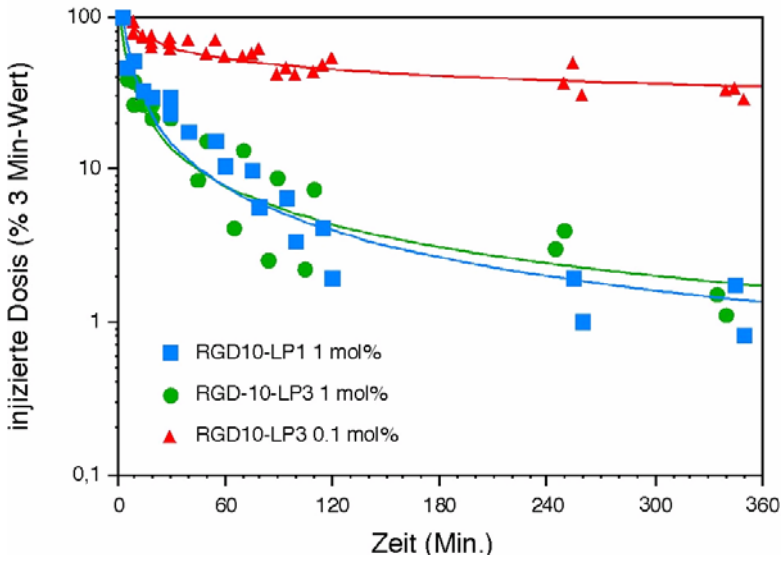


Abb. 4-49: Blutkinetik der zielgerichteten Liposomen: Es wurden verschiedene zielgerichtete liposomale Formulierungen, die mit ^{3}H-COE markiert waren, in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Die Blutproben wurden retrobulbär entnommen und anschließend die Radioaktivität vermessen. Der 3 min Wert wurde als 100% Wert genommen. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem Tierarzt S. Hoffmann, vectron therapeutics AG, durchgeführt.

Die Auswertung ergab, daß die liposomalen Formulierungen mit 1 mol% inkorporiertem Lipopeptid (AVE 9 RGD-10 LP1 und AVE 9 RGD-10 LP3) sehr schnell (50%-Wert ca. 9-10 Minuten) aus dem Blutkreislauf eliminiert wurden. Dagegen wies die Formulierung AVE 9 RGD-10 LP3 (0,1 mol%) einen 50%-Wert von 102 min auf ($t_{1/2}\alpha$ = 44 min, $t_{1/2}\beta$ = 9,2 h), dieser Wert kam dem Wert für die Liposomen ohne Zielsteuerung sehr nahe (108 min) (Daten nicht gezeigt). Wie aus Abb. 4-38 ersichtlich ist, hatte die Formulierung mit 0,1 mol% inkorporiertem Lipopeptid an die Zielzellen gebunden. Deshalb schien diese Formulierung für weitere *in vivo*-Studien geeignet zu sein. Die Messung der Radioaktivität in den Organen 6 Stunden nach der Applikation der liposomalen Formulierungen ergab folgendes: Bei den zielgerichteten Liposomen wurde mit 51-54% der injizierten Dosis ein sehr hoher Anteil in der Leber gefunden, dieser betrug für die Milz 4-11%, dagegen akkumulierten in den Nieren

und in der Lunge mit 0,1-0,4% nur sehr geringe Mengen. Diese Werte standen im Gegensatz zu den Liposomen ohne Zielsteuerung: Hier wurden nur 13% in der Leber und 3% in der Milz akkumuliert. Durch das Zielsteuerungsmotiv war es zu einer verstärkten Akkumulation in der Leber und der Milz gekommen.

4.2.2.7. Verwendung von PEG

Um die Verweildauer von Liposomen im Blut zu verlängern, besteht die Möglichkeit, die Liposomen mit PEG zu modifizieren (Allen et al., 1991; Woodle und Lasic, 1992): In die hier beschriebene Formulierung AVE 9 RGD-10 LP3 (1 mol%), die mit Rhodamin-PE markiert war, wurden 5 mol% DPPE-PEG_{2000} eingebaut. Danach wurde eine Bindungsstudie im FACS durchgeführt, bei der aber keine Bindung an HUVEC nachweisbar war. Vermutlich wurde die Bindung durch die abschirmende Wirkung der PEG-Ketten verhindert (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.8. Tumorregressionsstudie

Für weitere *in vivo*-Versuche wurde auf Grund der bisherigen Ergebnisse die liposomale Formulierung AVE 9 RGD-10 LP3 (0,1 mol%) ausgewählt. Diese wurde mittels eines pH-Gradienten mit Doxorubizin beladen (siehe 6.7.6.1). Zur Untersuchung des *in vivo*-Anti-Tumoreffekts der zielgerichteten Liposomen wurde ein C26 Mausmodell benutzt und der Einfluß von freiem Doxorubizin auf das Tumorwachstum verfolgt.

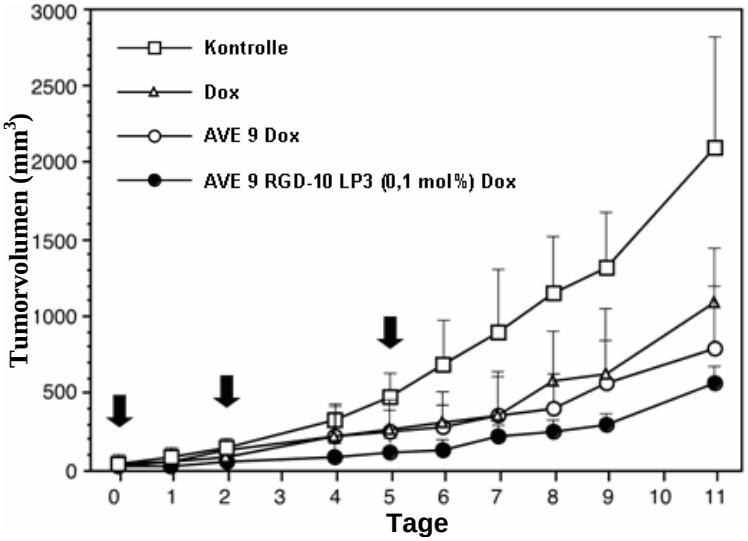


Abb. 4-50: Einfluß der zielgerichteten Liposomen auf das Tumorwachstum: Es wurden Nacktmäuse, die einen C26-Tumor trugen, mit 4 mg/kg Körpergewicht freiem oder liposomal verkapseltem Doxorubizin behandelt. Die Injektionen erfolgten an den Tagen 0, 2 und 5. In jeder Gruppe befanden sich 5 Mäuse. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem Tierarzt S. Hoffmann, vectron therapeutics AG, durchgeführt.

Dieser Versuch zeigte, daß die Tumorregression durch die Behandlung mit den zielgerichteten Liposomen AVE 9 RGD-10 LP3 Dox verglichen mit freiem Doxorubizin und den AVE 9-Dox am stärksten war. Am Tag 9 war das Tumorwachstum in der AVE 9 RGD-10 LP3 Dox Gruppe verglichen mit der AVE 9 Dox Gruppe um 52% und am Tag 11 um 31% reduziert. Allerdings waren diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant ($p = 0{,}13$ und 0,28 für die Tage 9 und 11). Aber dieser verstärkte Anti-Tumoreffekt drückte sich auch in der mittleren Überlebenszeit aus: Dieser betrug für die AVE 9 Dox 15 Tage und für die AVE 9 RGD-10 LP3 Dox 18 Tage.

4.2.2.9. Diskussion

In diesem Teil der Arbeit wurden zielgerichtete Liposomen mittels eines Peptidliganden erzeugt. Es handelte sich um ein RGD-Peptid (RGD-10), das gegen α_v-Integrin exprimierende Endothel- und Melanomzellen gerichtet ist. Das Peptid wurde mittels der Phage-Display-Technologie erzeugt (Bach, 2002) und direkt als Lipopeptid in die liposomale Membran integriert. Peptide mit der RGD-Sequenz wurden in der Literatur als Liganden für Integrin-exprimierende Zellen beschrieben (Kolonin et al., 2001). Im Rahmen der Angiogenese werden auf proliferierenden Endothelzellen die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ überexprimiert (Hynes, 2002). Somit stellen diese Integrine eine erfolgversprechende Zielstruktur für die vaskuläre Therapie dar. Verglichen mit dem RGD-4C Peptid (Koivunen et al., 1995), das als eines der potentesten Liganden für $\alpha_v\beta_3$- und $\alpha_v\beta_5$-Integrine beschrieben wurde, verfügte das RGD-10 Peptid über eine gleich starke Affinität zu Endothelzellen (HUVEC, HDMEC). Mit Kompetitionsexperimenten konnte der Nachweis erbracht werden, daß das RGD-10 Peptid an dasselbe Epitop der Zielstruktur bindet wie das RGD-4C (Bach, 2002). Für die Synthese ist es ein entscheidender Vorteil, daß das RGD-10 Peptid im Vergleich zum RGD-4C Peptid nur über zwei Cysteine verfügt, die oxidiert werden müssen. Beim RGD-4C Peptid gestaltet sich die Synthese durch die gerichtete zweifache Oxidation schwieriger und aufwendiger. Aus diesen Gründen scheint das RGD-10 Peptid für die Erzeugung eines zielgerichteten liposomalen Systems für die vaskuläre Tumortherapie sehr gut geeignet zu sein.

In der Literatur wurden mehrere liposomale Systeme für die vaskuläre Therapie, die zur Zielsteuerung mit einem Peptidliganden modifiziert waren, beschrieben. Pastorino et al. (2003) verwendeten als Zielsteuerungsmotiv ein NGR-Peptid, das gegen die Aminopeptidase N gerichtet ist. Schiffelers et al. (2003) wiederum modifizierten ihre Liposomen mit einem cyclischen RGD-Peptid. Beide Gruppen verpackten Doxorubizin in die Liposomen und zeigten mittels Tumorregressionsstudien, daß die zielgerichteten Liposomen im Vergleich zu den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerung das Tumorwachstum signifikant stärker inhibieren konnten.

4.2.2.9.1. Erzeugung eines zielgerichteten liposomalen Systems

Zuerst wurde versucht, das RGD-10 Peptid an das in Liposomen inkorporierte Lipid N-Glut-PE kovalent zu koppeln. Dabei traten allerdings wieder dieselben Probleme wie schon bei der Kopplung von scFv-Fragmenten auf: Die mit EDC aktivierten N-Glut-PE-haltigen Liposomen (AVE 4 N-Glut-PE, AVE 14 N-Glut-PE) zeigten eine deutlich verstärkte Bindung verglichen mit denselben Formulierungen ohne N-Glut-PE an humanen Melanomzellen (MeWo). Nach der Kopplung des RGD-10 Peptids an die Formulierung AVE 14 N-Glut-PE war mit dieser keine stärkere Bindung im Vergleich zu der mit EDC aktivierten Formulierung AVE 14 N-Glut-PE an Endothelzellen nachzuweisen. Das RGD-10 Peptid kann bei dieser Methode theoretisch über die Aminogruppe am N-Terminus oder über eine Guanidino-Gruppe der beiden Arginine an das N-Glut-PE gekoppelt werden. Besonders problematisch ist hier, daß das eine Arginin Bestandteil der RGD-Sequenz ist, über die die Bindung an die Integrine erfolgt. Falls die Kopplung über dieses Arginin vermittelt wird, kann dies mit einem Aktivitätsverlust des Liganden verbunden sein. Deshalb konnten hier selbst bei einer erfolgreichen Kopplung keine reproduzierbaren Ergebnisse und eine spezifische Bindung der zielgerichteten Liposomen an die Zielzellen erwartet werden. Aus diesen Gründen wurde diese Kopplungsmethode auch hier nicht weiter verfolgt.

Bei den Kopplungsmethoden von Liganden, die nachträglich an fertige Liposomen gekoppelt werden, bestehen mehrere Nachteile. In die Liposomen muß meistens ein zusätzliches Kopplungslipid integriert werden, das die Eigenschaften der Liposomen verändern kann. Oftmals tragen diese Kopplungslipide, wie z. B. das N-Glut-PE, eine negative Ladung an der Phosphatgruppe. Durch den Einbau dieser Lipide in neutrale Liposomen weisen solche Formulierungen ein negatives Zetapotential auf. Der Nachteil davon ist, daß diese Formulierungen auf Grund der Ladung oftmals zu einer verstärkten, aber unspezifischen Zellbindung und Internalisierung neigen. Dies wurde in der Arbeit von Lee et al. (1992) nachgewiesen. Es wurde gezeigt, daß durch den Einbau von negativ geladenen Phospholipden mit den Kopfgruppen Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylglycerol (PG) in die neutrale liposomale Formulierung EPC:Chol die Aufnahme in CV1 Zellen (Affen-Nierenzellen) um den Faktor 30 gesteigert werden konnte. Da für PS-haltige Liposomen eine Aufnahme über scavenger-Rezeptoren beschrieben wurde, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Polyanionen, die an scavenger-Rezeptoren binden, und den negativ geladenen Liposomen inkubiert. Da die Aufnahmerate der negativ geladenen

Liposomen aber nicht reduziert werden konnte, deutete dies auf einen unspezifischen Aufnahmemechanismus hin.
Auch wird die Verweildauer im Blut von Liposomen durch den Einbau von anionischen Phospholipiden stark reduziert: Nahde (2004) konnte in seiner Dissertation zeigen, daß die Formulierungen AVE 3 (Chol, DLPE, DOPS) und AVE 5 (Chol, DLPE, DOPG), die ein negatives Zetapotential aufweisen, im Vergleich zu der neutralen Formulierung AVE 14 (Chol, DLPE, EPC) sehr schnell aus dem Blut von Mäusen eliminiert werden: Nach 20 min waren noch 65% der Formulierung AVE 14 im Blut nachweisbar, dagegen waren es bei den AVE 5 nur 16% und bei den AVE 3 nur noch 5%. Durch die geladene Oberfläche erfolgte vermutlich eine Aktivierung des Komplementsystems (Chonn et al., 1991).

Bei der Kopplung von Liganden an bestehende Liposomen ist davon auszugehen, daß auf der liposomalen Oberfläche unkonjugierte Kopplungslipide zurückbleiben. Diese können zu einer unspezifischen Zellbindung und zu einer erhöhten Immunogenität der Liposomen beitragen (Boeckler et al., 1996). Falls zusätzlich Aktivierungsreagenzien, wie z. B. das EDC verwendet werden, können diese auch mit den anderen Lipiden Reaktionen eingehen und so die Eigenschaften der Liposomen verändern. Bei solchen Kopplungsmethoden besteht für viele Liganden der Nachteil, daß sie über mehrere gleichwertige reaktive Gruppen für die Kopplungsreaktion verfügen. Deshalb ist es oftmals notwendig, die Liganden vor der Kopplung zu modifizieren, so daß eine gerichtete Kopplungsreaktion möglich wird.

Diese Nachteile können aber umgangen werden, indem der Ligand zuerst an ein Lipid gekoppelt wird und dieses Konjugat zu den anderen Bestandteilen bei der Herstellung der Liposomen dazugegeben wird. Eine solche Methode wurde von Yagi et al. (2000) beschrieben: Sie koppelten zum einen die Peptidsequenz für das Melanozyten-stimulierende Hormon (MSH) und zum anderen die Peptidsequenz, die für die Zellbindung an Fibronectin verantwortlich ist (RGD Sequenz), jeweils an einen Lipidanker und mischten dann die Lipopeptide mit den restlichen liposomalen Bestandteilen bei der Herstellung der Liposomen. Als weiteren Vorteil beschreiben die Autoren, daß mit dieser Methode eine höhere Ligandendichte auf den Liposomen zu erreichen sei als mit den klassischen chemischen Kopplungsmethoden. Das MSH-Lipopeptid wurde mit einer Effizienz von 85-89% und das RGD-Lipopeptid mit einer Effizienz von 94-99% in Liposomen eingebaut. In der Arbeit von Pastorino et al. (2003), die ein NGR-Peptid an Maleimid-PEG-DSPE-haltige Liposomen koppelten, wurde dagegen nur eine Kopplungseffizienz von 55% erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein solcher Ansatz verfolgt: An den C-Terminus des RGD-10 Peptids (GARYCRGDCFDG) wurden synthetisch 2 Glycine und 2 Lysine angefügt. Die endständigen Aminogruppen in den Seitenketten der 2 Lysine wurden je mit einem Stearinsäuremolekül verknüpft. Diese dienten als Anker, um das Lipopeptid (RGD-10 2S) in der liposomalen Membran zu verankern. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Lipopeptiden konnte bestätigt werden, daß der Einbau in die Liposomen erfolgreich verlaufen war. Allerdings war keine Bindung der zielgerichteten Liposomen an Integrin exprimierende Endothelzellen (HUVEC) nachzuweisen. Dies lag vermutlich an der Struktur des Lipopeptids. In der Dissertation von Engel (1999) wurden zielgerichtete Liposomen, die Alkylmannosoide als Liganden enthielten, verwendet. Bei den Liganden waren zwischen den Mannose-Molekülen und einem Hexadecyl-Anker Ethylenoxid-Einheiten von verschiedener Länge als hydrophile Spacer eingefügt. Bei Aufnahmestudien mit Mannoserezeptor tragenden Peritonealmakrophagen zeigte sich, daß eine rezeptorvermittelte Aufnahme der Liposomen erst ab einer Spacerlänge von 6 Etylenoxid-Einheiten nachzuweisen war.
Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Slama und Rando (1980): Sie inkorporierten Glykolipide in Liposomen, die zwischen dem Lipidanker und β-Galactose hydrophile Spacer basierend auf Etylenglykol enthielten. Für eine optimale Agglutination mit dem Lektin Ricin wurde eine Spacerlänge von 13 oder 22 Atomen gefunden, dagegen führten kurze Spacer (4 oder 7 Atome) zu keiner Agglutination.
Da das Lipopeptid RGD-10 2S keinen Spacer enthielt, wurde vermutlich das RGD-10 Peptid nicht ausreichend exponiert auf der Liposomenoberfläche präsentiert und konnte deshalb nicht an die Integrine auf der Zelloberfläche binden.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde die Struktur der RGD-10 Lipopeptide verändert: Zwischen dem Peptid und dem lipophilen Anker 1,2-Dipalmitoyl-Glycero-3-Succinyl-Lysin wurden entweder ein (LP1) oder drei (LP3) Moleküle 8-Amino-3,6-Dioxaoctansäure (doo) als hydrophiler Spacer eingebaut. Um die optimale Spacerlänge zu finden, müßte man eine homologe Reihe von diesen RGD-10 Lipopeptiden mit Spacerlängen von z. B. 0-10 doo Einheiten herstellen und diese analysieren. Ausgehend von der Annahme, daß 90% der Lipopeptide in die Liposomen eingebaut wurden, ergibt dies für die Konzentrationen 0,1; 1 oder 5 mol% an inkorporiertem Lipopeptid eine Anzahl von ca. 70, 700 und 3600 Lipopeptide pro Liposom. Dieser Berechnung liegt die Annahme von Kirpotin et al. (1997) zu Grunde, daß 80000 Phospholipide ein Liposom von einer Größe von 100 nm bilden.

4.2.2.9.2. Charakterisierung des zielgerichteten liposomalen Systems

Die liposomale Formulierung AVE 9, die diese Lipopeptide (LP1 und LP3) in einer Konzentration von 0,1; 1 oder 5 mol% enthielt, banden an HUVEC und humane sowie murine Melanomzellen. Schiffelers et al. (2003) koppelten in ihrer Studie ca. 300 RGD-Peptide über Maleimid-PEG-DSPE an ein Liposom. Durch eine FACS-Studie konnten die Autoren eine Bindung dieser Liposomen ebenfalls an HUVEC nachweisen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit durch Kompetitionsexperimente gezeigt werden, daß die zielgerichteten Liposomen genauso spezifisch an Endothelzellen banden wie das freie RGD-10 Peptid. In fluoreszenzmikroskopischen Studien konnte durch Doppelmarkierung nachgewiesen werden, daß die zielgerichteten Liposomen im Gegensatz zu den Liposomen ohne Zielsteuerung von den Endothelzellen aufgenommen worden waren. Auch die mit Doxorubizin beladenen zielgerichteten Liposomen zeigten im Vergleich zu denselben Liposomen ohne Zielsteuerung nach der Inkubation mit Endothelzellen ein anderes Bild: Hier waren zusätzlich zu den durch das Doxorubizin rot gefärbten Zellkernen im Zytoplasma vesikuläre Akkumulationen sichtbar. Allerdings war bei den nicht zielgerichteten Liposomen, die von HUVEC nicht aufgenommen wurden, eine deutliche Kernfärbung durch Doxorubizin nachweisbar. Diese ist vermutlich auf eine Freisetzung von Doxorubizin außerhalb der Zellen aus den Liposomen und der anschließenden Aufnahme von freiem Doxorubizin zurückzuführen. Nahde (2004) konnte in seiner Dissertation zeigen, daß nach einer zweistündigen Inkubation der Formulierung AVE 9 Dox mit humanem Plasma bei 37°C das Doxorubizin zu ca. 60% freigesetzt wurde. Davon lagen ca. 80% in freier Form und ca. 20% in proteingebundener Form vor. Da in den vorliegenden Untersuchungen die HUVEC in einem Zellkulturmedium, das fötales Kälberserum enthielt, kultiviert wurden, ist es wahrscheinlich, daß Doxorubizin aus den zielgerichteten Liposomen freigesetzt wurde.

Obwohl nach den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen davon auszugehen ist, daß die zielgerichteten Liposomen internalisiert wurden und dadurch verstärkt Doxorubizin in die Zellen gelangte, konnte mittels eines Kristallviolett-Tests keine erhöhte *in vitro*-Zytotoxizität nachgewiesen werden. Die IC_{50}-Werte der nicht- sowie der zielgerichteten Liposomen lagen auf demselben Niveau. Dieses läßt vermuten, daß die zytotoxische Wirkung durch Doxorubizin vermittelt wurde, das außerhalb der Zellen aus den Liposomen freigesetzt wurde und in freier Form in die Zellen gelangte. Vermutlich ist das mittels zielgerichteter Liposomen aufgenommene Doxorubizin größtenteils in Vesikeln des endosomalen Systems verblieben und konnte so nicht seine zytotoxische Wirksamkeit in der Zelle entfalten. Diese

Vermutung wird durch die Ergebnisse von Lee (1998) unterstützt. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich der pH-Wert des Mediums außerhalb der Liposomen auf die Freisetzung von liposomalem Doxorubizin auswirkt: Bei neutralem pH, wie er normalerweise im Zytosol herrscht, war nach 2h bei 37°C kaum freies Doxorubizin nachzuweisen. Wurde der extraliposomale pH auf einen Wert von 5 gesenkt, der dem endosomalen pH-Wert entspricht, waren dagegen nach 2h bei 37°C über 90% Doxorubizin freigesetzt worden. Die vesikuläre Akkumulation der zielgerichteten Liposomen wies auf eine endozytotische Aufnahme und einen damit verbundenen intrazellulären endosomalen Weitertransport hin. Aus diesem Grund ist es möglich, daß das liposomale Doxorubizin zwar von den Liposomen im Endosom freigegeben wird, aber dann die endosomale Membran nicht überwinden kann, da hier ein pH-Gradient zwischen den sauren Endosomen und dem neutralen Zytosol besteht.

Die Lipopeptide hatten einen starken Einfluß auf die Verweildauer der zielgerichteten Liposomen im Blut. Die Inkorporation von 1 mol% LP1 oder LP3 in die AVE 9 führte zu einer raschen Elimination, der 50%-Wert betrug nur 8-9 min. Dagegen konnte mit dem Einbau von 0,1 mol% LP3 eine Verweildauer (der 50%-Wert betrug ca. 102 min) erreicht werden, die mit der für die gleichen Liposomen ohne Zielsteuerung (die Bluthalbwertszeit betrug ca. 108 min) fast identisch war. Lange Zirkulationszeiten sind notwendig, um eine erhöhte Akkumulation in den Zielzellen und dadurch einen verstärkten Anti-Tumoreffekt zu erreichen (Gabizon et al. 1994).

Die Behandlung von Mäusen mit Doxorubizin-beladenen zielgerichteten Liposomen führte im Vergleich zu den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerung bei den durchgeführten Tumor-regressionsstudien zu einem verminderten Wachstum der C26 Tumore. Allerdings ist der Unterschied nicht signifikant gewesen. Dies könnte daran gelegen haben, daß das Doxorubizin nach der Internalisierung der zielgerichteten Liposomen nur in sehr geringem Ausmaß aus den Endosomen entkommen ist. Über die hier vorliegenden Studien hinaus sollten *in vivo*-Studien mit Liposomen, die mit dem Kontroll-Lipopeptid RGE-10 LP3 modifiziert werden, durchgeführt werden, um nachzuweisen, daß der verstärkte Antitumoreffekt auch *in vivo* spezifisch über die RGD-Sequenz vermittelt wird.
Die Organverteilung zeigte folgendes Bild: Die zielgerichteten Liposomen wurden verstärkt in der Milz aufgenommen, dies wurde auch von Schiffelers et al. (2003) beobachtet und ist vermutlich auf die Expression von Integrinen auf Monozyten in der Milz zurückzuführen, die in der Arbeit von Singh et al. (2001) beschrieben wurde. Aber auch Pastorino et al. (2003)

fanden in ihrer Studie mit zielgerichteten Liposomen (als Ligand benutzen sie ein NGR-Peptid) eine deutliche Akkumulation in der Milz, die nach 12 Stunden im Gegensatz zu Liposomen ohne Zielsteuerung ca. um den Faktor 20 erhöht war. Wir fanden allerdings mit 51-54%, verglichen mit 13% für die nicht-zielgerichteten Liposomen, einen deutlich erhöhten Anteil der zielgerichteten Liposomen in der Leber. Dies wurde aber von Schiffelers et. al (2003) und Pastorino et al. (2003) nicht beobachtet. Möglicherweise liegt dieser Unterschied in der Verwendung von PEG-ylierten Liposomen dieser Gruppen.
Nach dem Ergebnis des Zytotoxizitätstests ist zu vermuten, daß auch außerhalb der Zellen Doxorubizin aus den Liposomen freigesetzt wurde und dieses in freier Form aufgenommen wurde. Daraus läßt sich schließen, daß die beobachtete Tumorregression durch die zielgerichteten Liposomen eine Folge von der zytotoxischen Wirkung auf die Endothelzellen und auf die Tumorzellen gewesen ist.

Möglicherweise stellt Doxorubizin keine optimale Substanz für eine liposomale Tumortherapie dar: Da es seine Wirkung unabhängig vom Zellzyklus entfaltet, ist für die Wirkung des Doxorubizins die Dosis und nicht die Dauer der Applikation von entscheidender Bedeutung (Karow und Lang, 1998). Durch die liposomale Applikation von Zytostatika werden die Zellen diesen aber über einen längeren Zeitraum bei einer verminderten Toxizität ausgesetzt. Deshalb könnte ein signifikant verstärkter Anti-Tumoreffekt mit einem liposomal verpackten Zytostatikum, das zellzyklusspezifisch wirkt, erzielt werden. Bei solchen Zytostatika ist für die Wirkung die Dauer der Applikation wichtiger als die Dosis. Sapra et al. (2004) verpackten die Zytostatika Doxorubizin und Vincristin in zielgerichtete Liposomen und modifizierten beide Formulierungen mit demselben Zielsteuerungsmotiv. Bei Vincristin handelt es sich um einen Mitosehemmstoff, der zellzyklusunabhängig seine Wirkung entfaltet. Die mit Vincristin beladenen Liposomen zeigten im Vergleich zu den mit Doxorubizin beladenen in dieser Studie im Bezug auf die Überlebenszeit von Mäusen einen verstärkten Anti-Tumoreffekt.

4.2.2.9.3. Ausblick

Das hier erzeugte zielgerichtete liposomale System sollte für die vaskuläre Therapie weiterentwickelt werden. Durch die Inkorporation eines Lipopeptid-Liganden in die liposomale Membran kann ein definiertes und reproduzierbares System relativ leicht erzeugt werden. Dies ist auch besonders im Hinblick auf ein späteres up-scaling wichtig. Als nächstes sollten Versuche mit pH-sensitiven Liposomen durchgeführt werden, um die *in vitro* beobachtete verstärkte Akkumulation von Doxorubizin in Folge der Internalisierung in einen therapeutischen Effekt umzusetzen. Mittels pH-sensitiver Liposomen sollte es möglich sein, daß das liposomale Doxorubizin die Endosomen verlassen kann. Da bei der jetzigen Herstellungsmethode statistisch gesehen die Hälfte der Lipopeptide ins Innere der Liposomen ragen, sollte versucht werden, die Lipopeptide mittels der Post-Insertions-Technik (Iden und Allen, 2001) in bestehende Liposomen zu integrieren. Eine weitere Optimierung könnte durch die Verwendung eines längeren hydrophilen Spacers erreicht werden. Da Peptide meist nicht mit derselben Affinität an Antigene wie Antikörper binden, könnte die Kopplung von zwei verschiedenen Peptiden, die gegen dasselbe Antigen gerichtet sind, zu einem bivalenten Liganden mit einer erhöhten Bindungsaffinität führen (Kodadek et al., 2004).

4.3. Darstellung von zielgerichteten Liposomen mittels eines Proteins

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, ein humanes EGF-Protein kovalent an Liposomen zu koppeln und so ein zielgerichtetes liposomales System für die Tumortherapie zu erzeugen. Durch dieses könnten Zytostatika direkt in die Tumorzellen geliefert werden. Als Zielstruktur diente der EGF-Rezeptor (= erbB-1-Rezeptor bzw. HER1), der von vielen Tumorzellen überexprimiert wird. Natürliche Liganden sind der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF) (Salomon et al., 1995; Nicholson et al., 2001).

4.3.1. Der Epidermale Wachstumsfaktor

Der Epidermale Wachstumsfaktor ist ein Protein, das aus 53 Aminosäuren besteht und spezifisch und mit hoher Affinität an den EGF-Rezeptor bindet (Carpenter und Cohen, 1990; Lemmon et al., 1997). Die Struktur des EGF´s ist bei vielen verschiedenen Spezien hoch konserviert (Abb. 4-51), beim Menschen, Katzen, Hunden, Schweinen, Ratten uns Mäusen befinden sich die Disulfidbrücken zwischen Cys^{6} und Cys^{20}, Cys^{14} und Cys^{31} sowie Cys^{33} und Cys^{42} (Gembitsky et al., 2002).

Abb. 4-51: Die Sequenzen von EGF aus verschiedenen Spezies: Die Aminosäuren Lysin und Arginin sind dunkel unterlegt.

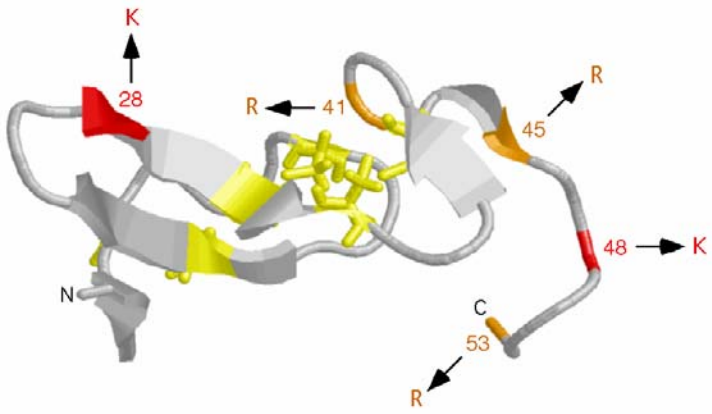


Abb. 4-52: Struktur des humanen Epidermalen Wachstumsfaktors. Die Positionen der Aminosäuren Lysin und Arginin sind gekennzeichnet.

Wie in Abb. 4-52 ersichtlich ist, verfügt das humane EGF-Protein neben der α-Aminogruppe am N-Terminus über weitere Aminogruppen an den zwei Lysinen (ε-Aminogruppen, Positionen 28 und 48) und über die Guanidino-Gruppen der Arginine (Positionen 41, 45 und 53). Alle diese Gruppen können theoretisch mit reaktiven Gruppen von Kopplungslipiden reagieren. Deshalb ist kein definiertes Reaktionsprodukt zu erwarten. Falls die Kopplung über das Lysin an Position 28 erfolgen würde, besteht sogar die Gefahr, daß die Aktivität des EGF-Proteins beeinträchtigt wird, da dieses Lysin in der Bindungsstelle des EGF´s (B-loop, Aminosäuren 19-32) (Gembitsky et al., 2002) liegt.

4.3.2. Der modifizierte Epidermale Wachstumsfaktor

Für eine gerichtete Kopplung wurde deshalb mittels der Phage-Display-Technologie ein modifiziertes humanes EGF (EGFm1) erzeugt (Bach, 2002; Bach et al., 2003) (Abb. 4-53). Dieses wurde aus Selektionen auf A431 Zellen (humane Epidermiskarzinomzellen) isoliert, die den EGF-Rezeptor überexprimieren. Bei dem modifizierten Epidermalen Wachstumsfaktor ist das Lysin an Position 28 gegen Glutamin, das Lysin an Position 48 gegen Serin und die Arginine an Position 45 und 53 sind jeweils gegen Serin ausgetauscht. Das Arginin an Position 41 mußte beibehalten werden, da es absolut notwendig für die Aktivität des EGF´s ist. In der Arbeit von Bach (2002) konnte gezeigt werden, daß EGFm1- und Wildtyp-Phagen über identische Bindungseigenschaften verfügen.

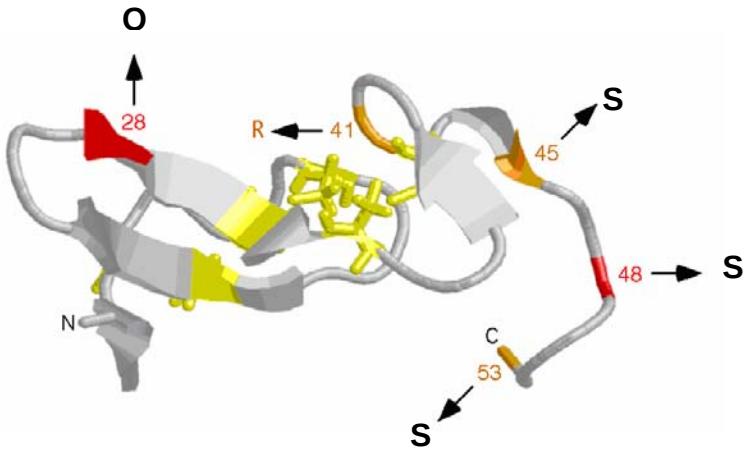


Abb. 4-53: Das modifizierte EGF-Peptid m1. Dargestellt sind die ausgetauschten Aminosäuren an den Positionen 28, 45, 48 und 53. Das Arginin an Position 41 konnte nicht ausgetauscht werden, da es für die Aktivität des EGF´s absolut notwendig ist.

4.3.2.1. Überprüfung der Kopplungsfähigkeit des EGFm1

Um zu überprüfen, ob das EGFm1-Protein reaktive Aminogruppen besitzt, wurde dieses mit einem Überschuß an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) inkubiert (Abb. 4-54). Als Kontrolle wurde der Wildtyp benutzt (EGFwt).

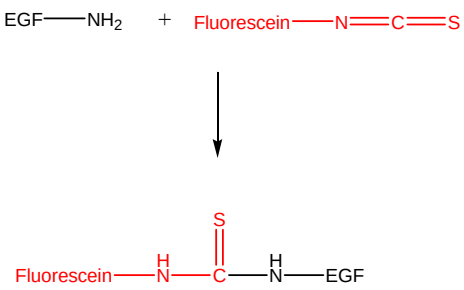


Abb. 4-54: Reaktion zwischen EGF und FITC: Die nukleophile Aminogruppe des EGF´s greift bei dieser Reaktion das elektrophile C-Atom der Isothiocyanatgruppe an. EGFm1 und EGFwt wurden in PBS Puffer gelöst (500 µg/ml) und der pH wurde mittels Carbonat-Puffer auf einen Wert von 9 eingestellt. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C wurde nicht konjugiertes FITC gelchromatographisch mittels Sephadex G-25 abgetrennt.

Nach der Abtrennung von nicht konjugiertem FITC wurden die Proteinfraktionen fluorimetrisch (Anregungswellenlänge: 495 nm, Emissionswellenlänge: 520 nm) vermessen: Die EGFwt Fraktion wies 84945 und die EGFm1 Fraktion 29720 Fluoreszenzeinheiten auf, dies entspricht einem Verhältnis von 2,9 : 1. Unter der Annahme, daß die Kopplung nicht über die Arginine vermittelt wurde, entspricht dies dem 3:1 Verhältnis der Aminogruppen im EGFwt zum EGFm1. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß das modifizierte EGFm1 auch über das verbliebene Arginin an Position 41 an das Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelt wurde, da sich unter Berücksichtigung der Arginine ein 6:2 Verhältnis der theoretisch für diese Kopplungsreaktion zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen im EGFwt zum EGFm1 ergibt.

4.3.2.2. Bindungsstudien

Um zu überprüfen, ob das modifizierte EGFm1 an Zielzellen bindet, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen (17, 50 und 170 ng/ml) des fluoreszenzmarkierten Proteins verwendet und mit humanen Epidermiskarzinomzellen (A431) inkubiert. Diese Zellen verfügen über ca. $2x10^6$ EGF-Rezeptoren, normale Epidermiszellen exprimieren dagegen nur ca. 10^4 bis 10^5 dieser Rezeptoren (Stryer, 1988).

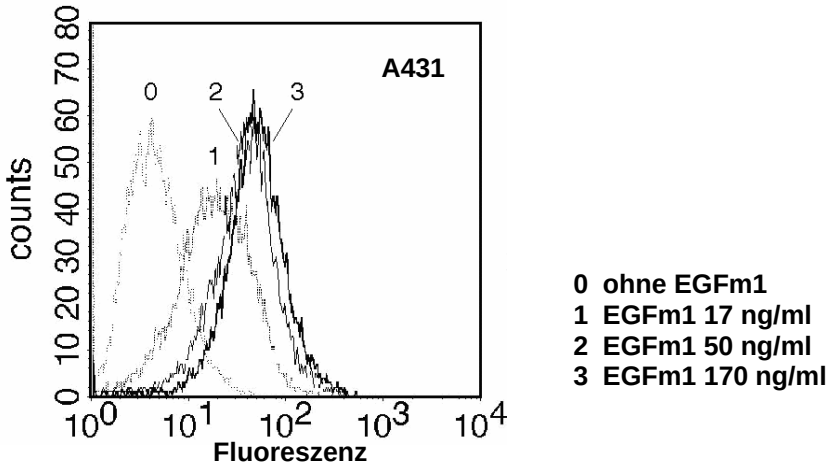


Abb. 4-55: Nachweis der Bindung von EGFm1 an A431 Zellen: Es wurden je 100000 A431 Zellen bei 4°C über 30 min mit verschiedene Mengen von FITC-markiertem EGFm1 inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Fluoreszenzintensität im FACS vermessen.

In Abb. 4-55 ist ersichtlich, daß das EGFm1 an A431 Zellen konzentrationsabhängig gebunden hat. Eine Sättigung der Bindung wurde bei einer Konzentration von ca. 50 ng/ml erreicht.

Um die Bindung genauer zu untersuchen, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt (Abb. 4-56). Dazu wurden A431 Zellen zuerst mit unmarkiertem EGFwt bzw. BSA im Überschuß vorinkubiert, danach erfolgte die Zugabe von FITC-markiertem EGFm1.

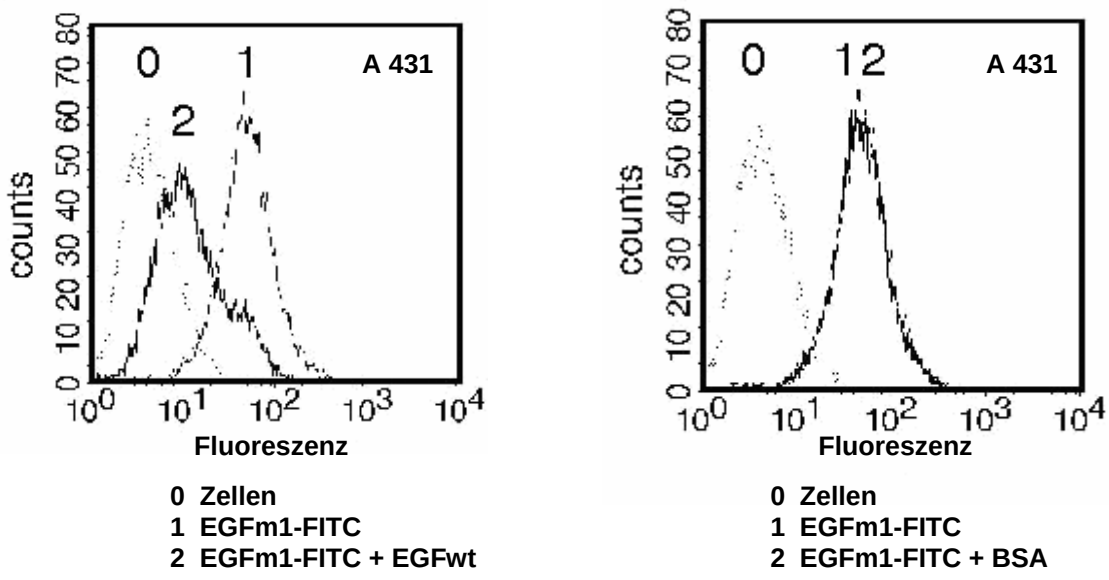


Abb. 4-56: Kompetitionsexperimente: Die A431 Zellen wurden entweder mit unmarkiertem EGFwt oder BSA im Überschuß bei 4°C über 30 min vorinkubiert und dann wurde für weitere 30 min FITC-markiertes EGFm1 (170 ng/ml) zugegeben. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte im FACS.

Durch die Vorinkubation mit EGFwt konnte die Bindung des FITC-markierten EGFm1 fast vollständig inhibiert werden, dagegen führte die Verwendung von BSA zu keiner reduzierten Bindung. Daraus war zu ersehen, daß die Bindung des modifizierten EGF´s an die A431 Zellen über dieselbe Struktur erfolgte, an die auch der EGFwt gebunden hatte. Zusätzlich konnte daraus geschlossen werden, daß die Bindung über das EGF und nicht über das Fluorescein vermittelt wurde.

4.3.2.3. Kopplung des EGFm1 an ein NHS-Ester-haltiges Kopplungslipid

Bei dieser Methode erfolgt die kovalente Kopplung des Liganden über eine Aminfunktion an ein Lipid, das über eine reaktive N-hydroxysuccinimid(NHS)estergruppe verfügt. Dabei greift die Aminfunktion des Liganden als Nukleophil an der NHS-Gruppe des Lipids an und es entsteht eine Carbonsäureamidbindung (Hermanson, 1996).

4.3.2.3.1. Kopplungsreaktion

Um das EGFm1 an Liposomen zu koppeln wurde das Kopplungslipid NHS-PEG_{2000}-DSPE standardmäßig in einer Konzentration von 10 mol% in die liposomale Formulierung AVE 9 eingebaut. Dabei erfolgt vermutlich ein nukleophiler Angriff der N-terminalen α-Aminogruppe des EGFm1 Proteins auf die Carboxylgruppe des NHS-Esters und es entsteht eine stabile Amidbindung zwischen dem Protein und dem Kopplungslipid (Abb. 4-57). Theoretisch kann die Kopplung auch über die Guanidinogruppe des Arginins an Position 41 erfolgen. Dies ist aber unter den gewählten Reaktionsbedingungen sehr unwahrscheinlich (Hermanson 1996; siehe 4.3.2.4.). Möglich ist auch ein nukleophiler Angriff durch die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin. Die gebildeten Ester sind allerdings nicht stabil in wässrigem Medium und hydrolysieren (Hermanson, 1996). Das NHS dient bei dieser Kopplungsreaktion als Abgangsgruppe.

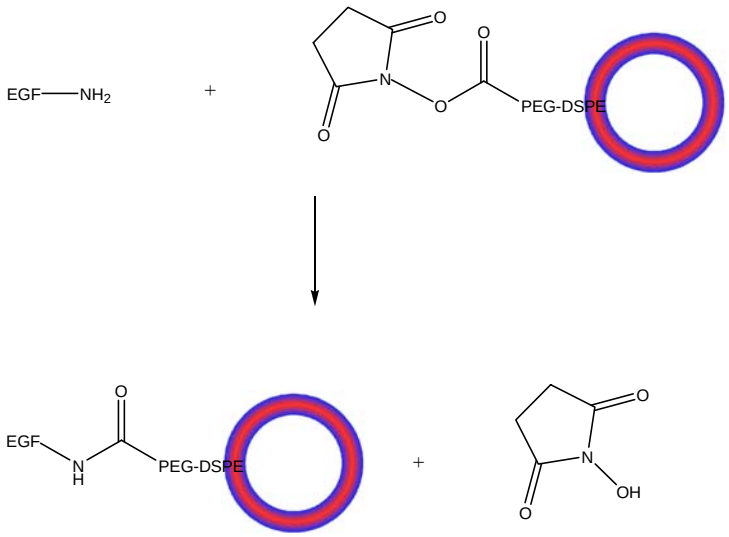
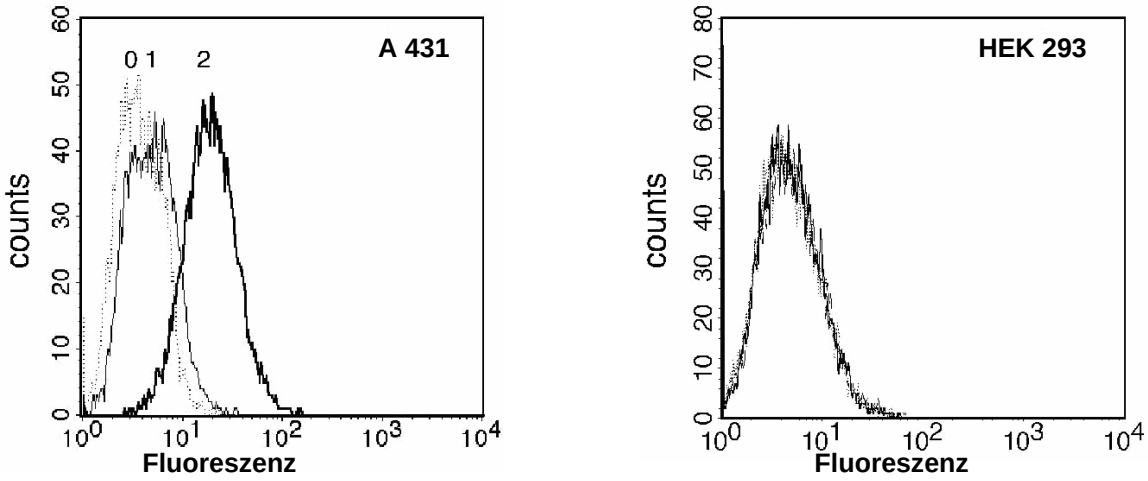


Abb. 4-57: Darstellung der Kopplungsreaktion zwischen EGF und dem Kopplungslipid NHS-PEG$_{2000}$-DSPE: Bei dieser Reaktion greift vermutlich die N-terminale α-Aminogruppe des EGFm1-Proteins als Nukleophil die Carboxylgruppe des NHS-Esters an, wobei eine stabile Amidbindung entsteht.

Die Halbwertszeit von NHS-Estern nimmt mit steigendem pH-Wert stark ab, da unter solchen Bedingungen Hydroxid-Ionen mit dem NHS-Ester reagieren: So beträgt die Halbwertszeit bei pH 7 4-5 Stunden (Lomant und Fairbanks, 1976) und bei pH 8 nur noch 1 Stunde (Staros et al., 1988). Deshalb wurde der Lipidfilm mit PBS (pH 6) hydratisiert und die Liposomen bei diesem pH-Wert auch extrudiert. Direkt vor der Zugabe des Liganden (50 µg EGFm1/µmol Gesamtlipid) wurde der pH mittels Natronlauge auf einen Wert von 8 angehoben, damit für die Kopplungsreaktion eine möglichst große Anzahl unprotonierter α-Aminogruppen zur Verfügung stand. Nach einer 16-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die zielgerichteten Liposomen von unkonjugierten Liganden gelchromatographisch (Sepharose 4B) abgetrennt. Die Formulierung AVE 9 NHS-PEG$_{2000}$-DSPE ohne Ligand (Größe: 80,2 ± 2,1 nm) wies ein Zetapotential von -19,8 ± 2,1 mV auf, mit Ligand (Größe: 85,1 ± 1,9 nm) betrug es dagegen -15,4 ± 0,8 mV.

4.3.2.3.2. Bindungsstudien

Um nachzuweisen, daß die zielgerichteten Liposomen spezifisch an Zielzellen binden und auch von diesen aufgenommen werden, wurden Bindungsstudien, Kompetitionsexperimente und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Für diese Versuche wurden 0,3 mol% Rhodamin-PE in die Liposomen eingebaut. Als EGF-Rezeptor-positive Zellen wurden wieder A431 und als Kontrollzellen HEK 293 verwendet.



0 ohne Liposomen
1 AVE 9 NHS-PEG$_{2000}$-DSPE
2 AVE 9 NHS-PEG$_{2000}$-DSPE + EGFm1

Abb. 4-58: Spezifische Bindung der zielgerichteten Liposomen: Es wurden je 100000 Zellen mit den verschiedenen Rhodamin-markierten Formulierungen (50 nmol Lipid) bei 4°C über 30 min inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Analyse im FACS.

Die Analyse im FACS (Abb. 4-58) zeigte, daß die zielgerichteten Liposomen sehr stark an die Zielzellen (A431) gebunden haben, dagegen war bei den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerungsmotiv kaum eine Bindung nachzuweisen. Beide Formulierungen zeigten keine Bindung an die Kontroll-Zell-Linie HEK 293.

Um das Bindungsverhalten der zielgerichteten Liposomen genauer zu untersuchen, wurden Kompetitionsexperimente mit freiem und unmarkiertem EGFwt sowie BSA durchgeführt. Vor der Zugabe der zielgerichteten und mit Rhodamin-PE markierten Liposomen wurden die A431 Zellen mit einem 10-fachen molaren Überschuß an EGFwt bzw. BSA vorinkubiert. Falls die EGFm1 Liposomen an dieselbe Zielstruktur wie freies EGFwt binden, sollten durch

dieses die Bindungsstellen schon abgesättigt sein und die zielgerichteten Liposomen nicht mehr an die Zellen binden können.

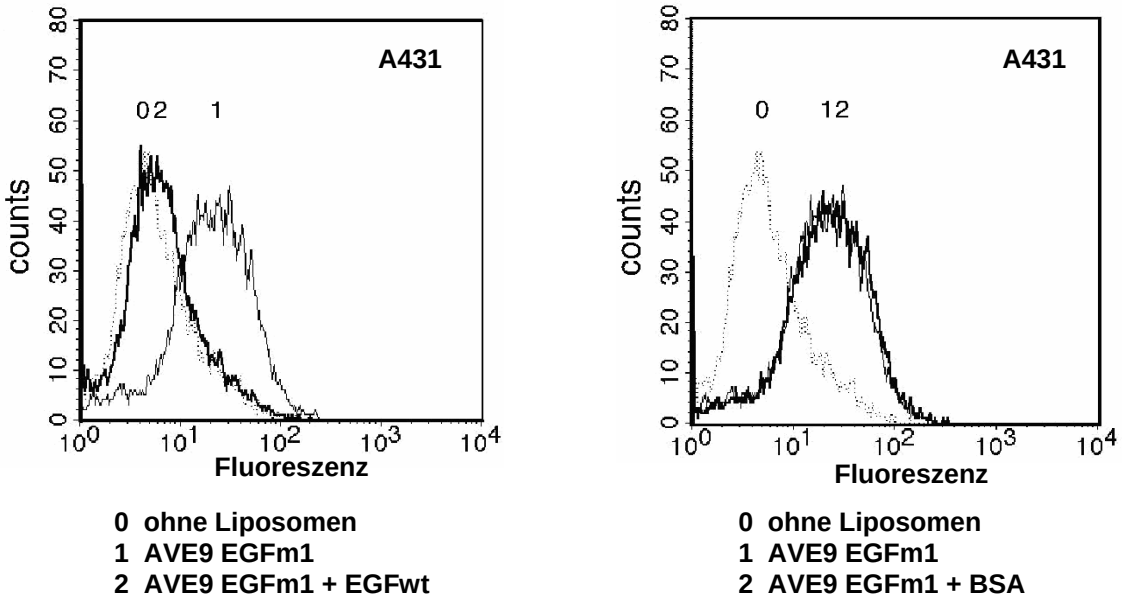


Abb. 4-59: Kompetitionsexperimente: Je 100000 A431 Zellen wurden entweder mit unmarkiertem EGFwt oder BSA im Überschuß bei 4°C über 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden für weitere 30 min je 50 nmol Rhodamin-markierte AVE 9 EGFm1 zugegeben. Nach dem Waschen erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensitäten im FACS.

Durch die Vorinkubation mit freiem EGFwt konnte die Bindung der EGFm1 Liposomen an die A431 Zellen vollständig inhibiert werden, dagegen wurde die Bindung der zielgerichteten Liposomen an die mit BSA vorinkubierten A431 Zellen nicht reduziert (Abb. 4-59). Mit diesem Experiment konnte bestätigt werden, daß die Bindung der zielgerichteten Liposomen an die A431 Zellen spezifisch über das EGFm1-Protein vermittelt wurde. Darüber hinaus war ersichtlich, daß das EGFwt-Protein und das EGFm1-Protein an dasselbe Epitop der Zielstruktur auf der Zelloberfläche binden.

4.3.2.3.3. Aufnahmestudie

Danach wurden die A431 Zellen bei 37°C mit Rhodamin-markierten EGFm1 Liposomen inkubiert und die Beobachtung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. Bei dieser Temperatur sollte untersucht werden, ob die zielgerichteten Liposomen von den Zielzellen aufgenommen werden.

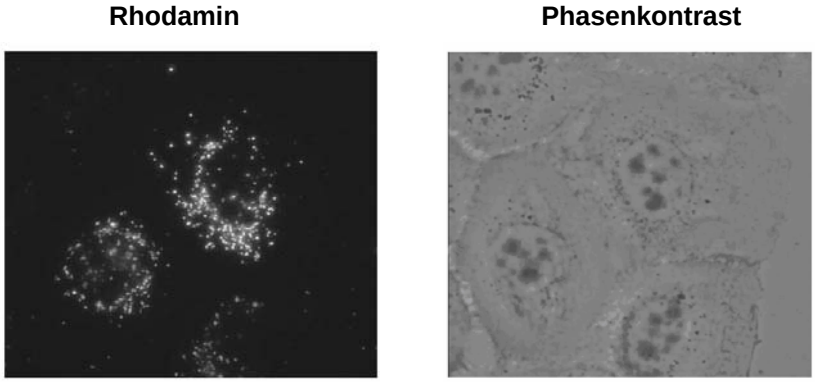


Abb. 4-60: Aufnahmestudie der zielgerichteten EGFm1 Liposomen: Je 100000 A431 Zellen wurden bei 37°C über 6 Stunden mit Rhodamin-markierten EGFm1 Liposomen (50 nmol Lipid) inkubiert. Nach dem Waschen wurde das Muster der Fluoreszenz im Mikroskop analysiert. Vergrößerung: 400-fach, Belichtungszeit 1s.

Im Fluoreszenzmikroskop war eine deutliche perinukleäre Akkumulation der Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 4-60). Dies wies darauf hin, daß die zielgerichteten Liposomen von den A431 Zellen aufgenommen wurden. Bei einer Inkubationstemperatur von 4°C war die Fluoreszenz nur an der Zelloberfläche lokalisiert, dies deutete auf eine reine Bindung der EGFm1 Liposomen hin (Daten nicht gezeigt). Keine Bindung oder Aufnahme war bei der Verwendung der Kopplungsliposomen (AVE 9 NHS-PEG_{2000}-DSPE) zu sehen (Daten nicht gezeigt). Die zielgerichteten EGFm1 Liposomen wurden auch nicht von der Kontroll-Zell-Linie HEK 293 gebunden oder aufgenommen (Daten nicht gezeigt).

4.3.2.4. Diskussion

Hier wurde mittels eines humanen EGF-Liganden ein zielgerichtetes liposomales System für die Tumortherapie entwickelt, das von den Zielzellen aufgenommen wurde. Dabei wurde ein modifiziertes humanes EGF-Peptid (EGFm1) verwendet. Dieses verfügt über dieselbe Affinität zu A431 Zellen, die den EGF-Rezeptor überexprimieren, wie der Wildtyp (EGFwt). Das EGFm1 weist im Vergleich zum EGFwt keine Lysine und nur ein Arginin auf (Bach, 2002). Ein entscheidender Vorteil des EGFm1 besteht darin, daß eine Kopplung spezifisch über die N-terminale α-Aminogruppe ermöglicht werden sollte. Dadurch sollte sich erstmalig ein zielgerichtetes therapeutisches System mit einheitlich orientierten humanen EGF-Liganden erzeugen lassen, deren Aktivität durch die Kopplungsreaktion nicht reduziert wird. Bohl-Kullberg et al. (2002) entwickelten erfolgreich mittels murinem EGF ein zielgerichtetes liposomales System für die Radiotherapie.

Durch die erfolgreiche Erzeugung von Fluorescein-EGFm1 Konjugaten konnte gezeigt werden, daß das modifizierte Protein über aktive Aminogruppen für eine Kopplungsreaktion verfügt. Allerdings konnte experimentell nicht der Beweis erbracht werden, daß die Kopplung ausschließlich über den N-Terminus verlaufen war. Theoretisch möglich ist auch eine Kopplung über die stark basische Guanidino-Gruppe des Arginins an Position 41. Diese konnte nicht ausgetauscht werden, da sie unverzichtbar für die Aktivität des EGF´s ist. Allerdings besitzt diese Gruppe einen pK_a-Wert von ca. 12 (Hermanson 1996). Nach der Gleichung von Henderson-Hasselbalch ergibt sich daraus, daß bei einem pH-Wert von 10 etwa 99% der Guanidino-Gruppen in der protonierten Form vorliegen. Hier verfügen diese über kein freies Elektronenpaar, das für einen nukleophilen Angriff auf die NHS-Gruppe des Kopplungslipids notwendig ist. Der pK_a-Wert für das α-Amin am N-Terminus dagegen beträgt ca. 8 (Hermanson 1996): Somit liegen bei einem pH-Wert von 8 theoretisch 50% und bei einem pH-Wert von 9 schon 91% dieser Gruppe in der unprotonierten Form vor. Da die Kopplung des Fluorescein-Isothiocyanats bei einem pH-Wert von 9 und die an die Liposomen bei einem von 8 durchgeführt wurde, konnte davon ausgegangen werden, daß die Kopplung des EGF´sm1 über dessen N-terminale α-Aminogruppe verlaufen ist. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß auch Arginine an der Kopplung beteiligt waren, da diese pK_a-Werte sich nur auf die isolierten Aminosäuren beziehen. Deshalb können die vorangegangenen Betrachtungen jedoch nur als Orientierung dienen, da in einem Protein wie dem EGF die pK_a-

Werte auch durch die benachbarten Aminosäuren mitbestimmt werden und sich deshalb verschieben können.

Kikuchi et al. (1996) derivatisierten das humane EGF-Protein mit N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio)propionat (SPDP) und erzeugten durch Reduktion mit Dithiothreitol freie Thiolgruppen. Über diese koppelten sie das EGF-Protein an kationische Liposomen. Durch die Zielsteuerung konnten sie verstärkt DNA mit diesen Liposomen in HEC-1-A Zellen liefern. Da das SPDP mit Aminfunktionen des EGF´s reagiert (Hermanson, 1996), kann hier von keiner gerichteten Kopplung ausgegangen werden, da das humane EGF Protein über mehrere solcher Gruppen (α-Aminogruppe am N-Terminus, ε-Aminogruppen der beiden Lysine (Postionen 28 und 48), Guanidino-Gruppen der Arginine (Positionen 41, 45 und 53)) verfügt. Durch die Kopplung über das Lysin an Position 28 kann die Aktivität des EGF´s beeinträchtigt werden, da es in der Bindungsstelle positioniert ist (Gembitsky et al., 2002).

Eine Optimierung in Bezug auf eine gerichtete Kopplung stellt die Verwendung von murinem EGF dar: Bohl-Kullberg et al. (2002) aktivierten murines EGF, das an den murinen und den humanen EGF-Rezeptor bindet (French et al., 1995), mittels 2-Iminothiolan (Traut´s Reagenz). Die Kopplung von Traut´s Reagenz erfolgt über Aminfunktionen der Liganden: Die Erzeugung von Thiol-Gruppen auf diese Weise erscheint für das murine EGF sinnvoll, da dieses über keine Lysine verfügt. Über die Einstellung des pH-Werts während der Aktivierungsreaktion sollte eine Kopplung über die Arginine verhindert werden können und das 2-Iminothiolan sollte so spezifisch über den N-Terminus gekoppelt werden können. Über die entstandenen Thiolgruppen koppelte diese Gruppe dann das EGF an Maleimid-PEG-DSPE und inkorporierten diese Konjugate in PEG-ylierte Liposomen. Diese als Post-Insertions-Technik bezeichnete Methode wurde von Iden und Allen (2001) beschrieben. Ein Vorteil davon ist, daß keine unkonjugierten Kopplungslipide in den Liposomen zurückbleiben, die zu einer Immunantwort führen können. Durch eine solche kann sich die Blutverweildauer von Liposomen stark reduzieren (Boeckler et al., 1996). Des weiteren kann mit dieser Methode zusätzlich ausgeschlossen werden, daß Liganden ins Innere des Liposoms gerichtet sind. Um eine gerichtete Kopplung zu ermöglichen verwendeten Blessing et al. (2001) ebenfalls murines EGF als Liganden für die Erzeugung von zielgerichteten PEI / DNA Komplexen.

Somit stellt die Verwendung eines humanen EGF-Proteins, das gerichtet über den N-Terminus an therapeutische Systeme gekoppelt werden kann, eine Optimierung im Vergleich zum EGFwt dar. Watkins et al. (1997) konnten zeigen, daß die Aktivität des EGF´s durch die Kopplung über den N-Terminus nicht beeinträchtigt wird. Durch den modifizierten Liganden sollte eine Quervernetzung und eine daraus resultierende Aggregatbildung der Liposomen vermieden werden. Dieses Problem wurde bei der Kopplung von scFv-Fragmenten über eine Aminogruppe an N-Glut-PE-haltige Liposomen deutlich: Hier kam es ab einer bestimmten Konzentration an scFv-Fragmenten zu Ausfällungen im Reaktionsansatz.

4.3.2.4.1. Ausblick

In Zukunft sollten mit diesem zielgerichteten liposomalen System *in vivo*-Versuche durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die gerichtete Kopplung des Liganden zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt führt. Yamamoto et al. (2003) erzeugten TNFα-Varianten, bei denen die Lysine ausgetauscht wurden, um eine gerichtete Kopplung von PEG über die N-terminale α-Aminogruppe zu ermöglichen. Eine von diesen selektiv PEG-ylierten Varianten zeigte eine verstärkte Antitumorantwort im Vergleich zum PEG-ylierten Wildtyp.
Ein weiterer Vorteil eines humanen Liganden sollte darin bestehen, daß er nicht immunogen wirkt. Das murine und humane EGF sind nur zu 70% homolog. Dadurch kann im menschlichen Organismus eine Immunantwort ausgelöst werden. Allerdings liegen z. Zt. noch keine Ergebnisse vor, wie sich die 4 ausgetauschten Aminosäuren des EGFm1 auf die Immunogenität des modifizierten Liganden auswirken.

4.4. Verpackung von Cytarabin in Liposomen

4.4.1. Cytarabin

Die Verpackung von Zytostatika, die nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus ihre Wirkung entfalten (phasenspezifische Zytostatika), in Liposomen erscheint sehr sinnvoll zu sein. Entscheidend für die zytostatische Wirkung solcher Chemotherapeutika ist mehr die Dauer der Therapie und weniger die Höhe der Dosis. Um einen möglichst starken Anti-Tumoreffekt zu erreichen, ist es deshalb sehr wichtig, daß die Zellen diesem Zytostatikum über einen möglichst langen Zeitraum ausgesetzt werden (Karow und Lang, 1998). Auf Grund ihrer langen Zirkulation im Blutkreislauf (Gregoriadis, 1993) erfüllen spezielle liposomale Trägersysteme diese Forderung. Z. B. durch den Einbau von Phospholipiden mit gesättigten Fettsäureketten, Sphingolipiden und PEG in die liposomale Membran können Liposomen Halbwertszeiten im Blut zwischen 10 und 20 Stunden aufweisen (Oku und Namba, 1994). Darüber hinaus bietet die liposomale Verpackung auch Schutz vor der inaktivierenden Deaminierung zu Uracil-Arabinosid (Hamada et al., 2002).

Ziel dieses Teils der Arbeit war es deshalb, daß in der S-Phase des Zellzyklus aktive Zytostatikums Cytarabin (1-β-D-Arabinofuranosyl-cytosin, Cytosinarabinosoid, Ara-C) in die neuartige, Sphingomyelin-haltige liposomale Formulierung AVE 95 zu verpacken. In freier Form weist es eine initiale Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2\alpha}$) zwischen 7 und 20 Minuten und eine terminale Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2\beta}$) zwischen 2 und 3 Stunden auf (Hamada et al., 2002). Das Cytarabin enthält in Form der Arabinose einen „falschen“ Zucker, physiologischerweise ist die Desoxyribose Bestandteil der DNA und die RNA enthält Ribose (Abb. 4-61).

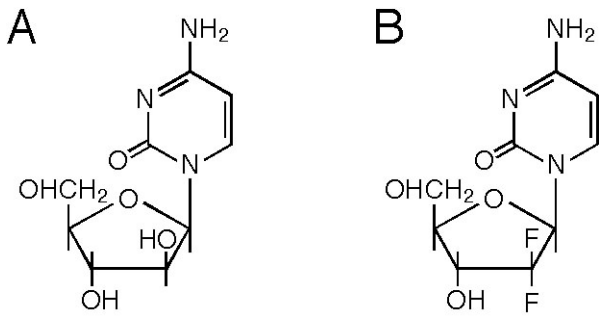


Abb. 4-61: Struktur der Nukleosidanaloga Cytarabin (A) und Gemcitabin (B). Im Unterschied zum Cytidin bzw. Desoxycytidin enthalten diese beiden Substanzen einen „falschen“ Zucker.

Das Cytarabin gehört zur Gruppe der Nukleosid-Analoga. Es wird intrazellulär zuerst in das Monophosphat und dann über das Diphosphat in seine aktive Form, dem Cytarabintriphosphat umgewandelt. Das Cytarabintriphosphat ist ein Konkurrenzsubstrat zu Desoxycytidintriphosphat und hemmt so die DNA-Polymerase, zusätzlich erfolgt auch ein Einbau in DNA und RNA. Bei der Verdoppelung der DNA stört dieser falsche Baustein das Ablesen der DNA-Sequenz und die Erbsubstanz kann somit nicht repliziert werden. Dadurch können sich die Zellen nicht mehr teilen und sterben (Roth und Fenner, 2000). Anwendung findet Cytarabin v. a. bei der Therapie von Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen (Johnson, 2001). Eine bedeutende Resistenz von Zellen gegen Cytarabin wird durch eine verminderte Aktivität der Deoxycytidinkinase verursacht (Wagner et al., 2000). Dieses Enzym ist für die intrazelluläre Umwandlung des Cytarabins in das Cytarabinmonophosphat verantwortlich. Somit könnte die Verabreichung des Cytarabinmonophosphats diese Resistenz umgehen und zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt führen.

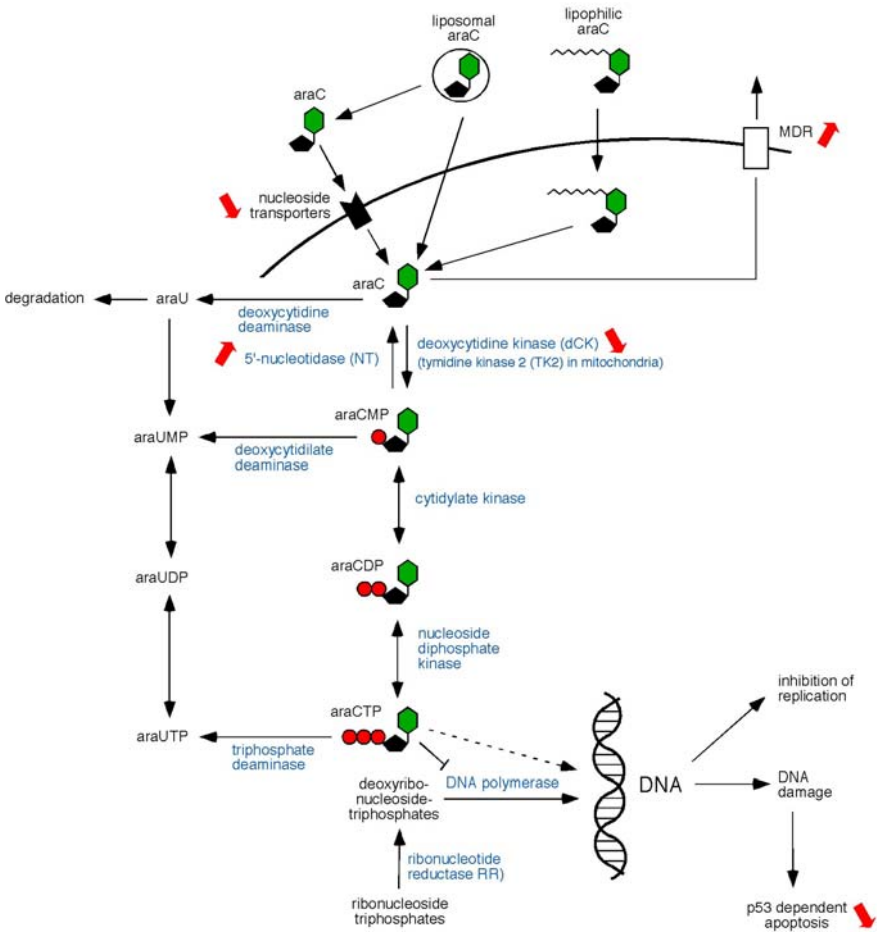


Abb. 4-62: Wirkmechanismus und Stoffwechsel von Cytarabin. araC = Cytarabin, MDR = multi drug resistence, araCMP = Cytarabinmonophosphat, araCDP = Cytarabindiphosphat, araCTP = Cytarabintriphosphat, araU = Uracil-Arabinosid, araUMP = Uracilmonophosphat-Arabinosid, araUDP = Uracildiphosphat-Arabinosid, araUTP = Uraciltriphosphat-Arabinosid. Die roten Pfeile weisen auf Resistenzmechanismen hin.

4.4.2. Verpackung von Cytarabin in AVE 95

In der Dissertation von Nahde (2004) wurde beschrieben, daß die mit Doxorubizin beladene liposomale Formulierung AVE 95 einen sehr starken Anti-Tumoreffekt zeigte. Mit dieser Formulierung konnte im Vergleich zu den AVE 9 eine noch stärkere Tumorregression in einem murinen C26 Tumormodell nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit im Blut von Doxorubizin konnte durch die Verpackung in die Formulierung AVE 95 anstatt in die Formulierung AVE 9 von ca. 80 auf ca. 120 min verlängert werden. Die AVE 95 stellen eine Weiterentwicklung von den AVE 9 dar und zeichnen sich durch einen erhöhten Cholesterolgehalt aus (Cholesterol 50 mol%, POPC 24,7 mol%, SM 14 mol%, DLPE 11,3 mol%). Auf Grund dieser Daten schien es sinnvoll zu sein, das phasenspezifische Zytostatikum Cytarabin in die Formulierung AVE 95 zu verpacken.

4.4.2.1. Beladung der Liposomen

Das Cytarabin wurde in die liposomale Formulierung AVE 95 verpackt: Die AVE 95 (Gesamtlipidgehalt 10 µmol/ml) wurden nach der Film-Hydratationsmethode (siehe 6.7.1.) hergestellt. Da das Cytarabin sehr hydrophil ist (Löslichkeit in H_2O = ca. 1g/10 g H_2O), wurde es in PBS (100 mg/ml) gelöst und mit dieser Lösung der Lipidfilm hydratisiert. Diese Methode wird als passive Beladung (siehe 6.7.6.2.) bezeichnet. Die Liposomen wurden nacheinander durch folgende Filtergrößen extrudiert: 400 nm, 200 nm, 100 nm und 50 nm. Um nicht verkapseltes Cytarabin abzutrennen, wurden die Liposomen bei 4°C über Nacht gegen PBS dialysiert. Im Vergleich zu einer gelchromatographischen Abtrennung führt die Dialyse zu keiner Verdünnung der Liposomen. Dies ist im Hinblick auf *in vivo*-Versuche sehr wichtig, da es das Ziel ist, ein möglichst kleines Volumen zu applizieren. Ebenso wurde versucht, das Cytarabinmonophosphat zu verpacken. Bei Versuchen zur Löslichkeit stellte sich heraus, daß diese in PBS nur 10 mg/ml betrug. Darüber hinaus zeigte sich, daß das ursprünglich amorphe Pulver nach ca. 1 Stunde auskristallisierte. Deshalb wurden dem Cytarabinmonophosphat äquimolare Mengen an Natronlauge zugegeben, um das besser lösliche Natrium-Salz zu erzeugen. Mit dieser Methode konnte die Löslichkeit auf 50 mg/ml gesteigert werden.

4.4.2.1.1. Quantifizierung von Cytarabin

Um das in Liposomen verpackte Cytarabin zu quantifizieren wurden zwei Methoden entwickelt. Zuerst wurde versucht, daß Cytarabin photometrisch zu bestimmen: Die mit Cytarabin beladenen und dialysierten Liposomen wurden mit Chloroform versetzt und für ca. 5 min gevortext. Dabei sollten die Lipide in die Chloroform-Phase übergehen bzw. sich an der PBS / Chloroform Grenzschicht anlagern und das hydrophile Cytarabin sollte in der wässrigen Phase verbleiben. Um die Phasen nach dem Vortexen vollständig zu trennen, schloß sich eine 30-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm an. Danach wurde die wässrige Phase im Photometer bei 270 nm vermessen. Da bei wiederholten Messungen derselben Liposomenpräparation die Ergebnisse stark schwankten, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Vermutlich war dies auf eine nicht komplette und reproduzierbare Phasenverteilung des Cytarabins und der übrigen liposomalen Bestandteile zurückzuführen.

Deshalb wurde anschließend versucht, daß Cytarabin mittels RP-HPLC zu bestimmen. Von Kiffmeyer et al. (1998) wurde eine Mischung aus 10 Zytostatika, die auch Cytarabin enthielt, mittels einer Nucleosil 100-5 C18 Säule und eines Phosphat-Puffers / Methanol Gradientens aufgetrennt. Für die Bestimmung des Cytarabins mittels RP-HPLC wurde folgende Methode entwickelt: Um das verkapselte Cytarabin aus den Liposomen freizusetzen, wurden diese mit 20%-igem TRITON-X inkubiert. Als Säule wurde eine Phenomenex Synergi 4µ Hydro RP 80Å 250 x 4,6 mm benutzt, als Fließmittel diente eine Mischung aus 97% Phosphat-Puffer (10 mM, pH 3) und 3% Methanol. Die Analyse erfolgte unter isokratischen Bedingungen über einen Zeitraum von 10 Minuten, nach einer Retentionszeit von ca. 6,3 Minuten wurde das Cytarabin von der Säule eluiert. Um die liposomalen Bestandteile von der Säule zu entfernen schloß sich ein Reinigungslauf mit Methanol an.

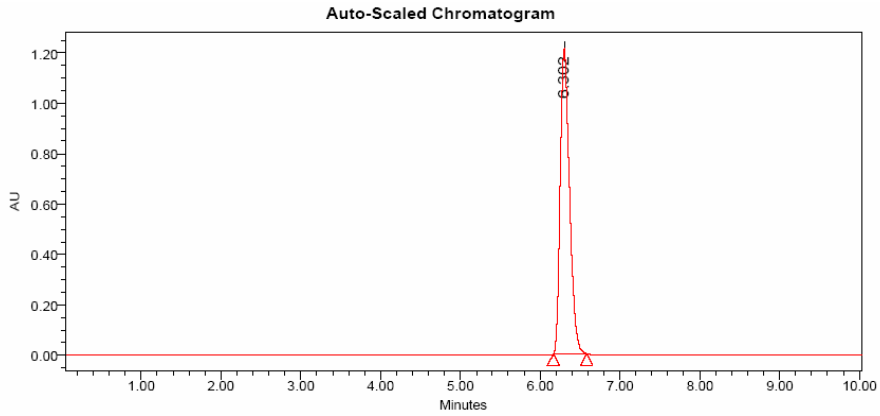


Abb. 4-63: Quantifizierung von Cytarabin mittels RP-HPLC: Das Cytarabin wurde auf einer RP18-Säule unter isokratischen Bedingungen quantifiziert, als Fließmittel wurde eine Mischung aus 97% Phosphatpuffer (10mM, pH 3) und 3% Methanol verwendet. Die Detektion erfolgte bei 270 nm. Hier wurden 10 nmol freies Cytarabin, gelöst in 20 µl Fließmittel, auf die Säule aufgetragen.

Da mit dieser Methode reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden, wurde sie routinemäßig für alle weiteren Bestimmungen benutzt. Ebenso konnte das Natriumsalz des Cytarabinmonophosphats bestimmt werden. Da auch nur ein Peak aufgetreten war, konnte davon ausgegangen werden, daß sich durch die Behandlung mit Natronlauge das Cytarabin-monophosphat nicht zersetzt hatte (Daten nicht gezeigt).

4.4.2.1.2. Untersuchung der Verpackungseffizienz in Abhängigkeit vom Lipidgehalt

Zunächst wurde untersucht, wie sich der Lipidgehalt auf die Verpackungseffizienz von Cytarabin auswirkt. Dazu wurden AVE 95 in verschiedenen Konzentrationen mittels der Film-Hydratationsmethode hergestellt: 10 µmol/ml, 20 µmol/ml, 40 µmol/ml, 80 µmol/ml und 120 µmol/ml. Daran schloß sich die Quantifizierung des Cytarabins mittels RP-HPLC an.

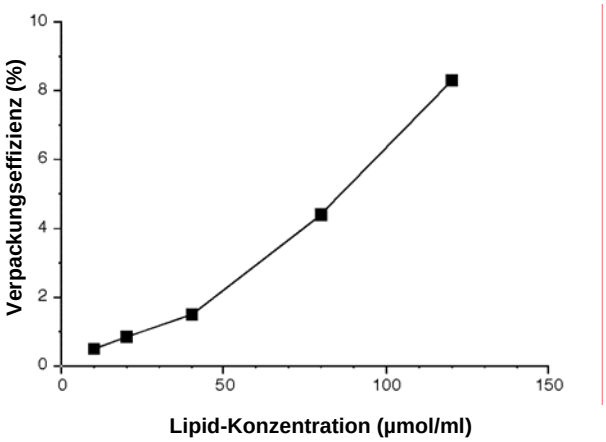


Abb. 4-64: Graphische Darstellung der Verpackungseffizienz des Cytarabins in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration.

Bei einer Lipidkonzentration von 10 µmol/ml betrug die Verpackungseffizienz ca. 0,5%, diese konnte durch die Verwendung einer Lipidkonzentration von 120 µmol/ml auf ca. 9% gesteigert werden. Allerdings blieb das molare Verhältnis von Cytarabin zu Lipid mit 0,2-0,3 µmol Cytarabin/µmol Lipid annährend konstant (Abb. 4-64). Die Größen der Liposomen bewegten sich in einem relativ großen Bereich zwischen 150 – 200 nm. Für die Verpackungseffizienz des Cytarabinmonophosphats in AVE 95 (Lipidkonzentration: 120 µmol/ml) ergaben sich Werte zwischen 16 und 18%.

4.4.2.1.3. *In vitro*-Stabilität

Für die Herstellung von Cytarabin-haltigen AVE 95 Liposomen wurde deshalb standardmäßig eine Lipidkonzentration von 120 µmol/ml verwendet. Zunächst wurde die Stabilität dieses liposomalen Systems untersucht. Damit ein solches System im voraus hergestellt werden kann, muß es während der Lagerung stabil sein. Nur so kann bei der späteren Verwendung sichergestellt werden, daß ein definiertes Produkt appliziert wird. Die Liposomen wurden direkt nach der Herstellung bei 4°C über Nacht dialysiert und der mittels RP-HPLC gemessene Cytarabin-Gehalt gleich 100% (Tag 0) gesetzt. Ein Teil der Liposomen wurde bei 4°C, der andere bei 37°C gelagert. An den Tagen 1, 4, 6 und 8 wurden jeweils Proben entnommen und das aus den Liposomen freigesetzte Cytarabin mittels Vivaspins® abgetrennt.

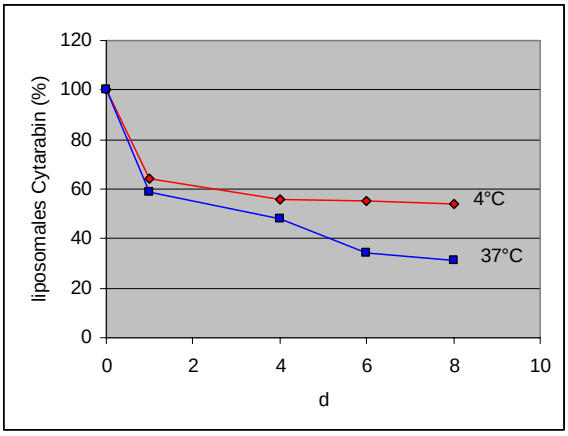


Abb. 4-65: Stabilität von liposomal verkapseltem Cytarabin bei 4°C und 37°C

Die Stabilitätsuntersuchung ergab, daß bei einer Lagerungstemperatur von 37ºC während des 8-tägigen Untersuchungszeitraums mehr Cytarabin freigesetzt wurde als bei 4ºC:
Bei einer Temperatur von 4°C waren nach einem Tag noch 64% des Cytarabins in den Liposomen verpackt, dieser fiel nach 8 Tagen auf einen Wert von 54,4%. Im Gegensatz dazu betrug bei 37°C der verpackte Anteil nach einem Tag 58,6% und fiel nach 8 Tagen auf 31%. Parallel dazu wurden auch die Größen der Liposomen vermessen: Der Ausgangswert lag am Tag 0 bei 192 ± 8,8 nm, bei der Lagerungstemperatur von 4ºC stieg dieser Wert nach 8 Tagen auf 210 ± 15,6 nm. Dagegen wiesen die Liposomen bei 37ºC nur noch eine Größe von 168 ± 7,6 nm auf.

4.4.2.2. *In vivo*-Tumorregressionsstudien

Um den Anti-Tumoreffekt des liposomal verpackten Cytarabins zu untersuchen, wurde ein murines C26 Tumormodell (siehe 6.11.2.) verwendet. Die murinen Kolonkarzinomzellen (C26) wurden intradermal in Nacktmäuse injiziert. Das Cytarabin wurde in die Formulierung AVE 95 (120 µmol/ml) verpackt und direkt nach der Dialyse den Mäusen appliziert. Die Größe der Liposomen betrug 185,4 ± 14,3 nm. Nachdem die Tumoren eine Größe von 50-100 mm^3 erreicht hatten (Tag 0) wurden die Mäuse an den Tagen 1, 3 und 6 mit dem liposomal verpackten Cytarabin behandelt.

In einem ersten Experiment (Applikation an den Tagen 1, 3 und 6) zeigte sich eine sehr starke Reduktion des Tumorwachstums bei Mäusen, die mit liposomal verkapseltem Cytarabin in einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht (KG) behandelt wurden. Allerdings waren bei diesen Mäusen sehr starke Nebenwirkungen zu beobachten. Über den gesamten Körper zeigten sich parenchymale Blutungen. Deshalb war nicht auszuschließen, daß die Tumorregression eine Folge des schlechten Allgemeinzustands der Mäuse gewesen ist. Bei der makroskopischen Betrachtung der entnommenen Organe konnten allerdings keine Abnormalitäten festgestellt werden. Die Applikation von liposomal verkapseltem Cytarabin in einer Konzentration von 12,5 mg/kg KG und freiem Cytarabin in einer Konzentration von 50 mg/kg KG führte dagegen zu keiner Inhibierung des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe (unbehandelte Mäuse).

In einem weiteren Experiment (Abb. 4-66) wurden deshalb die Mäuse nach demselben Applikationsschema mit folgenden Konzentrationen an liposomal verpacktem Cytarabin behandelt: 20, 30 und 40 mg/kg KG. Als Kontrollen wurde freies Cytarabin (40 mg/kg KG), freies Gemcitabin (40 mg/kg KG) und eine Gruppe unbehandelter Mäuse mitgeführt. Gemcitabin ist ebenfalls ein Cytidin-Nukleosidanalogon mit einem falschen Fluor-substituierten 2-Desoxy-Zucker und stellt eine Weiterentwicklung des Cytarabins dar (Abb. 4-61). Es zeigt v. a. beim Pankreaskarzinom einen starken therapeutischen Effekt (Schnall und Macdonald, 1996).

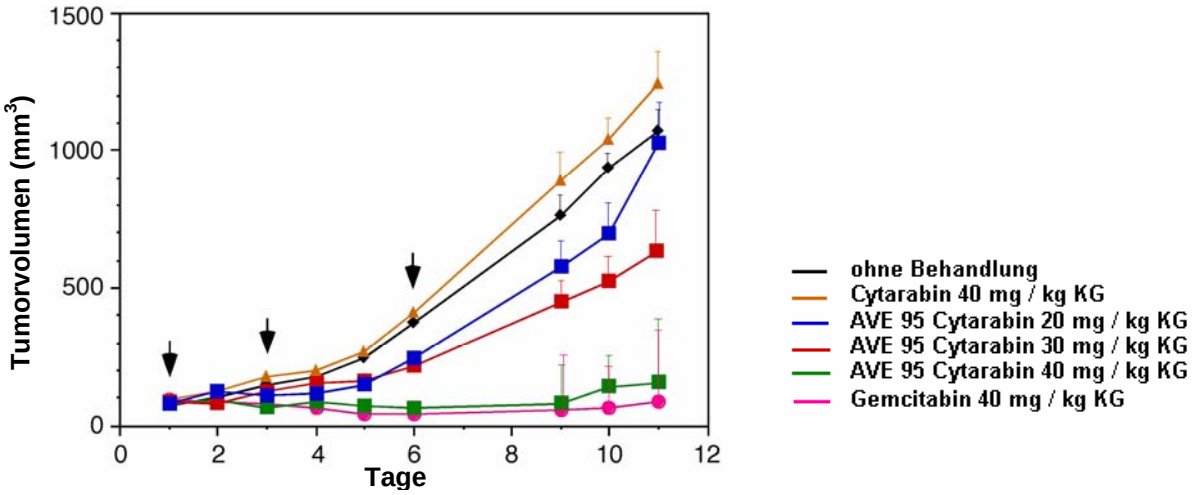


Abb. 4-66: Tumorregressionsstudie mit liposomal verkapseltem Cytarabin: AVE 95 Cytarabin wurde in verschiedenen Dosierungen (20, 30 und 40 mg/kg KG) an den Tagen 1,3 und 6 (schwarze Pfeile) in die Schwanzvene von Nacktmäusen appliziert. Die Nacktmäuse trugen C26 Tumore. In der Gemcitabin-Gruppe befanden sich 4, in allen anderen Gruppen je 5 Mäuse. Als Kontrollen wurden freies Cytarabin und Gemcitabin sowie Mäuse ohne Behandlung mitgeführt. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem Tierarzt S. Hoffmann, vectron therapeutics AG, durchgeführt.

In diesem Experiment war eine von der Dosis abhängige Tumorregression durch das liposomal verkapselte Cytarabin zu sehen: Von den Mäusen, die mit der Dosis 40 mg/kg KG behandelt wurden, zeigten 4 von 5 kein weiteres Tumorwachstum. Bei einer Maus aus dieser Gruppe zeigten sich allerdings wieder parenchymale Blutungen, dies deutete auf ein Überschreiten der maximal tolerierbaren Dosis hin. Ähnlich war das Ergebnis in der Gruppe, die mit freiem Gemcitabin behandelt wurde: Hier zeigten 2 Mäuse Remissionen und 2 andere kein weiteres Tumorwachstum. Die Mäuse, die mit 20 und 30 mg Cytarabin AVE 95/kg KG behandelt wurden, zeigten nur ein reduziertes Tumorwachstum. Im Gegensatz dazu hatte das freie Cytarabin (40 mg/kg KG) keinen Einfluß auf das Tumorwachstum, die Tumorgrößen waren mit denen der unbehandelten Tiere vergleichbar. Der Unterschied zwischen liposomalem und freiem Cytarabin (40 mg/kg KG) ist statistisch signifikant ($p = 0{,}001$). Auch eine Dosis von 200 mg freiem Cytarabin/kg KG bewirkte keine Inhibierung des Tumorwachstums (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigte sich, daß für liposomal verkapseltes Cytarabin nur ein sehr enges therapeutisches Fenster existiert, da bei einer Dosis von 50 mg/kg KG liposomalen Cytarabins alle Mäuse toxische Nebeneffekte in Form von parenchymalen Blutungen aufwiesen und bei einer Dosis von 30 mg/kg KG liposomalen Cytarabins nur ein verlangsamtes Tumorwachstum zu sehen war.

In einer weiteren Studie wurde auch die Antitumoraktivität des liposomal verkapselten Cytarabinmonophosphats untersucht. Hierbei zeigte sich, daß dieses bei einer Dosis von 40 mg/kg KG (Applikation an den Tagen 1, 3 und 6) in seiner Antitumoraktivität mit dem lipsomal verkapselten Cytarabin (40 mg/kg KG) zu vergleichen war (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde hier ein weitaus stärkerer Anti-Tumoreffekt erwartet. Vermutlich gelangte das Cytarabinmonophosphat nicht in die Zellen, da es außerhalb der Zellen aus den Liposomen freigesetzt wurde. In freier Form ist es vermutlich zu polar, um die Zellmembran zu überwinden. Andererseits könnte auch die Phosphatgruppe durch Phosphatasen an der Zelloberfläche abgespalten worden sein (Wagner et al., 2000).

4.4.2.3. Diskussion

In diesem Teil der Arbeit wurde erfolgreich das Nukleosid-Zytostatikum Cytarabin in die neuartige liposomale Formulierung AVE 95 verpackt. Es handelt sich um ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetaboliten, das seine Wirkung in der S-Phase des Zellzyklus entfaltet. Um einen maximalen Anti-Tumoreffekt zu erzielen, müssen solche Zytostatika deshalb über einen möglichst langen Zeitraum den Zellen ausgesetzt werden (Karow und Lang, 1998). Diese Forderung kann durch die geschützte Verpackung in lang zirkulierende Liposomen erreicht werden (Gregoriadis, 1993). Ein überlegener Antitumor-Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit mit liposomal verkapseltem Cytarabin im Vergleich zu freiem Cytarabin erzielt werden. Ein Vorteil von Cytarabin ist, daß es sich auf Grund seiner Hydrophilie sehr einfach in Liposomen verpacken läßt.

4.4.2.3.1. Verpackung von Cytarabin in Liposomen

Auf Grund der Hydrophilie des Cytarabins ist die passive Beladung der Liposomen mit einem sehr großen Verlust an Wirkstoff verbunden, da der größte Teil nicht in die innere wässrige Phase der Liposomen gelangt, sondern im Hydratationsmedium verbleibt. Das nicht verkapselte Cytarabin konnte mittels Dialyse abgetrennt werden. Um eine möglichst große Menge Cytarabin in Liposomen verkapseln zu können, mußte deshalb eine sehr hohe Lipidkonzentration gewählt werden. Erst bei einer Lipidkonzentration von 120 µmol/ml wurde eine akzeptable Verpackungseffizienz von 8-10% erreicht. Nach der Dialyse zeigte sich aber, daß das Cytarabin sehr schnell aus den Liposomen herausdiffundierte und sich wieder ein Gleichgewicht zwischen der inneren und äußeren wässrigen Phase der Liposomen ausbildete. Bei der Beladung von Doxorubizin mittels eines pH-Gradienten kommt dieses nicht vor, da das Doxorubizin als Salz in einem gelartigen Zustand in den Liposomen verbleibt (Mayer et al., 1986). Nach einem Tag waren bei einer Lagertemperatur von 37ºC nur noch ca. 60% des Cytarabins liposomal verkapselt.

Ganapathi et al. (1980) erreichten eine vergleichbare Verpackungseffizienz: Sie verkapselten Cytarabin in Liposomen mit einem Cholesterolgehalt von 50% und trennten nicht verpacktes Cytarabin ebenfalls mittels Dialyse ab. Allerdings verwendete diese Gruppe eine Lipidkonzentration von ca. 40 µmol/ml, es handelte sich hier aber um multilamellare

Liposomen, deren Größen nicht bestimmt wurden. Aber schon nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37ºC lagen nur noch 60% des Cytarabins in verkapselter Form vor. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels einer Ausschüttelmethode und photometrischer Bestimmung. Eine solche wurde auch von uns zuerst angewandt, es zeigte sich aber, daß diese mit sehr großen Schwankungen behaftet war. In dieser Arbeit wurden Liposomen mit definierten Größen hergestellt und eine RP-HPLC Methode, mit der sich reproduzierbare Ergebnisse erzielen ließen, benutzt. Deshalb sind die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar.

Mayhew et al. (1979) untersuchten die Freisetzung von Cytarabin bei 37ºC in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt von PG:PC Liposomen. Ohne Cholesterol in den Liposomen waren nach 24 Stunden noch ca. 35% Cytarabin liposomal verkapselt. Wurde der Cholesterolgehalt wie bei den AVE 95 auf 50% gesteigert, betrug dieser Wert ca. 85%. Die Größen dieser Liposomen wurden allerdings nicht bestimmt. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß es sich um große unilamellare Liposomen gehandelt hat (Neubert et al., 2000), da diese durch eine 400 nm Membran extrudiert wurden.

Juliano und Stamp (1978) konnten zeigen, daß die Feisetzung des Cytarabins aus den von ihnen verwendeten Liposomen nicht durch die Inkubation mit Plasma beeinflußt wurde. Dieses Ergebnis ist aber nicht ohne weiteres auf andere Liposomen zu übertragen, da die Interaktionen von den Lipiden abhängig sind. In der Dissertation von Nahde (2004) wurde beschrieben, daß an die Formulierung AVE 95 nach der Inkubation mit Plasma keine Proteine gebunden hatten. Dies deutet darauf hin, daß sich die Freisetzung von Cytarabin aus den AVE 95 durch die Inkubation mit humanem Plasma nicht verändern sollte.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, daß ein solches System für eine therapeutische Anwendung nicht im voraus produziert werden kann. Durch die Freisetzung des Cytarabins während der Lagerung kann keine definierte Menge an liposomal verkapseltem Cytarabin zum Zeitpunkt der Applikation sichergestellt werden. Ein solches System kann also nur *in situ* direkt vor der Applikation hergestellt werden.

Um das Problem der Lagerinstabilität zu lösen, verfolgten Moog et al. (2002) deshalb folgenden Ansatz: Diese Arbeitsgruppe verkapselte das ebenfalls hydrophile Zytostatikum Gemcitabin auf passivem Weg in eine sehr hochkonzentrierte Liposomen Suspension (Vesikuläres Phospholipid Gel). Der Lipidgehalt lag dabei bei 660 µmol/ml. Nach der Herstellung erfolgte aber keine Abtrennung des nicht verkapselten Anteils an Gemcitabin. Diese Formulierung enthielt eine Mischung aus 67% freiem und 33% liposomal verkapseltem Gemcitabin. Da so ein Gleichgewicht zwischen der inneren und äußeren wässrigen Phase der

Liposomen bestand, war diese Formulierung über 8 Monate bei 4ºC stabil. Vor der Applikation erfolgte eine Verdünnung, um das VPG applizieren zu können. Einem anderen Ansatz gingen Schwendener und Schott (1996) nach: Sie verkapselten ein lipophiles Derivat des Cytarabins (N4-octadecyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosin = NOAC) in Liposomen. Primär wurde dieses Derivat entwickelt, um das Molekül vor der inaktivierenden Deaminierung zu schützen. Als nachteilig erwies sich, daß das liposomal verkapselte Cytarabin-Derivat auf Grund seiner Lipophilie auf Plasmaproteine übertragen wurde und sehr stark an Erythrozyten band (Koller-Lucae et al., 1997). Sehgal und Rogers (1995) verkapselten Cytarabin in Liposomen, die mit einem Polysaccharid überzogen waren. Durch den abschirmenden Effekt des Makromoleküls konnte die Stabilität und das Freisetzungsprofil des Zytostatikums optimiert werden.

4.4.2.3.2. Liposomal verkapseltes Cytarabin *in vivo*

Mittels eines L1210 Leukämie Modells (Mayhew et al., 1979; Ganapathi et al., 1980) konnte *in vivo* der Nachweis erbracht werden, daß liposomal verkapseltes Cytarabin im Vergleich zu freiem zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt führt. Auf dem Markt befindet sich die liposomale Cytarabin-Formulierung DepoCyt®: Allerdings handelt es sich hierbei um multilamellare Liposomen in einem Größenbereich von 3 – 30 µm, die intrathekal bei neoplastischer Meningitis angewendet werden (Murry und Blaney, 2000).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß liposomal verkapseltes Cytarabin verglichen mit freiem in einem C26 Tumormodell zu einer Tumorregression führte. Allerdings stellte sich heraus, daß für liposomal verkapseltes Cytarabin nur ein sehr schmales therapeutisches Fenster existiert. Bei unserem Applikationsschema (Injektionen an den Tagen 1, 4 und 6) zeigte eine Dosierung von 40 mg/kg KG den stärksten Anti-Tumoreffekt. Aus der Gruppe von fünf Mäusen zeigte eine Maus toxische Wirkungen in Form von parenchymalen Blutungen. Deshalb sollte die optimale Dosis noch exakter bestimmt und verschiedene Applikationsschemata untersucht werden.

Auch Ganapathi et al. (1980) beobachteten nach drei Injektionen von liposomal verkapseltem Cytarabin in einer Dosierung von 40 mg/kg KG das Sterben von Mäusen infolge toxischer Effekte. Die Ergebnisse sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da diese Gruppe ein anderes Applikationsschema verwendete. Mayhew et al. (1979) konnten mit einem L1210 Leukämie Maus Modell nachweisen, daß sich der Anti-Tumoreffekt des liposomal

verkapselten Cytarabins mit steigendem Cholesterolgehalt verstärkte. Deshalb dürfte sich auch der hohe Cholesterolgehalt der AVE 95 positiv auf die Tumorregression ausgewirkt haben. Allerdings wurden noch keine vergleichenden Studien mit anderen Liposomen durchgeführt.

Intrazellular muß das Cytarabin zuerst in das Monophosphat und dann über das Diphosphat zum Triphosphat, das die eigentliche Wirkform darstellt, umgewandelt werden. Der erste Schritt wird von der Deoxycytidinkinase katalysiert (Wagner et al., 2000). Wenn Zellen über einen längeren Zeitraum mit Cytarabin behandelt werden, sinkt die Aktivität dieses Enzyms. Auf diese Art bildet sich eine Resistenz gegenüber dem Cytarabin aus. Mit der Lieferung von Cytarabinphosphaten direkt in die Zellen könnte dieser Resistenzmechanismus umgangen werden. Diesen Ansatz verfolgten Rustum et al. (1981): Diese Gruppe verpackte Cytarabin-monophosphat und -triphosphat in PS/PC und PS/PC/Chol Liposomen und untersuchte, ob diese Moleküle in resistenten Zellen ihre Wirkung entfalten konnten. Allerdings gelang es nicht, dieses nachzuweisen. Vermutlich wurden die Liposomen nicht von den Zellen aufgenommen und der Inhalt der Liposomen wurde extrazellulär freigesetzt. Dabei kam es vermutlich durch Phosphatasen zu einer Abspaltung der Phosphatgruppen (Wagner et al., 2000) und danach zu einer Aufnahme von Cytarabin in die Zellen. Darüber hinaus wurde von dieser Gruppe beschrieben, daß Cytarabinphosphate auf Grund ihrer negativen Ladung nicht in der Lage sind, die Zellmembran zu überwinden. Dieses sind vermutlich auch die Ursachen, warum das in die liposomale Formulierung AVE 95 verpackte Cytarabinmonophosphat nicht zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt geführt hat.

4.4.2.3.3. Ausblick

Sudimack et al. (2002) verkapselten Cytarabin in pH-sensitive Liposomen, die mit einem gegen den Folat-Rezeptor gerichteten Liganden modifiziert waren. Mit diesen Liposomen führten sie Zytotoxizitäts-Studien an KB (humane orale Karzinomzell-Linie) Zellen durch: Dabei war der IC_{50} Wert der zielgerichteten pH-sensitiven Liposomen verglichen mit normalen zielgerichteten Liposomen um den Faktor 17 niedriger. Dies deutet darauf hin, daß mittels der pH-sensitiven Liposomen mehr Cytarabin in den Zellkern geliefert werden konnte.
Da Cytarabin auf Grund seiner Hydrophilie aber vermutlich nicht stabil in Liposomen verpackt werden kann, sollte dieses System zukünftig folgendermaßen weiterentwickelt werden: Es sollten die weniger hydrophilen Cytarabinphosphate in pH-sensitive Liposomen, die mit einem Zielsteuerungsmotiv versehen sind, verpackt werden. Durch ein solches System könnte sichergestellt werden, daß die Liposomen in die Zellen aufgenommen werden und daß es zu einer schnellen Freisetzung des Wirkstoffs aus den Endosomen kommt. Falls die Cytarabinphosphate nicht schnell genug aus dem sauren endosomalen Milieu entkommen können, könnte dies ansonsten zu einer Zersetzung der Moleküle führen.
Eine weitere Optimierung könnte durch die Verwendung von lipophilen Cytarabinphosphat-Derivaten und durch den Einsatz von PEG-ylierten Liposomen erreicht werden.

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die erfolgreiche Erzeugung von drei neuen zielgerichteten liposomalen Trägersystemen für den Transport von zytotoxischen Substanzen ins Tumorgewebe beschrieben. Mittels *in vitro*-Studien konnte eine selektive und spezifische Bindung sowie Aufnahme an die bzw. in die jeweiligen Zielzellen nachgewiesen werden.
Erste Versuche befaßten sich mit der Kopplung von endothelzellspezifischen Liganden an das Kopplungslipid N-Glut-PE, das in verschiedene liposomale Formulierungen inkorporiert worden war. Bei den Liganden handelte es sich um das gegen Endoglin gerichtete scFvFragment A5 und um das gegen α_v-Integrine gerichtete RGD-10 Peptid. Vorteilig bei dieser Methode war, daß die Zielsteuerungsmotive vor der Kopplung nicht modifiziert werden mußten. Als nachteilig stellte sich jedoch heraus, daß damit keine gerichtete Kopplung der Liganden an Liposomen zu erwarten war und daß nicht an alle verwendeten liposomalen Formulierungen Liganden gekoppelt werden konnten. Darüber hinaus erwies sich die nicht selektive Zellbindung N-Glut-PE-haltiger Liposomen, die durch die Inkubation mit dem Aktivierungsreagenz EDC noch gesteigert wurde, als besonders problematisch. Aus diesen Gründen wurde diese Kopplungsmethode nicht weiter verfolgt.

Das zur Darstellung der Immunliposomen verwendete scFv-Fragment A5 wurde zuerst auf DNA-Ebene für eine gerichtete Kopplung derivatisiert. Durch ein zusätzlich eingefügtes C-terminales Cystein wurde eine gerichtete Kopplung des Liganden an Maleimid-haltige Liposomen ermöglicht. Da dieses Cystein der Antigenbindungsseite gegenüber liegt, sollte durch die Kopplung die Antigenbindungsfähigkeit des scFv-Fragments nicht beeinträchtigt werden. Die Immunliposomen wiesen eine starke und spezifische Bindung an Endothelzellen auf. Auch die Inkubation mit humanem Plasma über einen Zeitraum von bis zu 6 Stunden konnte die Stärke der Bindung nicht verringern. *In vitro* zeigten die mit Doxorubizin beladenen Immunliposomen eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber den gleichen Liposomen ohne Zielsteuerung. Erste *in vivo*-Versuche demonstrierten allerdings, daß das verwendete Maleimid-haltige Kopplungslipid die Verweildauer der Immunliposomen im Blut drastisch reduzierte. Deshalb muß dieses System als nächstes im Hinblick auf eine längere Zirkulationsdauer, z. B. durch den Einsatz von PEG, optimiert werden. Wenn eine akzeptable Verweildauer erreicht ist, muß untersucht werden, ob durch die Zielsteuerung *in vivo* ein verstärkter Anti-Tumoreffekt erzielt werden kann.

Das RGD-10 Peptid wurde als Lipopeptid in die Liposomen inkorporiert. Mit dieser Methode kann im Vergleich zur Kopplung von Liganden an bestehende Liposomen ein definierteres System mit weniger Variablen erzeugt werden. So bleiben keine unkonjugierten Kopplungslipide auf der Liposomenoberfläche zurück und alle Liganden sind in einer einheitlichen Orientierung an den Lipidanker gebunden. Hierdurch sollte dieser Ansatz besonders im Hinblick auf ein späteres up-scaling und eine GMP-gerechte Produktion von Vorteil sein. Bei diesem Peptid erweist es sich als besonders vorteilhaft, daß es im Gegensatz zu dem in der Literatur als Standard beschriebenen RGD-4C Peptid bei einer vergleichbaren Bindungsaffinität zu den Zielzellen eine einfachere Struktur besitzt. Dadurch kann dieser Ligand mittels chemischer Synthese relativ einfach dargestellt werden. Obwohl mit diesem Transportsystem nachweislich Doxorubizin in die Zellen geliefert werden konnte, schien es die Endosomen nicht effizient verlassen zu können. Dies könnte durch die Verwendung von pH-sensitiven Liposomen verbessert werden.
Um Liposomen zu den Tumorzellen zu lenken wurde ein modifiziertes und humanes EGF-Protein an in Liposomen inkorporiertes NHS-PEG-DSPE gekoppelt. Dieser Ligand verfügt über eine vergleichbare Affinität wie das endogene humane EGF-Protein zum EGF-Rezeptor. Allerdings war dessen Struktur im Hinblick auf eine gerichtete Kopplung, damit diese spezifisch über die N-terminale α-Aminogruppe verlaufen kann, optimiert worden. Mittels *in vitro*-Studien konnte eine selektive und spezifische Bindung der zielgerichteten Liposomen nachgewiesen werden. *In vivo*-Studien müssen allerdings erst noch den Beweis erbringen, daß eine einheitliche Orientierung von Liganden zu einem verstärkten Anti-Tumoreffekt führt.

Für Zytotoxizitätstests und *in vivo*-Tumorregressionsstudien wurde das Zytostatikum Doxorubizin, das unabhängig von den Phasen des Zellzyklus auf Zellen wirkt, in die Immunliposomen und die zielgerichteten Liposomen verpackt. Mit der Verkapselung von phasenspezifischen Zytostatika könnte der Anti-Tumoreffekt von liposomalen Systemen weiter verstärkt werden. Um einen maximalen Anti-Tumoreffekt zu erzielen, müssen solche Zytostatika den Tumorzellen über einen möglichst langen Zeitraum ausgesetzt werden (Karow & Lang, 1998). Gerade diese Forderung kann durch eine Verpackung in lang zirkulierende Liposomen erreicht werden.
Ein solcher Ansatz wurde mit der Verkapselung des Nukleosid-Zytostatikums Cytarabin in die liposomale Formulierung AVE 95 verfolgt. *In vivo* zeigte das liposomale Cytarabin im Vergleich zu freiem eine signifikant verstärkte Inhibierung des Tumorwachstums. Auf Grund seiner Hydrophilie konnte dieses Zytostatikum allerdings nicht stabil in Liposomen verkapselt

werden. Deshalb sollte in Zukunft versucht werden, die lipophileren Cytarabinphosphate mittels zielgerichteter und pH-sensitiver liposomaler Systeme in Tumorzellen oder Endothelzellen zu liefern. Es besteht die Hoffnung, daß *in vivo* auf diese Art ein verstärkter Anti-Tumoreffekt zu erzielen ist.

Abschließend zusammengefaßt wurde in dieser Arbeit die erfolgreiche Etablierung von drei zielgerichteten liposomalen Trägersystemen für den Transport von zytotoxischen Substanzen sowie die Verpackung des Zytostatikums Cytarabins in Liposomen beschrieben. Weitere Verbesserungen könnten sich durch die Verwendung von PEG, pH-sensitiven Liposomen, anderen Chemotherapeutika und eine gleichzeitige Applikation verschiedener Kombinationen dieser zielgerichteten liposomalen Systeme ergeben.

6. Material und Methoden

Die zur Durchführung der vorliegenden Arbeit verwendeten Standardmethoden wurden gemäß Hermanson (1996), Kontermann und Duebel (2001), New (1989), Sambrook et al. (1989) sowie Torchilin und Weissig (2003) ausgeführt. Die nachfolgend beschriebenen Methoden sind in der genannten Literatur nicht enthalten oder weichen von den dort beschriebenen Methoden ab.

6.1. Materialien und Geräte

1) Erzeugung und Analytik von Antikörperfragmenten

Inkubatoren:	Brutschrank Function Line B6 (Fa. Heraeus, Hanau) Brutschrank Function Line B12 (Fa. Heraeus, Hanau) Schüttelinkubator Multitron II (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz)
Elektrophorese/ Immunoblot:	Power Pac 200 und 300 (Fa. Biorad, München) Gelapparatur für SDS-PAGE Mini-Protean II (Fa. BioRad, München) Trans-Blot SD Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell (Fa. BioRad, München) UV-Schirm mit Videokamera, Bildschirm und Videoprinter Modell Classic Uno (Fa. INTAS, Göttingen) Entwicklungsgerät (Fa. Kodak)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge Typ Biofuge pico, Laborzentrifuge Typ Multifuge 3s und 3sr (Fa. Heraeus, Hanau) Kühlzentrifuge J-6M/E (Fa. Beckmann, München)
Sonstige	2l Erlenmeyer-Kolben Dialyseschlauch (Fa. Roth) Poly-Prep Chromatographie-Säulen (Fa. Biorad, München)

2) Herstellung von Liposomen

Waagen:	Feinwaage MX 5 (Fa. Mettler Toledo GmbH, Giessen) Analysenwaage AE 240 (Fa. Mettler Toledo GmbH, Giessen) Laborwaage GS 620-2 (Fa. Kern & Sohn GmbH, Balingen)

Extruder:	LiposoFast incl. Polycarbonatfilter mit den Porengrößen 400, 200, 100 und 50 nm (Fa. Avestin, Ottawa, Kanada)
Rotatationsverdampfer:	Laborota 4000 efficient mit Vac Control Automatic (Fa. Heidolph, Kelkheim) mit Vakuummembranpumpe und Wasserbad
Vakuum-Schrank:	Vakuum-Trockenschrank KVTS 11 (Fa. Salvis AG, Emmenbrücke-Luzern, Schweiz) incl. Drehschieberölpumpe Typ RD-4 (Fa. Müller & Krempel AG, Bülach, Schweiz)
Sonstige:	Reinstwasseranlage Milli Q synthesis A 10 (Fa. Millipore, Schwalbach) 10 ml Rundkolben, Glasperlen Autoklav (Fa. Schütt, Olching) Magnetrührer Modell IKAMAG REO (Fa. IKA Labortechnik, Staufen) Ultraschallbad Vortex Heidolph Reax 2000 (Fa. Heidolph, Kelheim) Schüttelapparatur (Fa. IKA Labortechnik, Staufen) pH-Meter 766 Calimatic (Fa. Knick GmbH & Co., Berlin) Pipetten (Fa. Mettler Toledo GmbH, Gießen und Fa. Eppendorf, Hamburg) Vivaspins 2 ml (Fa. Vivascience, Hannover) Dialysekammern MWCO 10000 (Fa. Pierce, Bonn) Glas Econo-Columns (Fa. BioRad, München) Trenngele: Sepharose™ 4B, Sephadex™ G-25 coarse (Fa. Amersham Bioscience, Bucks, England) Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg) Einmalsterilfilter (Fa. Millipore)

3) Charakterisierung von Liposomen

Analytik:	Zetasizer 3000 HS (Fa. Malvern Instruments, Herrenberg) Photometer Ultrospec 3300 pro (Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg) Mikroplattenphotometer Emax Microplate Reader (Fa. molecular devices, Ismaning) Fluoreszenz Spektrophotometer LS 55 (Fa. Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim)
HPLC-Anlage:	Waters Alliance 2695 seperation module, 996 PDA Detektor, 474 Fluoreszenz Detektor und Empower Software Personal Edition (Fa. Waters, Eschborn) Säule: Synergi 4µ Hydro RP 80Å 250 x 4,6 mm (Fa. Phenomenex)
Mikroskope:	Leitz Aristoplan Fluoreszenzmikroskop mit Filtereinheiten N2.1, A Mikroskop Typ DMIL (Fa. Leica, Wetzlar)

	Fluoreszenzmikroskop BX 51 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)
FACS:	FACSCalibur (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg)
Sonstige:	Flüssigszintilationszähler LS 6500 (Fa. Beckman Coulter, Unterschleißheim-Lohhof) Heizblock Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf, Hamburg) 96-well Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Wiesbaden) FACS-Röhrchen (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg)

4) Zellkultur

Gefäße:	Einfrierröhrchen 1 ml (Fa. Nunc, Wiesbaden) 6-well Platten (Fa. Nunc, Wiesbaden) 96-well Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Fa. Nunc, Wiesbaden PP-Röhrchen 12 ml, 15 ml und 50 ml (Fa. Greiner, Nürtlingen) PS-Röhrchen 15 ml (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) Zellkulturflaschen (Fa. Greiner, Nürtlingen) Zellkulturschalen (Fa. Nunc, Wiesbaden) Duranglasflaschen 50, 100, 250, 500, 1000 ml (Fa. Schott, Mainz) PS-1/2 Mikro-Küvetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)
Inkubatoren:	CO_2-begasbarer Brutschrank, 37ºC, Modell Cytoperm (Fa. Heraeus, Hanau) CO_2-begasbarer Brutschrank, 37ºC, Modell BBD6220 (Fa. Heraeus, Hanau) Brutschrank Function Line Modell B 12, nicht begasbar (Fa. Heraeus, Hanau)
Sonstige:	Sicherheitswerkbank Typ HA 2448 (Fa. Heraeus, Hanau) Sicherheitswerkbank Typ HS 12 (Fa. Heraeus, Hanau) Stickstofftank Typ Chronos Biosafe (Fa. Messer Griesheim, Düsseldorf)

6.2. Chemikalien, Antikörper, Medien und Liganden

Die verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.A. und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Messer-Griesheim (Düsseldorf) (Ar, CO_2 und N_2), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Gibco BRL (Eggenstein), Boehringer Mannheim (Mannheim) und Amersham-Pharmacia (Freiburg). EPC wurde von der Fa. Lipoid KG (Ludwigshafen) erworben, alle anderen Phospholipide wurden von Avanti Polar

Lipids (Alabaster, Al, USA) und Cholesterol von Calbiochem (Ca, USA) bezogen. Die Antikörper für die Detektion der scFv-Fragmente im Immunoblot wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) und von der Firma Sigma (Deisenhofen) erworben. Die Zellkulturmedien wurden bei der Firma Bio Whittaker, Verviers, Belgien gekauft. Falls zusätzlich spezielle Chemikalien verwendet wurden, ist dieses bei den jeweiligen Methoden vermerkt. Die Liganden (scFv-Fragmente, Proteine und Peptide) wurden von der vectron therapeutics AG (Marburg) erzeugt, die Synthese der Lipopeptide wurde von emc microcollections (Tübingen) durchgeführt.

6.3. Allgemeine Lösungen

H_2O:	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
PBS (**p**hosphate **b**uffered **s**aline):	6,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 2,5 mM Kaliumchlorid 140 mM Natriumchlorid pH 7,25; autoklaviert
Tris-Puffer:	10 mM Tris, pH 7,4
Citratpuffer:	300 mM Natriumcitrat gelöst in H_2O, eingestellt auf pH 4 mit HCl

6.4. Zellkultur

6.4.1. Verwendete Zellen

Zelle	Herkunft	Zelltyp*	Medium	P**
Endothelzellen:				
HUVEC	Cambrex, Verviers / Belgien	Endothelzellen der Nabelschnurvene, primär, Passage 1 bis 6	EGM-2	1:3
HDMEC	promocell, Heidelberg	mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Haut, primär, Passage 1 bis 6	EGM-2	1:3
bEND3	ATCC	Maus-Endothelioma-Zell-Linie	DMEM, 10% FCS	1:3
Melanomzellen:				
MeWo	I. Hart, London	Melanomzell-Linie	DMEM, 10% FCS	1:6
B16	I. Hart, London	Murine Melanomzell-Linie	DMEM, 10% FCS	1:4
andere Zellen:				
A431	R. Bravo, Heidelberg	Vulvakarzinomzell-Linie	DMEM, 10% FCS	1:6
Hek 293	Fa.Quantum, MontrealKanada	embryonale Nierenzell-Linie,	DMEM Nut Mix F12, 10% FCS	1:8
3T3	R. Treisman, London	Mausfibroblastenzell-Linie	DMEM, 10% FCS	1:8
C 26	IMT Marburg	murine Kolonkarzinomzell-Linie	DMEM, 10% FCS	1:10

* human, falls nicht anders angegeben ** Aufteilungsverhältnis bei Passagierung

Tab. 6-1: Verwendete Zell-Linien

6.4.2. Zellkulturmedien und -lösungen

DMEM: Dulbeccos modified eagle medium, 4,5 g/l Glukose

DMEM Nut Mix F12: Dulbeccos modified eagle medium, 1g/l Glukose, Natriumpyruvat, 2 mM Glutamin

EGM-2: Endothelial cell growth medium, komplett als EGM-2 Kit: Basalmedium (EBM) mit Supplementen und 2% dialysiertem FCS angesetzt

FCS: Fetal calf serum

Trypsin-EDTA: 0,02% Trypsin, 0,05% EDTA

EDTA: 0,2 mg/ml EDTA

Gelatine: 1% Gelatine in H_2O, autoklaviert

DMSO: Dimethylsulfoxid, höchster Reinheitsgrad

Die in der Tab. 6-1 aufgeführten Zellen wurden routinemäßig in 10 cm-Zellkulturschalen in den angegebenen Medien unter Standardbedingungen (89% Luftfeuchtigkeit, 37°C, Begasung mit 5% CO_2) kultiviert. Jede Zell-Linie wurde mindestens zweiwöchentlich einem Test auf Mykoplasmen unterzogen. Bei der Verwendung von HUVEC wurden die Kulturschalen vorher mit Gelatine beschichtet.

6.4.3. Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ein Passagieren der Zellen erfolgte je nach Wachstumseigenschaften alle 2 bis 4 Tage. Dies erfolgte bei Zell-Linien über einen längeren Zeitraum, primäre Zellen wurden frisch aufgetaut und bis zur Passage 6 verwendet. Zur Passagierung wurde der Zellrasen mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Nachdem die Zellen sich abgerundet hatten, wurden sie durch einen seitlichen Schlag von der Schale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in dem oben genannten Verhältnis in frischem, serumhaltigem Medium ausgesät.
Zur Langzeitlagerung wurden die suspendierten Zellen 5 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert, in Einfriermedium (Kulturmedium mit 25% FCS, 10% DMSO, bei HUVEC 90% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in 1 ml-Einfrierröhrchen überführt. Nach Lagerung der Zellen für 1 Stunde auf Eis, 1 h bei –20°C und über Nacht bei –80°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Bei Bedarf wurden die Zellen wieder in Kultur genommen: Nach schnellem Auftauen der Zellen bei 37°C wurde die Zellsuspension in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und mit 5 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden anschließend bei 800 UpM pelletiert, in 10 ml Medium aufgenommen und auf eine 10 cm Schale ausgesät.

6.4.4. Bestimmung der Zellzahl

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die in einer 10 cm-Rundschale wachsenden Zellen zum Ablösen zuerst bei 37°C mit 2 ml Trypsin / EDTA über 5 min inkubiert und dann wurde die Reaktion mit 8 ml Medium gestoppt. Nachdem die Zellen sich abgerundet hatten, wurden sie durch einen seitlichen Schlag von der Schale abgelöst. Sie wurden danach in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und

das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl einer 0,4%-igen Trypanblaulösung (Fa. Sigma-Aldrich) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt und mit einer 20 µl Pipette wurde die angefärbte Suspension in eine Neubauer Zählkammer (Fa. Roth) gefüllt. Zur Auswertung wurde die Zählkammer unter ein Mikroskop mit 20-facher Vergrößerung gelegt. Dann wurde die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der blau gefärbten Zellen bestimmt. Der Prozentsatz der ungefärbten Zellen entspricht dem Anteil vitaler Zellen.

6.5. Erzeugung und Reinigung von Antikörperfragmenten

6.5.1. Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter Proteine aus dem Periplasma wurde der *E. coli* Stamm TG1 verwendet.

Dazu wurden zuerst 12 ml 2xTY-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 1% Glukose) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 Liter 2xTY-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 0,1% Glukose) in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach drei Stunden Inkubation bei 22°C im Schüttelinkubator wurden die Bakterien bei 4°C und 4000 UpM pelletiert und für die Proteinextraktion aus dem Periplasma verwendet.

2xTY-Medium: 16 g Bakto-Trypton
10 g Bakto-Hefe-Extrakt
5 g NaCl
H_2O auf 1 l aufgefüllt und mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt, anschl. autoklaviert

6.5.1.1. Proteinextraktion aus dem Periplasma

Zur Proteinextraktion aus dem Periplasma wurden die pelletierten Bakterien in 50 ml PP-Puffer resuspendiert, 50 µg/ml Lysozym zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zur Stabilisierung der Spheroblasten $MgSO_4$ (Endkonzentration 5mM) zupipettiert. Nach Pelletieren der Spheroblasten durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 9000 rpm wurde der Überstand mit dem rekombinanten Protein über Nacht bei 4°C gegen 5 l PBS, 20 mM Imidazol dialysiert.

PP-Puffer: 30 mM Tris-HCl, pH 8.0
10 mM EDTA
20% Sucrose

6.5.1.2. Proteinaufreinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie

Rekombinante Proteine mit einem "His-Tag" (sechs C-terminale Histidinreste) wurden über immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt.
Dazu wurden die dialysierten Periplasmapräparationen zunächst 10 min bei 4°C und 9000 rpm abzentrifugiert. Währenddessen wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose in eine Poly-Prep Chromatographie-Säule gefüllt und mit 10 ml IMAC-Ladepuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Probe auf die Säule geladen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit jeweils 10 ml IMAC-Waschpuffer wurde das Protein mit IMAC-Elutionspuffer in 500 µl Aliquots eluiert. Im Bradford-Schnelltest (siehe 6.6.1.) wurden die Fraktionen auf ihren Proteingehalt getestet. Positive Fraktionen wurden über Nacht bei 4°C gegen 2 l PBS dialysiert.

5x IMAC-Puffer:	250 mM Na-Phosphat 2,5 M NaCl
IMAC-Ladepuffer:	50 mM Na-Phosphat, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol
IMAC-Waschpuffer:	50 mM Na-Phosphat, 0,5 M NaCl, 35 mM Imidazol
IMAC-Elutionspuffer:	50 mM Na-Phosphat, 0,5 M NaCl, 100 mM Imidazol

6.6. Proteinanalytik

6.6.1. Bradford-Schnelltest

Mit diesem semiquantitativen Test wurden die eluierten Fraktionen der unter 6.5.1.2. beschriebenen affinitätschromatographischen Proteinaufreinigung auf ihren Proteingehalt visuell untersucht. Von jeder 500 µl Elutionsfraktion wurden 20µl in ein well einer 96-well Platte pipettiert und je mit 100 µl Bradfordlösung (Fa. Boehringer, Mannheim, 1:5 verdünnt) versetzt. Positive Fraktionen (die Empfindlichkeit dieses Tests liegt bei ca. 50 µg Protein/ml) konnten sofort an der Blaufärbung erkannt werden.

6.6.2. Photometrische Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der positiven Fraktionen des Bradford-Schnelltests (siehe 6.6.1.) wurde nach der Reinigung mittels Dialyse photometrisch quantifiziert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Absorptionsmessung bei λ=280 nm in Quarzküvetten. Die Proteinkonzentration wurde über dessen Extinktionskoeffizienten berechnet. Dieser wurde zuvor aus der Aminosäuresequenz des zu vermessenden Proteins mit dem PC-Programm Protean® ermittelt.

6.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden diese mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und gegebenenfalls mit β-Mercaptoethanol reduziert. Proteingele bestehen aus Sammel- und Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine fokussiert, so daß sie gleichzeitig in das Trenngel eintreten. Bei der Auftrennung von Antikörperfragmenten wurde standardmäßig ein 12%-iges Polyacrylamidtrenngel verwendet.

2 x SDS-Probenpuffer:	20% (v/v) Glyzin 4% (w/v) SDS 100 mM Tris-Base (20 mM β-Mercaptoethanol) 0,2% Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer (pH 8,6):	247 mM Tris-Base 1,92 M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Monomere Komponenten: des Acryamidgels	PAA (Acrylamid-Stocklösung: 30% Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid - Fertigmix
Polymerisationsstarter:	APS (Ammoniumpersulfat): 10% in H_2O TEMED (N, N, N′, N′ - Tetramethylethylendiamin)

	Trenngele			Sammelgel
	12%	10%	8%	3%
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	-	-	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
H_2O dest.	3,4 ml	4,0 ml	4,7 ml	6,4 ml
30% PAA	4,0 ml	3,4 ml	2,7 ml	1,0 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	33 µl	33 µl	33 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Farb- und Größenmarker: Precision Plus Protein Standards™ (Fa. BioRad, München)

Tab. 6-2: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele

Nach Gießen des Trenngels wurde dieses sofort mit H_2O dest. überschichtet, damit eine glatte Oberfläche entstand. Nach Beendigung der Polymerisation – anhand einer Trennlinie zwischen Gel und H_2O zu erkennen – wurde das überstehende H_2O entfernt und mit Zellstoff wurden Resttropfen abgesaugt. Nach Gießen des Sammelgels wurde sofort der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben im gleichen Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Bei der Verwendung eines 10-er Probenkammes wurde jede Probentasche standardmäßig mit einem Volumen von 40 µl befüllt. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer, zunächst 30 Minuten bei 80 V zum Einlaufen der Proteine in das Sammelgel, dann erfolgte die Trennung der Proteine bei 120 – 140 V bis zum Auslaufen des Probenpuffers.

Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel entweder in Coomassie Färbelösung gelegt oder für den Transfer der Proteine auf eine

Nitrozellulose-Membran benutzt. Das Trenngel wurde in der Coomassie Färbelösung über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde es in Entfärbelösung gelegt und so lange inkubiert, bis die Banden gut zu erkennen waren. Anschließend wurde das Gel getrocknet.

Coomassie Färbelösung:	50 ml Essigsäure 150 ml Methanol 300 ml H_2O 1,25 g Coomassie Brilliant Blue
Coomassie Entfärber:	900 ml Ethanol 200 ml Eisessig 900 ml H_2O

6.6.4. Western-Transfer

Zum immunologischen Nachweis eines bestimmten Proteins nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu wurden die Proteine zunächst vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Transfer) und anschließend immunologisch nachgewiesen. Zum Transfer wurde eine "semi-dry"-Blot-Apparatur verwendet. Der Aufbau des Blots erfolgte luftblasenfrei auf der Anodenplatte nach folgendem Schema: Zwei Filterpapiere Whatman - Nitrozellulose-Membran - Gel - zwei Filterpapiere Whatman. Die Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membran wurden mit Western-Blot-Transferpuffer befeuchtet. Der Transfer erfolgte bei 10V für 30 Minuten.

Western-Blot-Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol

6.6.5. Immunoblot

Die mit Proteinen geladene Nitrozellulose-Membran wurde für 1 Stunde bei RT schüttelnd in PBS, das 5% Magermilchpulver und 0,1% Tween 20 enthielt, geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, in jeweiliger Verdünnung, ebenfalls in 5% MPBS/0,1% Tween 20. Die Membran wurde anschließend dreimal gut mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen.

Gegebenenfalls folgte die Inkubation mit der Zweitantikörperverdünnung in MPBS/Tween für 30 bis 45 Minuten bei RT, nach der die Membran erneut dreimal mit PBS/Tween und anschließend dreimal mit PBS gewaschen wurde. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mittels Lumineszenz-Assay (ECL-Kit® bzw. ECL-Plus-Kit®, Fa. Amersham). Dazu wurden die zwei Lösungen nach Angaben des Herstellers gemischt und die Membran darin für die vom Hersteller angegebene Zeit inkubiert. Die Membran wurde in eine Folie eingepackt und in eine Filmkassette gelegt. Anschließend wurde sofort ein Röntgenfilm aufgelegt, der je nach Stärke der Chemilumineszenz 1 bis 30 Minuten exponiert wurde. Der Film wurde sofort entwickelt.

Erstantikörper:	anti-His-Tag-Maus-monoklonaler-IgG Antikörper, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt, Verdünnung: 1/1000
Zweitantikörper:	Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt, Verdünnung: 1/1000

6.7. Liposomentechnologie

6.7.1. Herstellung der Liposomen

Die Liposomen wurden routinemäßig mit einem Gesamtlipidgehalt von 10 µmol/ml Hydratationsmedium hergestellt, wobei das molare Verhältnis der einzelnen Komponenten der Tab. 4-1 zu entnehmen ist. Die verwendeten Lipide sind in Tab. 6-3 dargestellt. Die Herstellung der Liposomen erfolgte mittels der Filmhydratations- und Extrusionstechnik. Hierfür wurden in 2 ml Glas-Probenflaschen die einzelnen Lipide in Chloroform gelöst, für das DLPE wurde eine Mischung aus Chloroform und Methanol (1:1) benutzt (die Konzentrationen der Stammlösungen betrugen je ca. 50 µmol/ml). In die Plastik- Schraubverschlüsse wurden zusätzlich Teflonscheiben eingelegt. Die Stammlösungen wurden mit Argon überschichtet und bei unter - 20°C aufbewahrt. Das der erforderlichen Menge an jeweiligem Lipid entsprechende Volumen an Stammlösung wurde in einen 10 ml Glasrundkolben pipettiert. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer unter Rotation des Kolbens bei 34º C und einem Vakuum von 30 mbar für mindstens 15 Minuten abgezogen. Zur vollständigen Entfernung der Lösungsmittel wurde der Lipidfilm mindestens 1 Stunde im Vakuumschrank bei einem Vakuum von 10 mbar nachgetrocknet. Danach erfolgte die Hydratisierung des Lipidfilms durch Zugabe des

Dispersionsmittels (routinemäßig PBS). Die Liposomenbildung wurde durch Zugabe von Glasperlen, Rotation im Wasserbad bei 34ºC und Beschallung unterstützt. Die so entstandenen multilamellaren Vesikel ruhten danach für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur.
Nach Ablauf der Ruhezeit wurden die multilamellaren Vesikel in einer LiposoFast-Apparatur durch Polycarbonatfilter der Porengröße 400 nm, 200 nm, 100 nm und 50 nm jeweils 21mal extrudiert. Für Formulierungen, die unter einer erhöhten Temperatur extrudiert werden mußten, wurde ein speziell für den Extruder angefertigtes Wasserbad benutzt. Für *in vivo*-Versuche wurden die erhaltenen Liposomendispersionen einer Sterilfiltration durch Einmalsterilfilter mit einer Porenweite von 0,22 µm unterzogen und in autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 - 6ºC.

Abkürzung	**Chemische Bezeichnung**	**Hersteller**
^{3}H-COE	^{3}H-Cholesteryl-oleoyl-ether	Amersham, Deutschland
Chol	Cholesterol	Calbiochem, CA, USA
DLPE	1,2-Dilauroyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin	Avanti Polar Lipids, Al, USA
DOPS	1,2-Dioleoyl-*sn*-Glyzero-Phospho-L-Serin	Avanti Polar Lipids, Al, USA
DPPE-PEG$_{2000}$	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Methoxy(Polyethylene glycol)-2000]	Avanti Polar Lipids, Al, USA
DSPC	1,2-Distearoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphocholin	Avanti Polar Lipids, Al, USA
EPC	L-a-Phosphatidylcholin (isoliert aus Hühner-Eigelb)	Lipoid KG, Ludwigshafen
MCC-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[4-(p-maleimidomethyl)cyclohexan-carboxamid]	Avanti Polar Lipids, Al, USA
MPB-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramid]	Avanti Polar Lipids, Al, USA
MPB-PEG-PE	1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Maleimide(Polyethylene Glycol)2000]	Avanti Polar Lipids, Al, USA
NBD-PE	1,2-Dioleoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl)	Avanti Polar Lipids, Al, USA
N-Glut-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-(Glutaryl)	Avanti Polar Lipids, Al, USA
NHS-PEG-PE	1,2-Distearoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-[PEG$_{2000}$-(N-hydroxysuccinimid)]	Shearwater Polymers, Huntsville, AL, USA
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphocholin	Avanti Polar Lipids, Al, USA
Rhodamin-PE	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glyzero-3-Phosphoethanolamin-N-(Lissamin Rhodamin B Sulfonyl)	Avanti Polar Lipids, Al, USA
SM	Sphingomyelin, D-erythro-Sphingosylphosphorylcholin (isoliert aus Kuhmilch)	Avanti Polar Lipids, Al, USA

Tab. 6-3: Die verwendeten liposomalen Bestandteile

6.7.2. Größenbestimmung

Die Größen der Liposomen wurden mittels der Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) bestimmt. Dafür wurde ein Zetasizer 3000 HS verwendet. Um die Justierung des Gerätes zu überprüfen, wurden 102 ± 3 nm große Standard-Polymerpartikel (Nanosphere™ Size Standards, Fa. Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA) verwendet. Die Liposomen wurden mit dem jeweiligen Hydratationsmedium (z. B. PBS) so verdünnt, daß bei der Verwendung der 100 µm Lochblende eine Signalintensität von 50 bis 200 kcounts/Sekunde erreicht wurde. Um dies zu erzielen, wurden standardmäßig 10 µl Liposomen (Gesamtlipidgehalt 10 µmol/ml) mit 990 µl Hydratationsmedium verdünnt. Das zur Verdünnung verwendete Hydratationsmedium wurde durch einen 0,22 µm Sterilfilter gegeben, um die Menge der bei der Messung störenden Verunreinigungen möglichst zu minimieren. Die Messung erfolgte in Polystyrolküvetten bei 25ºC. Bei allen Proben wurde eine Dreifachmessung mit je 10 Einzelmessungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im CONTIN-Modus.
Neben dem Durchmesser der Teilchen, kann der Polydispersitätsindex (PI) mittels einer Kumulanten-Analyse ermittelt werden. Dieser Wert ist ein Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung.

6.7.3. Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential der Liposomen wurde mittels der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Dazu wurde ein Malvern Zetasizer 3000 HS benutzt. Um die Geräteeinstellungen zu überprüfen, wurde eine Standardlösung (Zetapotential Transfer Standard DTS0050, Fa. Malvern Instruments) mit einem Zetapotential von -50 ± 5 mV verwendet. Vor jeder Messung wurde die Meßzelle zuerst je dreimal mit 50 ml bidestilliertem Wasser und 50 ml 70%-igem Isopropylalkohol gespült, direkt vor der Injektion der Probe schloß sich noch ein dreimaliger Spülvorgang mit je 50 ml des Hydratationsmediums an. Die Liposomen (Gesamtlipidgehalt 10 µmol/ml) wurden in einem Verhältnis von 1:20 mit dem jeweiligen Hydratationsmedium verdünnt. Zur Messung wurden 2 ml der Probe, um Luftblasen zu vermeiden möglichst langsam und gleichmäßig, in die Meßzelle injiziert. Die Signalintensität

lag so bei 2700 bis 3000 Kcounts/Sekunde. Die Messungen wurden bei 25ºC durchgeführt und als Ergebnis der Mittelwert von 10 Einzelmessungen angegeben.

6.7.4. Rasterkraftmikroskopie

Um Liposomen zu visualisieren und deren Struktur zu analysieren, wurde die Rasterkraftmikroskopie (**A**tomic **F**orce **M**icroscopy = AFM) verwendet. Bei dieser Methode wird die Oberfläche einer Probe mit einer feinen Spitze mechanisch abgetastet, wobei eine topographische Karte der Probenoberfläche erstellt wird. Die Aufnahmen wurden von Herrn Prof. Bakowsky, Philipps-Universität Marburg, erzeugt. Hierzu wurden kleine Volumina der Liposomenpräparationen auf einen Silicium-Chip aufgebracht. Die Messungen wurden mit einem vibrationsgedämpften Digital Nanoscope IV Bioscope (Fa. Veeco Instruments, Santa Barbara, USA) durchgeführt. Es wurden pyramidale Si_3N_4 Nadeln, befestigt an einem Ausleger von 125 µm Länge, verwendet. Bei den Messungen, die im so genannten Tapping Modus durchgeführt wurden, betrug die Resonanzfrequenz ca. 220 kHz und die nominelle Kraftkonstante 36 N/m. Die Scan Geschwindigkeit war proportional zur Größe der gescannten Fläche, die Scan Frequenz betrug zwischen 0,5 und 1,5 Hz. Die Bildgewinnung erfolgte, indem das Amplitudensignal des Auslegers auf dem Hin- und das Amplitudensignal auf dem Rückweg gezeigt wurde. Beide Signale wurden simultan aufgezeichnet.

6.7.5. Bestimmung des Phospholipidgehaltes

Die Bestimmung des Phospholipidgehaltes der Liposomen erfolgte mittels des Bartlett-Tests. Dabei wird das in Phospholipiden (100 µl der 1:100 verdünnten Proben) enthaltene Phosphat mittels einer 70%-igen Perchlorsäurelösung (200 µl) bei einer Temparatur von 190ºC über einen Zeitraum von 45 min in anorganisches Phosphat umgewandelt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde den Proben ein Molybdat- Schwefelsäurereagenz und 10%-ige Ascorbinsäure als Reduktionsmittel hinzugefügt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation im Wasserbad bei 100ºC. Dabei bildete sich ein blauer Farbkomplex, über den photometrisch bei 750 nm nach Abkühlung auf Raumtemperatur der Gehalt mittels einer Eichgeraden bestimmt werden konnte. Für die Erzeugung der Eichgeraden wurde eine DLPE Stammlösung

(10 nmol/µl in Chloroform) verwendet. Dieser entspricht dem Gehalt an Phospholipiden in der Probe. Der Gehalt von anderen liposomalen Bestandteilen, z. B. der von Cholesterol, kann durch proportionale Hochrechnungen abgeschätzt werden. Bei dieser Methode darf PBS nicht als liposomales Hydratationsmedium verwendet werden, da ansonsten auch das im Puffer enthaltene Phosphat mitbestimmt würde.

Molybdat-Reagenz: 2,2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ x 4 H_2O
14,3 ml H_2SO_4 konz
ad 1l H_2O

6.7.6. Beladung von Liposomen

Es besteht die Möglichkeit hydrophile und lipophile Substanzen in Liposomen zu verpacken: Hydrophile Substanzen lagern sich dabei in das wässrige Innere oder in die wässrigen Zwischenräume von multilamellaren Liposomen ein. Dagegen findet man lipophile Substanzen zwischen den hydrophoben Bestandteilen der Doppelschichten. In dieser Arbeit wurden die direkte Hydratisierung und das Remote-Loading-Verfahren für die Verpackung von hydrophilen Substanzen verwendet.

6.7.6.1. Beladung der Liposomen mittels Remote-Loading

Für *in vitro*- und *in vivo*-Versuche wurden die Liposomen mit dem schwach basischen Zytostatikum Doxorubizin (Fa. Sigma-Aldrich) mittels des Remote-Loading-Verfahrens (Mayer et al., 1986) beladen. Um dieses zu erreichen, wurden die Liposomen routinemäßig mit einem Gesamtlipidgehalt von 50 µmol/ml in 300 mM Citratpuffer pH 4.0 hydratisiert und extrudiert (siehe 6.7.1.). Davon wurden 200 µl mit 200 µl PBS in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß verdünnt und der pH-Wert des äußeren Milieus wurde durch Zugabe von Natronlauge (0,2 M) auf ca. pH 7,5 erhöht. Zuerst wurden diese Liposomen für 5 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 2 µmol in Wasser gelöstes Doxorubizin-hydrochlorid hinzugefügt und 15 Minuten bei 60°C inkubiert, wobei der Ansatz, der ein Gesamtvolumen von 1 ml aufwies, zweimal kurz gevortext wurde. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Abtrennung von nicht-inkorporiertem Doxorubizin:

Für in vitro-Versuche wurde das nicht verkapselte Doxorubizin mittels der Größenausschlußchromatographie (Sephadex G-25) abgetrennt. Für *in vivo*-Versuche erfolgte die Abtrennung mittels Vivaspins®. Dazu wurden die Liposomen für zweimal 10 Minuten in 2 ml Vivaspins® (MWCO 10000) bei 2200 rpm (Kühlzentrifuge J-6M/E, Fa. Beckmann, München) zentrifugiert. Danach wurde das Volumen mit PBS wieder auf 1 ml aufgefüllt.

6.7.6.2. Passive Beladung

Bei diesem Verfahren werden die Substanzen vor der Hydratation des Lipidfilms im Hydratationsmedium gelöst. Um Liposomen mit dem Zytostatikum Cytarabin (Fa. Sigma-Aldrich) zu beladen, wurde dieses im Hydratationsmedium PBS in einer Konzentration von 100 mg/ml gelöst. Damit wurden Liposomen in einer Konzentration von 10, 20, 40, 80 und 120 µmol Gesamtlipid/ml Hydratationsmedium erzeugt. Das nicht verkapselte Cytarabin wurde mittels Dialyse (MWCO 10000) bei 4ºC über Nacht abgetrennt.
Des weiteren wurden mit dieser Methode die Modell-Substanzen FITC-Dextran (Mr = 4400, 10 mM in PBS, Fa. Sigma-Aldrich) und Carboxyfluorescein (100 mM in PBS, Fa. Sigma-Aldrich) ebenfalls im Hydratationsmedium gelöst (Torchilin und Weissig, 2002) und der Lipidfilm bei der Erzeugung der Liposomen hydratisiert (siehe 6.7.1.). Die Abtrennung der nicht verkapselten Stoffe erfolgte hier gelchromatographisch mittels Sephadex G-25 (siehe 6.7.7.).

6.7.7. Größenausschlußchromatographie

Um nicht in Liposomen eingeschlossene freie Substanzen von liposomal verpackten oder unkonjugierte Liganden von an Liposomen gekoppelte abzutrennen, wurde die Größenausschlußchromatographie eingesetzt. Um Antikörperfragmente und Proteine abzutrennen, wurde Sepharose 4B verwendet. FITC-Dextran, Carboxyfluorescein, Doxorubizin, FITC, Fluorescein-Maleimid, SAMSA-Fluorescein, TCEP und Peptide wurden mittels Sephadex G-25 coarse gelchromatographisch gereinigt.
Die bereits vorgequollene Sepharose 4B wurde zunächst im jeweiligen liposomalen Hydratationsmedium verdünnt und in einem Ultraschall-Bad mindestens über 1 Stunde entgast.

Das pulverförmige Sephadex G-25 wurde zuerst für mindestens 4 Stunden im jeweiligen Hydratationsmedium gequollen. Danach schloß sich ebenfalls eine Entgasung mittels Ultraschall über 1 Stunde an. Die entgasten Säulenmaterialien wurden anschließend vorsichtig und ohne Blasenbildung ca. 10 cm hoch in Biorad Econo® Säulen (0,7 x 10 cm) gegossen und anschließend mit mindestens 200 ml Hydratationsmedium gewaschen und equilibriert. Die Proben wurden tropfenweise auf das obere Gelbett pipettiert. Erst nach dem vollständigen Einlaufen der Probe in die Säulengelmatrix wurde mit der Elution mit Hydratationsmedium begonnen. Die liposomalen Fraktionen wurden visuell auf Grund ihrer Trübung bzw. Färbung detektiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen.

6.7.8. Gehaltsbestimmung von Doxorubizin

Um das liposomal verkapselte Doxorubizin zu quantifizieren wurden 10 µl der jeweiligen Liposomenpräparation mit 80 µl Hydratationsmedium und 10 µl 20%-igem Triton-X in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß versetzt, ca. 2 min bei 60ºC im Heizblock erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Diese Proben wurden in einer 96-well Platte bei 490 nm in einem Mikroplattenleser photometrisch vermessen. Die Gehaltsbestimmung erfolgte über eine Eichgerade.

6.7.9. Gehaltsbestimmung von Cytarabin

Zuerst wurden die Cytarabin-haltigen Liposomen mit 20%-igem Triton-X verdünnt und diese Lösung wurde mittels HPLC analysiert. Als Säule wurde eine Phenomenex Synergi 4µ Hydro RP 80Å 250 x 4,6 mm benutzt und als Fließmittel wurde ein Phosphat-Puffer (10 mM, pH 3)/ Methanol Gemisch in einem Verhältnis von 97:3 verwendet. Die Analyse erfolgte unter isokratischen Bedingungen über einen Zeitraum von 10 Minuten. Die Retentionszeit betrug für das Cytarabin ca. 6,3 Minuten. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 270 nm mittels eines PDA Detektors und die Gehaltsbestimmung über eine Eichgerade.

6.8. Methoden zur Modifikation von Liposomen mit Liganden

Liganden können entweder an spezielle Lipide, die in die liposomale Membran integriert sind, an bestehende Liposomen gekoppelt werden oder sie können zuerst an einen Lipidanker gekoppelt werden und dann als Konjugate in die Liposomen eingebaut werden.

6.8.1. Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung unter Verwendung von N-Glut-PE

Für die Kopplung von Antikörperfragmenten und Peptiden an N-Glut-PE wurden Liposomen hergestellt (siehe 6.7.1.), die 10 mol% dieses Ankerlipids enthielten. Die Carboxylgruppe wurde durch Zugabe von 9,1 µmol EDC pro 0,2 µmol N-Glut-PE und einer fünfstündigen Inkubation bei Raumtemperatur aktiviert (Ezpeleta et al., 1996). Anschließend wurde das zu koppelnde Antikörperfragment (1 - 4 nmol) bzw. Peptid (100 nmol) zugegeben und über 12 Stunden erneut bei Raumtemperatur schüttelnd (IKA-Vibrax) inkubiert. Danach wurden freie, unkonjugierte Antikörperfragmente gelchromatographisch mittels Sepharose 4B bzw. Peptide mittels Sephadex G-25 abgetrennt (siehe 6.7.7.).

6.8.2. Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung unter Verwendung von NHS-PEG-PE

Bei dieser Methode wurden 10 mol% des Kopplungslipids NHS-PEG_{2000}-DSPE in Liposomen (siehe 6.7.1.) eingebaut. Aus Stabilitätsgründen wurde der pH des Hydratationsmediums (PBS) auf einen Wert von ca. 6 eingestellt. Direkt vor der Zugabe des Proteins zu den Liposomen, wurde der pH mittels Natronlauge (0,2 M) auf einen Wert von ca. 8 angehoben. Danach erfolgte die Zugabe des Proteins (50 µg Protein/µmol Gesamtlipid). Die Kopplung wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Nach Inkubation über 12 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte eine gelchromatographische Reinigung der gekoppelten Liposomen von dem unkonjugierten Protein (Sepharose 4B) (siehe 6.7.7.).

6.8.3. Kopplung von Fluorescein-Isothiocyanat an Proteine

Um zu überprüfen, ob ein Protein über aktive Aminogruppen für diese Kopplungsreaktion verfügt, wurden die EGF´s mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) in einem 25-fachen molaren Überschuß versetzt. Bei dieser Reaktion, die in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt wurde, wurde der pH mittels 1 M Carbonatpuffers auf einen Wert von ca. 9 eingestellt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4ºC. Danach wurden die Konjugate von freiem FITC gelchromatographisch mittels einer Sephadex G-25 Säule abgetrennt (siehe 6.7.7.) und die Fluoreszenzintensitäten wurden mittels des Spektrophotometers LS 55 bestimmt.

6.8.4. Kopplung über eine Thioetherbindung

Für die Kopplung von Antikörperfragmenten an MPB-PE bzw. MCC-PE mußten diese Antikörperfragmente zunächst auf DNA-Ebene so verändert werden, daß ein C-terminaler Cystein-Rest vorlag. Nach der Reinigung dieser scFv-Fragmente aus dem Periplasma von Bakterien wurden die Dimere durch Zugabe des „Bond-Breaker´s“ TCEP (2 mM; Fa. Pierce, Bonn) reduziert, so daß der Cystein-Rest frei vorlag. Da die scFv-Fragmente ohne eine vorherige Abtrennung nicht an Maleimid-haltige Liposomen gekoppelt werden konnten, wurde eine Gelfiltration des Proteins über Sephadex G-25 durchgeführt. Anschließend wurde standardmäßig ca. 1 nmol Antikörperfragment mit 100 µl Maleimid-haltigen Liposomen versetzt und unter Argon über 12 Stunden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur inkubiert.
Die nicht-gekoppelten Maleimid-Gruppen wurden durch Reaktion mit Cystein abreagiert. Dazu wurde 1/20 Volumen einer 10 mM Cystein-Lösung in PBS zupipettiert, so daß eine Endkonzentration von 0,5 mM Cystein im Reaktionsansatz vorlag. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation mit Cystein wurden die Liposomen von unkonjugierten Antikörperfragmenten mittels Gelfiltration über Sepharose 4B (siehe 6.7.7.) gereinigt.

6.8.5. Nachweis der Kopplung

Die Kopplung von scFv-Fragmenten an Maleimid-haltige Liposomen wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot überprüft (siehe 6.6.3. - 6.6.5.) Dazu wurden die Immunliposomen vor und nach der gelchromatographischen Reinigung mit SDS denaturiert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

6.8.5.1. Kopplung von SAMSA zur Überprüfung der Aktivität der Maleimid-Gruppen

Um die Reaktivität der Maleimid-Gruppe in den einzelnen Liposomenformulierungen überprüfen zu können, wurden Liposomen ohne Fluoreszenzmarkierung hergestellt. 1 mg SAMSA-Reagenz wurde abgewogen und durch Zugabe von 100 µl 0,1 M Natronlauge aktiviert. Nach einer 15minütigen Inkubation wurde der Ansatz mit 1,4 µl 6 M Salzsäure neutralisiert. Anschließend wurden 20 µl 0,5 M Natrium-Phosphatpuffer, pH 7.0 zugegeben. Die Maleimid-haltigen Liposomen wurden mit einem 5-fachen molaren Überschuß an aktiviertem SAMSA versetzt. Dazu wurden 50 µl Liposomen à 10 µmol Gesamtlipid/ml, die 10% MPB-PE enthielten, mit 500 nmol aktiviertem SAMSA gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurden die Liposomen von ungebundenem SAMSA durch Gelfiltration (Sephadex G-25) gereinigt (siehe 6.7.7.) und im Fluoreszenz-Spektrophotometer bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und Emissionswellenlänge von 520 nm vermessen.

6.8.5.2. Kopplung von Fluorescein-Maleimid an scFv-Fragmente

Um zu überprüfen, ob die derivatisierten scFv-Fragmente über eine aktive Thiolgruppe verfügten, wurden diese mit Fluorescein-Maleimid in einem 25-fachen molaren Überschuß versetzt. Die Inkubation erfolgte über 12 Stunden bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß unter einer Argonatmosphäre. Danach wurden unkonjugierte Fluorescein-Maleimid Moleküle von den markierten scFv-Fragmenten gelchromatographisch mittels einer

Sephadex G-25 Säule abgetrennt (siehe 6.7.7). Die Fluoreszenz der Proben wurde mittels des Spektrophotometers LS 55 (Perkin Elmer) gemessen (Anregungswellenlänge: 495 nm, Emissionswellenlänge: 520 nm).

6.8.6. Einbau von Lipopeptiden in Liposomen

Bei dieser Methode wurde zuerst ein Peptid an ein Lipid gekoppelt. Dieses Lipopeptid wurde in einem 1:1 Gemisch aus Chloroform und Methanol gelöst und es wurde daraus zusammen mit den übrigen in organischen Lösungsmitteln gelösten Liposomenbestandteilen ein Lipidfilm gebildet und hydratisiert.

6.9. Bindungs- und Aufnahmestudien

Die Bindungsstudien wurden mittels FACS und dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, für die Aufnahmestudien wurde das Fluoreszenzmikroskop verwendet. Für diese Versuche wurden in die leeren Liposomen standardmäßig entweder 0,3 mol% Rhodamin-PE oder NBD-PE eingebaut. Bei einigen Versuchen wurden doppelt markierte Liposomen, die im Inneren Carboxyfluorescein (siehe 6.7.6.2.) und in der Membran Rhodamin-PE enthielten, verwendet. Bei den mit Doxorubizin beladenen Liposomen erfolgte die Detektion über dessen Fluoreszenz. Standardmäßig wurde pro Ansatz 50 nmol Lipid verwendet.

6.9.1. Bindungsstudien mittels FACS

Zur Kontrolle der Bindung gekoppelter Liposomen wurden die Ziel- und Kontrollzellen mit 0,2 mg/ml EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst, gewaschen und anschließend ausgezählt. Pro Bedingung wurden 200000 Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 100 µl Medium aufgenommen, bevor die Liposomen zupipettiert wurden. Von jeder Liposomenformulierung wurden ca. 50 nmol Gesamtlipid zugegeben und

im Wasserbad bei 4ºC im Kaltraum eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 2 ml FACS-Waschpuffer (PBS, 1% BSA, 0,1% NaN_3) gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden vor der Auswertung nicht fixiert und anschließend erfolgte die Auswertung im FACS. Es wurden mindestens 10000 Zellen analysiert.

FACS-Wasch-Puffer:	1% BSA und 0,1% NaN_3 in PBS
FACS-Block-Puffer:	1% BSA und 10% humanes Serum in PBS

6.9.2. Bindungs- und Aufnahmestudien mittels Fluoreszenzmikroskop

Für die Bindungs- und Internalisierungsstudien wurden ca. 200000 Zellen pro Deckgläschen am Vortag der fluoreszenzmikroskopischen Studien pro Deckgläschen, die vorher mit Ethanol abgeflammt wurden, ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit kaltem PBS gewaschen und standardmäßig mit 50 nmol Gesamtlipid in 500 µl Medium inkubiert. Für die Bindungsstudien, die bei 4ºC im Wasserbad durchgeführt wurden, betrug die Inkubationszeit routinemäßig 1 Stunde und variierte zwischen 15 Minuten und 24 Stunden bei den Aufnahmestudien, die Temperatur im Brutschrank betrug hierbei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 4%-igem Formaldehyd in PBS für 20 Minuten fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit H_2O wurden die Zellen mit Mowiol eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

6.9.3. Aufnahmestudien mittels Bafilomycin A1

Um den Aufnahmemechanismus von zielgerichteten Liposomen genauer zu untersuchen, wurden Studien mit Bafilomycin A1 (Fa. Sigma-Aldrich) durchgeführt. Dieses wurde in DMSO gelöst und zuerst für 30 min bei 37ºC mit Zellen (Endkonzentration 300 nM in 500 µl Medium, die Stoffmenge an Bafilomycin wurde in 0,5 µl DMSO gelöst) inkubiert. Nach dem Waschen mit kaltem PBS erfolgte die gleichzeitige Inkubation der Liposomen mit Bafilomycin über verschiedene Zeiträume wiederum in 500 µl Medium. Danach wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (siehe 6.9.2.).

6.9.4. Kompetitionsexperimente

Um zu untersuchen, ob die Bindung der zielgerichteten Liposomen spezifisch über den jeweiligen Liganden vermittelt wurde, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden je 200000 Zellen zuerst bei 4ºC für 30 min mit freien und unmarkierten scFv-Fragmenten (50-facher molarer Überschuß), Proteinen (50-facher Überschuß) oder Peptiden (200-facher molarer Überschuß) inkubiert. Danach wurden jeweils fluoreszenzmarkierte zielgerichtete Liposomen derselben Spezifität für weitere 30 min hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte im FACS (siehe 6.9.1.)

6.10. Zytotoxizitätstests (Kristallviolett-Test)

Bei dieser Methode handelt es sich um einen Test, bei dem die Überlebensrate von adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen (in dieser Arbeit wurden freie Zytostatika, liposomal verpackte Zytostatika und leere Liposomen verwendet) gemessen werden kann. Um möglichst viele verschiedene Konzentrationen gleichzeitig messen zu können, werden diese Tests in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt.
Zellen, die durch die Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen getötet wurden, lösen sich von der Platte ab, während die noch auf der Platte heftenden, lebenden Zellen mit Kristallviolett angefärbt werden. Die Menge an Kristallviolett kann photometrisch bestimmt und daraus der IC-50 Wert ermittelt werden. Für die Zytotoxizitätstests wurden die Zellen mit Trypsin von den Kulturschalen abgelöst, ausgezählt und anschließend 10000 Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung von 96-well Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde eine Verdünnungsreihe des Chemotherapeutikums bzw. der Liposomen hergestellt und auf die Zellen pipettiert, nachdem das Medium abgesaugt wurde. Pro Vertiefung wurden 150 µl Testmedium zugegeben und die Inkubation erfolgte bei 37ºC. Nach zwei Stunden wurde das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit frischem Medium versetzt und für weitere 22 bzw. 46 Stunden bei 37ºC inkubiert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden 80 µl Kristallviolett-Lösung (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol in H_2O) pro Vertiefung pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten intensiv mit Leitungswasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die Extinktion wurde im Photometer bei 540 nm gemessen, der IC-50 Wert wurde graphisch ermittelt.

6.11. Tierexperimente

Die *in vivo*-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Tierarzt S. Hoffmann (vectron therapeutics AG) durchgeführt.

6.11.1. Haltung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden immuninkompetente Nacktmäuse (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 20-30 g verwendet. Diese wurden bei einer Raumtemperatur von 28ºC, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Als Nahrung erhielten die Versuchstiere pelletiertes Futter Altromin 1324 (Fa. Altromin, Lage) und zum Trinken Wasser.

6.11.2. Tumorregressionsstudien

Bei diesen Studien sollte untersucht werden, wie sich freie und liposomal verpackte Zytostatika (Doxorubizin und Cytarabin) auf das Tumorwachstum auswirken. Hierzu wurden den Mäusen ca. eine Woche vor Versuchsbeginn ca. 500000 C26 Tumorzellen in 300 µl Zellkulturmedium DMEM intradermal in die seitliche Rückenflanke injiziert. Sobald die Tumore eine Größe von etwa 3-5 mm x 3-5 mm aufwiesen, wurde mit der Behandlung begonnen. An den Tagen 0, 2 und 5 bzw. 1, 3 und 6 wurden den weiblichen Tieren, die in Gruppen von je 5 Mäusen gehalten wurden, die steril-filtrierten Formulierungen intravenös in die seitlichen Schwanzvenen injiziert. Die Tumorgrößen wurden alle ein bis zwei Tage gemessen. Das Tumorvolumen wurde nach folgender Formel errechnet:

$$V = (LxB^2) / 2$$

V = Tumorvolumen (mm^3)
B = größte Breite des Tumors (in mm)
L = größte Länge des Tumors (in mm)

Zur statistischen Auswertung der erfaßten und normalverteilten Datensätze (Tumorvolumen in mm^3) bei den Tumorregressionsstudien wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test nach Student verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde vor Versuchsbeginn auf p=0,05 festgelegt.

6.11.3. Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zur Organverteilung

Für diese Studien wurde radioaktiver ^3H Cholesteryl-oleoyl-ether in die Liposomen eingebaut. Es wurde je Maus 1000 nmol Gesamtlipid, entsprechend 10 µCi, in einem Gesamtvolumen von 300 µl intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach genau festgelegten Zeitpunkten wurden retrobulbär Blutproben entnommen und deren Volumina bestimmt. Die Proben wurden nicht aus der Schwanzvene entnommen, um ein falsches Ergebnis durch verbliebene Aktivität an der Injektionsstelle zu vermeiden.

Nach Tötung der Mäuse mittels Genickbruch erfolgte die Präparation der einzelnen zu untersuchenden Gewebe. Die Organe wurden gewogen und je ca. 200-250 mg wurden in 20 ml Szintillationsgefäße eingewogen. Die Proben wurden bei 60ºC über Nacht mittels 70%-iger Perchlorsäure solubilisiert und mittels 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung entfärbt. Danach wurden die Proben mit Eisessig versetzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 10 ml Aquasol-2 Flüssigszintillationscocktail (Fa. Perkin Elmer, Jügesheim) versetzt und gevortext.

Die Radioaktivität wurde im ^3H Fenster eines LS 6500 Beta-Flüssigzintillationzählers bestimmt. Die gemessenen Radioaktivitäten wurden auf das Gesamtgewicht des jeweiligen Organs bezogen und als prozentualer Anteil der insgesamt in die jeweilige Maus injizierte Menge ausgewiesen.

7. Literaturverzeichnis

Adam PJ, Clesham GJ und Weissberg PL (1998): Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 33 – 37

Adler-Moore J (1994): AmBisome targeting to fungal infections. *Bone Marrow Transplant* 14: 3 – 7

Aina OH, Sroka TC, Chen ML und Lam KS (2002): Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* 66: 184 – 199

Allen TM und Chonn A (1987): Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* 223: 42 – 46

Allen TM, Hansen C und Rutledge J (1989): Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 981: 27 – 35

Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C und Yau-Young A (1991): Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1066: 29 – 36

Allen TM (1994): Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol Sci* 15: 215 – 220

Allen TM, Ahmad I, Lopes de Menzes DE und Moase EH (1995): Immunoliposome-mediated targeting of anti-cancer drugs in vivo. *Biochem Soc Trans* 23: 1073 – 1079

Allen TM (1998): Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect for the future. *Drugs* 56: 747 – 756

Allison AC und Gregoriadis G (1974): Liposomes as immunolocical adjuvants. *Nature* 252: 252

Alving CR (1987): Liposomes as carriers for vaccines. In: Ostro MJ (ed): *Liposomes from Biophysics to Therapeutics. Dekker New York:* 195 – 218

Arap W, Pasqualini R und Ruoslahti E (1998): Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279: 377 – 380

Assa-Munt N, Jia X, Laakkonen P und Ruoslahti E (1997): Solution structures and integrin binding activities of an RGD peptide with two isomers. *Biochemistry* 40, 2373 – 2378

Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J und Wrana JL (1993): Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75: 671 – 680

Augustin HG (1998): Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 19: 216 – 222

Bach M (2002): Isolierung Tumor- und Endothelzell-spezifischer Liganden für eine optimierte Kopplung an liposomale Trägersysteme. *Diplomarbeit, Philipps-Universtät Marburg*

Bach M, Hölig P, Schlosser E, Völkel, T, Graser A, Müller R und Kontermann RE (2003): Isolation from phage display libraries of lysine-deficient human epidermal growth factor variants for directional conjugation as targeting ligands. *Protein Eng* 16: 1107 – 1113

Bangham AD, Standish MM und Watkins JC (1965): Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13: 238 – 252

Bangham AD (1968): Membrane models with phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol* 18: 29 – 95

Baselga J (2001): Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol* 19: 41 – 44

Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D und Fuchs R (1998): Effects of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* 72: 9645 – 9655

Becker N und Wahrendorf J (1998): Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. *Springer-Verlag, Heidelberg*

Bendas G, Krause A, Schmidt R, Vogel J und Rothe U (1998): Selectins as new targets for immunoliposome-mediated drug delivery. A potential way of anti-inflammatory therapy. *Pharm Acta Helv* 73: 19 – 26

Bendas G (2000): Beiträge zu neuartigen antiinflammatorischen Therapieansätzen durch die pharmazeutische Ausnutzung von Selektinen. *Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle*

Bendas G, Rothe U, Scherphof GL und Kamps JAAM (2003): The influence of repeated injections on pharmacokinetics and biodistribution of different types of sterically stabilized immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 1609: 63 – 70

Better M, Chang CP, Robinson RR und Horwitz AH (1988): Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240: 1041 – 1043

Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS und Whitlow M (1988): Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242: 423 – 426

Blessing T, Kursa M, Holzhauser R, Kircheis R und Wagner E (2001): Different strategies for formation of PEGylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* 12: 529 – 537

Blume G, Cevc G, Crommelin MD, Bakker-Woudenberg IA, Kluft C und Storm G (1993): Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim Biophys Acta* 1149: 180 – 184

Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE und Kaiser HE (1998): Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization. *Anticancer Res* 18: 3621 – 3628

Boeckler C, Frisch B, Muller S und Schuber F (1996): Immunogenicity of new heterobifunctional cross-linking reagents used in the conjugation of synthetic peptides to liposomes. *J Immunol Methods* 191: 1 – 10

Bogdanov AA Jr, Klibanov AL und Torchilin VP (1988): Protein immobilization on the surface of liposomes via carbodiimide activation in the presence of N-hydroxysulfosuccinimide. *FEBS Lett* 231: 381 – 384

Bohl Kullberg E, Bergstrand N, Carlsson J, Edwards K, Johnsson M, Sjöberg S und Gedda L (2002): Development of EGF-conjugated liposomes for targeted delivery of boronated DNA-binding agents. *Bioconjug Chem* 13: 737 – 743

Bohl Kullberg E, Nestor M und Gedda L (2003): Tumor-Cell targeted epidermal growth factor liposomes loaded with boronated acridine: Uptake and processing. *Pharm Res* 20: 229 – 236

Bolwell BJ, Cassileth PA und Gale RP (1988): High dose cytarabine: a review. *Leukemia* 2: 253 – 260

Bonnekoh B, Wevers A, Jugert F, Merk H und Mahrle G (1989): Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. *Arch Dermatol Res* 281: 487 – 90.

Brahimi-Horn C, Berra E und Pouyssegur J (2001): Hypoxia: The tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* 11: 32 – 36

Brüggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, Waldmann H und Neuberger MS (1987): Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 166: 1351 – 1361

Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES und Thorpe PE (1995): Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1: 1623 – 1634

Cabrera T, Lopez-Nevot MA, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F und Garrido F (2003): Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother* 52: 1– 9

Carpenter G und Cohen S (1990): Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 265: 7709 – 7712

Carrel S, Zografos L, Schreyer M und Rimoldi D (1993): Expression of CALLA / CD10 on human melanoma cells. *Melanoma Res* 3: 319 – 323

Carter P und Merchant AM (1997): Engineered antibodies for imaging and therapy. *Curr Opin Biotechnol* 8: 449 – 454

Chen P, Mrkobrada M, Vallis KA, Cameron R, Sandhu J, Hendler A und Reilly RM (2002): Comparative antiproliferative effects of (111)In-DTPA-hEGF, chemotherapeutic agents and gamma-radiation on EGFR-positive breast cancer cells. *Nucl Med Biol* 29: 693 – 699

Cherny RC, Honan MA und Thiagarajan P (1993): Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid in vitronectin abolishes cell adhesion. *J Biol Chem* 268: 9725 – 9729

Chonn A, Cullis PR und Devine DV (1991): The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* 146: 4234 – 4241

Ciardiello F und Tortora G (2001): A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7: 2958 – 2970

Coleman L und Mahler SM (2003): Purification of Fab' fragments from a monoclonal antibody papain digest by gradiflow electrophoresis. *Protein Expr Purif* 32: 246 – 251

Coney LR, Tomassetti A, Carayannopoulos L, Frasca V, Kamen BA, Colnaghi MI und Zurawski VR Jr (1991): Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Res* 51: 6125 – 6132

Conforti G, Dominguez-Jimenez C, Zanetti A, Gimbrone MA, Cremona O, Marchisio PC und Dejana E (1992): Human endothelial cells express integrin receptors on the liminal aspect of their membrane. *Blood* 80: 437 – 446

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J und Francke U (1985): Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogenes. *Science* 230: 1132 – 1139

Coussens LM, Fingleton B und Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387 – 2392

Damle NK und Frost P (2003): Antibody-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin. *Curr Opin Pharmacol* 3: 386 – 390

Dawn G und MacKie RM (2002): Expression of endoglin in human melanocytic lesions. *Clin Exp Dermatol* 27: 153 – 156

de Kruif J, Storm G, van Bloois L und Logtenberg T (1996): Biosynthetically lipid-modified human scFv fragments from phage display libraries as targeting molecules for immunoliposomes. *FEBS Lett* 399: 232 – 236

Demirovic AR, Marty C, Console S, Zeisberger SM, Ruch C, Jaussi R, Schwendener RA und Ballmer-Hofer K (2005): Targeting human cancer cells with VEGF receptor-2-directed liposomes. *Oncol Rep* 13: 319 – 324.

Dempke W, Rie C, Grothey A und Schmoll HJ (2001): Cylooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 411 – 417

Derksen JT, Morselt HW und Scherphof GL (1988): Uptake and processing of immunoglobulin-coated liposomes by subpopulations of rat liver macrophages. *Biochim Biophys Acta* 971: 127 – 136

Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB und Papahadjopoulos D (1999): Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 51: 691 – 743

Dubey PK, Mishra V, Jain S, Mahor S und Vyas SP (2004): Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. *J Drug Target* 12: 257 – 264

Duff SE, Li C, Garland JM und Kumar S (2003): CD 105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17: 984 – 992

El-Rayes BF und LoRusso PM (2004): Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 9: 418 – 424

Emens LA und Davidson NE (2004): Trastuzumab in breast cancer. *Oncology* 18: 1117 – 1128

Endoh H, Suzuki Y und Hashimoto Y (1981): Antibody coating of liposomes with 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide and the effect on target specificity. *J Immunol Methods* 44: 79 – 85

Engel A (1999): Wechselwirkungen glykosylierter Liposomen mit humanen phagozytierenden Zellen. *Dissertation, Martin-Luthe-Universität Halle*

Ezpeleta I, Irache JM, Stainmesse S, Chabenat C, Gueguen J und Orecchioni AM (1996): Preparation of lectin-vicilin nanoparticle conjugates using the carbodiimide coupling technique. *Int J Pharm* 142: 227 – 233

Fahr A, Müller K, Nahde T, Müller R und Brüsselbach S (2002): A new colloidal lipidic system for gene therapy. *J Liposome Res* 12: 37 – 44

Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M und Felgner PL (1994): Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 269: 2550 – 2561

Firestone RA, Willner D, Hofstead SJ, King HD, Kaneko T, Braslawsky GR, Greenfield RS, Trail PA, Lasch SJ, Henderson AJ, Casazza AM, Hellström I und Hellström KE (1996): Synthesis and antitumor activity of the immunoconjugate BR-96 Dox. *J Control Release* 39: 251

Fleiner M, Benzinger P, Fichert T und Massing U (2001): Studies on protein - liposome coupling using novel thiol-reactive coupling lipids: Influence of spacer length and polarity. *Bioconjug Chem* 12: 470 – 475

Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182 – 1186

Folkman J (2004): Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 112: 496 – 507

Forth W, Henschler D, Rummel W und Starke K (1996): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*

French AR, Tadaki DK, Niyogi SK und Lauffenburger DA (1995): Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem* 270: 4334 – 4340.

Frodin JE, Lefvert AK und Mellstedt H (1992): The clinical significance of HAMA in patients treated with mouse monoclonal antibodies. *Cell Biophys* 21: 153 – 165

Gabizon A und Papahadjopoulos D (1988): Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6949 – 6953

Gabizon A, Price DC, Huberty J, Bresalier RS und Papahadjopoulos (1990): Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: biodistribution and imaging studies. *Cancer Res* 50: 6371 – 6378

Gabizon A, Isacson R, Libson E, Kaufmann B, Uziely B, Catane R, Ben-Dor CG, Rabello E, Cass Y, und Peretz T (1994): Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta Oncol* 33: 779 – 786

Ganapathi R, Krishan A, Wodinsky I, Gordon Zubrod C und Lesko LJ (1980): Effect of cholesterol content on antitumor activity and toxicity of liposome-encapsulated 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine in vivo. *Cancer Res* 40: 630 – 633

Ge AZ und Butcher EC (1994): Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand. *Gene* 138: 201 – 206

Gehlsen KR, Argraves WS, Pierschbacher MD und Ruoslahti E (1988): Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. *J Cell Biol* 106: 925 – 930

Gehlsen KR, Davis GE und Sriramarao P (1992): Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastic properties. *Clin Exp Metastasis* 10: 111 – 120

Gembitsky DS, Bozsó Z, O'Flaharty M, Ötvös F, Murphy RF und Lovas S (2002): A specific binding site for a fragment of the B-loop of epidermal growth factor and related peptides. *Peptides* 23: 97 – 102

Gold P und Goldenberg NA (1998): The carcinoembryonic antigen (CEA): past, present and future. *McGill J Med* 3: 46 – 66

Gougos A und Letarte M (1988): Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-b leukemic cell line. *J Immunol* 141: 1925 – 1933

Gregoriadis G (1974): Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet 1*: 1313 – 1316

Gregoriadis G und Senior J (1980): The phospholipids component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation. *FEBS Lett* 119: 43 – 46

Gregoriadis G (1993): Liposomes, a tale of drug targeting. *J Drug Target* 1: 3 – 6

Gregoriadis G und Florence AT (1993): Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs* 45: 15 – 28

Gregoriadis G (2003): Liposomes in drug and vaccine delivery. *dds&s* 2: 91 – 97

Gutheil J, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ und Cheresh DA (2000): Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. *Clin Cancer Res* 6: 3056 – 3061

Gyongyossy-Issa MI, Mueller W und Devine DV (1998): The covalent coupling of Arg-Gly-Asp-containing peptides to liposomes: purification and biochemical function of the lipopeptide. *Arch Biochem Biophys* 353: 101 – 108

Hakomori S (1992): Tumor-associated carbohydrate markers: chemical and physical basis and cell biological implications. *In: Serological Cancer Marker, Sell S (ed), The Human Press, Totowa, NJ*: 207 – 232

Halin C, Zardi L und Neri D (2001): Antibody-based targeting of angiogenesis. *News Physiol Sci* 16: 191 – 194

Hamada A, Kawaguchi T und Nakano M (2002): Clinical pharmacokinetics of cytarabine formulations. *Clin Pharmacokinet* 41: 705 – 718

Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upeslacis J, Flowers DA und Bernstein I (2002): An anti-CD 33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukaemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem* 13: 40 – 46

Hansen CB, Kao GY, Moase EH, Zalipsky S und Allen TM (1995): Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim Biophys Acta* 1239: 133 – 144

Harada M, Noguchi M und Itoh K (2003): Target molecules in specific immunotherapy against prostate cancer. *Int J Clin Oncol* 8: 193 – 199

Harashima H, Sakata K und Kiwada H (1993): Distinction between the depletion of opsonins and the saturation of uptake in the dose-dependent hepatic uptake of liposomes. *Pharm Res* 10: 606 – 610

Harding JA, Engbers CM, Newman MS, Goldstein NI und Zalipsky S (1997): Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethyleneglycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 1327: 181 – 192

Harvie P, Dutzar B, Galbraith T, Cudmore S, O'Mahony D, Anklesaria P und Paul R (2003): Targeting of lipid-protamine-DNA (LPD) lipopolyplexes using RGD motifs. *J Liposome Res* 13: 231 – 247

Hashida M, Nishikawa M, Yamashita F und Takakura Y (2001): Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 52: 187 – 196

Heath TD, Bragman KS, Matthay KK, Lopez-Straubinger NG und Papahadjopoulos D (1984): Antibody-directed liposomes: the development of a cell-specific cytotoxic agent. *Biochem Soc Trans* 12: 340 – 342

Hellman S und Vokes EE (1996): Fortschritte in der herkömmlichen Krebstherapie. *Spektrum der Wissenschaft, Krebsmedizin, Heidelberg:* 58 – 65

Hermanson GT (1996): Bioconjugate Techniques. *Academic Press, San Diego, California, USA*

Hernandez J und Thompson IM (2004): Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer* 101: 894 – 904

Hölig P, Bach M, Völkel T, Nahde T, Hoffmann S, Müller R und Kontermann RE (2004): Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells. *Protein Eng Des Sel* 17: 433 – 441

Horoszewicz JS, Kawinski E und Murphy GP (1987): Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res* 7: 927 – 935

Huang A, Huang L und Kennel SJ (1980): Monoclonal antibody covalently coupled with fatty acid. A reagent for in-vitro liposome targeting. *J BiolChem* 255: 8015 – 8018

Huang A, Kennel SJ und Huang L (1983): Interactions of immunoliposomes with target cells. *J Biol Chem* 258: 14034 – 14040

Huang SK, Lee KD, Hong K, Friend DS und Papahadjopoulos D (1992): Microscopic localisation of sterically stabilised liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Res* 52: 5135 – 5143

Hynes RO (2002): A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 8: 918 – 921

Iden DL und Allen TM (2001): In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach. *Biochim Biophys Acta* 1513: 207 – 216

Ingaki J, Rodriguez V und Bodey GP (1974): Causes of death in cancer patients. *Cancer* 33: 568 – 572

Ishida T, Kirchmeier MJ, Moase EH, Zalipsky S und Allen TM (2001): Targeted delivery and triggered release of liposomal doxorubicin enhances cytotoxicity against human B lymphoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1515: 144 – 158

Ishii Y, Aramaki Y, Hara T, Tsuchiya S und Fuwa T (1989): Preparation of EGF labelled liposomes and their uptake by hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 732 – 760

Janssen AP, Schiffelers RM, ten Hagen TL, Koning GA, Schraa AJ, Kok RJ, Storm G und Molema G (2003): Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Int J Pharm* 254: 55 – 58

Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Kikuchi K, Ikeda T, Enomoto K und Kitajima M (1996): Epidermal growth factor receptor-dependent cytotoxic effect by an EGF-ribonuclease conjugate on human cancer cell lines – a trial for less immunogenic chimeric toxin. *Cancer Chemother Pharmacol* 38: 303 – 308

Johnson SA (2001): Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother* 2: 929 – 943.

Jones RG und Landon J (2002): Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')(2) fragments in high yield from serum. *J Immunol Methods* 263: 57 – 74

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS und Winter G (1986): Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522 – 525

Juhasz I, Albelda SM, Elder DE, Murphy GF, Adachi K, Herlyn D, Valyi-Nagy IT und Herlyn M (1993): Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* 143: 528 – 537

Juliano RL und Stamp D (1978): Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumor drugs. Studies with vinblastine, actinomycin D, cytosine arabinoside, and daunomycin. *Biochem Pharmacol* 2: 21 – 7

Kamizuru H, Kimura H, Yasukawa T, Tabata Y, Honda Y und Ogura Y (2001): Monoclonal antibody-mediated drug targeting to choroidal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2664 – 2672

Karow T und Lang R (1998): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *F. Hansen, Bergisch-Gladbach*

Keer HN, Kozlowski JM und Tsai MC (1990): Elevated transferring receptor content in human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. *J Urol* 143: 381 – 385

Kessner S, Krause A, Rothe U und Bendas G (2001): Investigation of the cellular uptake of E-selectin-targeted immunoliposomes by activated human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1514: 177 – 190

Kiffmeyer T, Götze HJ und Lüders U (1998): Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius J Anal Chem* 361: 185 – 191

Kikuchi A, Sugaya S, Ueda H, Tanaka K, Aramaki Y, Hara T, Arima H, Tsuchiya S und Fuwa T (1996): Efficient gene transfer to EGF receptor overexpressing cancer cells by means of EGF-labeled cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 666 – 671

Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, Carter P, Benz CC und Papahadjopoulos D (1997): Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 36: 66 – 75

Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP und Huang L (1991): Activity of amphipathic poly ethylene glycol 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavourable for immunoliposome binding to target. *Biochim Biophys Acta* 1062: 142 – 148

Kodadek T, Reddy MM, Olivos HJ, Bachhawat-Sikder K und Alluri PG (2004): Synthetic molecules as antibody replacements. *Acc Chem Res* 37: 711 – 718

Köhler G und Milsten C (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495 – 497

Koivunen E, Wang B und Ruoslahti E (1995): Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology (NY)* 13: 265 – 270

Koller-Lucae SKM, Schott H und Schwendener RA (1997): Pharmacokinetic properties in mice and interactions with human blood in vitro of liposomal N4-octadecyl-1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (NOAC), a new anticancer drug. *J Pharmacol Exptl Therap* 282: 1572 – 1580

Kolonin M, Pasqualini R und Arap W (2001): Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 5: 308 – 313

Kondo M, Asai T, Katanasaka Y, Sadzuka Y, Tsukada H, Ogino K, Taki T, Baba K und Oku N (2004): Anti-neovascular therapy by liposomal drug targeted to membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Int J Cancer* 108: 301 – 306

Koning GA, Fretz MM, Woroniecka U, Storm G und Krijger GC (2004): Targeting liposomes to tumor endothelial cells for neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot* 61: 963 – 967

Kontermann RE und Duebel S Eds. (2001): Antibody Engineering. *Springer Lab Manual, Springer-Verlag, Berlin*

Kornguth SE, Turski PA, Perman WH, Schultz R, Kalinke T, Reale R und Raybaud F (1987): Magnetic resonance imaging of gadolinium-labeled monoclonal antibody polymers directed at human T lymphocytes implanted in canine brain. *J Neurosurg* 66: 898 – 906

Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K uns Dellian M (2003): Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int J Cancer* 105: 561 – 567

Kuenen BC, Tabernero J, Baselga J, Cavalli F, Pfanner E, Conte PF, Seeber S, Madhusudan S, Deplanque G, Huisman H, Scigalla P, Hoekman K und Harris AL (2003): Efficacy and toxicity of the angiogenesis inhibitor SU5416 as a single agent in patients with advanced renal cell carcinoma, melanoma, abd soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 9: 1648 – 1655

Kullberg M, Mann K und Owens JL (2005): Improved drug delivery to cancer cells: a method using magnetoliposomes that target epidermal growth factor receptors. *Med Hypotheses* 64: 468 – 470

Kumar S und Li C (2001): Targeting of vasculature in cancer and other angiogenic diseases. *Trends Immunol* 22: 129

Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G und Cherrington (2000): SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res* 60: 4152 – 4160

Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M und Bernabeu C (1992): Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22: 393 – 397

Lee CH, Lee EC, Tsai ST, Kung HJ, Liu YC und Hwang J (1993): An EGF-pseudomonas exotoxin A recombinant protein with a deletion in toxin binding domain specifically kills EGF receptor bearing cells. *Protein Eng* 6: 433 – 440

Lee KD, Hong K und Papahadjopoulos D (1992): Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim Biophys Acta* 1103: 185 – 197

Lee RJ und Low PS (1994): Delivery of liposome into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 269: 3198 – 3204

Lee RJ, Wang S, Turk MJ und Low PS (1998): The effects of pH and intraliposomal buffer strength on the rate of liposome content release and intracellular drug delivery. *Biosci Rep* 18: 69 – 78

Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, Rasmussen SL, Blumenschein GR und Freireich EJ (1982): Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med* 96: 133 – 139

Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM und Schlessinger J (1997): Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 16: 281 – 294

Leserman LD, Barbet J, Kourilsky F und Weinstein JN (1980): Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* 288: 602 – 604

Li L, Wartchow CA, Danthi SN, Shen Z, Dechene N, Pease J, Choi HS, Doede T, Chu P, Ning S, Lee DY, Bednarski MD und Knox SJ (2004): A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 1215 – 1227

Liekens S, De Clercq E und Neyts J (2001): Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61: 253 – 270

Liu D, Ren T und Gao X (2003): Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 10: 1307 – 1315

Liu MH, Jin H, Floten HS, Ren Z, Yim AP und He GW (2002): Vascular endothelial growth factor-medited, endothelium-dependent relaxation in human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg* 73: 819 – 824

Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C und Bergan RC (2002): Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* 21: 8272 – 8281

Livingston RB (1994): Dose intensity and high dose therapy. Two different concepts. *Cancer* 74: 1177 – 1183

Lomant AJ und Fairbanks G (1976): Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *J Mol Biol* 104: 243 – 261

Lonberg N und Huszar D (1995): Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 13: 65 – 93

Lopes de Menzes DE, Pilarski LM und Allen TM (1998): In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma. *Cancer Res* 58: 3320 – 3330

Lu Y und Low PS (2003): Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors: review of recent advances and future prospects. *J Control Release* 91: 17 – 29

Lutsenko SV, Feldman NB und Severin SE (2002): Cytotoxic and antitumor activities of doxorubicin conjugates with the epidermal growth factor and ist receptor-binding fragment. *J Drug Target* 10: 567 – 571

Maeda H und Matsumura Y (1989): Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 6: 193 – 210

Mamot C, Drummond DC, Greiser U, Hong K, Kirpotin DB, Marks JD und Park JW (2003): Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 63: 3154 – 3161

Martin FJ, Hubbell WI und Papahadjopoulos D (1981): Immunospecific targeting of liposomes to cells: A novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds. *Biochemistry* 20: 4229 – 4238

Marty C, Odermatt B, Schott H, Neri D, Ballmer-Hofer K, Klemenz R und Schwendener RA (2002): Cytotoxic targeting of F9 teratocarcinoma tumours with anti-ED-B fibronectin scFv antibody modified liposomes. *Br J Cancer* 87: 106 – 112

Marty C und Schwendener RA (2005): Cytotoxic Tumor Targeting With scFv Antibody-Modified Liposomes. *In: Methods Mol Med*: 389 – 402

Maruyama K, Takahashi N, Tagawa T, Nagaike K und Iwatsuru M (1997): Immunoliposomes bearing polyetyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo. *FEBS Lett* 413: 177 – 180

Mastrobattista E, Koning GA und Storm G (1999): Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40: 103 – 127

Matsumura Y und Maeda H (1986): A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res* 46: 6387 – 6392

Matsuno F, Haruta Y, Kondo M, Tsai H, Barcos M und Seon BK (1999): Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 5: 371 – 382

Matter A (2001): Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 6: 1005 – 1024

Mayer LD, Bally MB und Cullis PR (1986): Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochim Biophys Acta* 857: 123 – 126

Mayew E und Papahadjopoulos D (1983): Therapeutic applications of liposomes. *In: OMJ (ed), Marcel Dekker, New York*

Mayhew E, Rustum YM, Szoka F und Papahadjopoulos D (1979): Role of cholesterol in enhancing the antitumor activity of cytosine arabinoside entrapped in liposomes. *Cancer Treat Rep* 63: 1923 – 1928

Metselaar JM, Mastrobattista E und Storm G (2002): Liposomes for intravenous drug targeting: design and application. *Mini Rev Med Chem* 2: 319 – 329

Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA und O'Brien DF (1998): Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically liposomes. *Biochemistry* 37: 12875 – 12883

Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Müller R und Adamkiewicz J (1999): Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 81: 568 – 572

Minow RA und Gottlieb JA (1975): Letter: adriamycin cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 82: 855 – 856

Moog R, Burger AM, Brandl M, Schüler J, Schubert R, Unger C, Fiebig HH und Massing U (2002): Change in pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of gemcitabine in human tumor xenografts upon entrapment in vesicular phospholipids gels. *Cancer Chemother Pharmacol* 49: 356 – 366

Mori A, Klibanov AL, Torchilin VP und Huang L (1991): Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(etyleneglycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS Lett* 284: 263 – 266

Müller RH (1996): Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*

Müller RH und Schumann R (1996): Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*

Murry DJ und Blaney SM (2000): Clinical pharmacology of encapsulated sustained-release cytarabine. *Ann Pharmacother* 34:1173 – 1178.

Nahde T (2004): Ein neues liposomales Trägersystem für eine optimierte Antitumortherapie. *Dissertation, Philipps-Universität Marburg*

Nakajima N und Ikada Y (1995): Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem* 6: 123 – 130

National Cancer Institute, U.S. National Institutes of Health, *www.cancer.gov*

Neubert HH, Hildebrand A, Janich M, Mrestani Y und Plätzer M (2000): Stabile Physiologische Mischmizellen, eine zukunftsträchtige Arzneiform. *Pharmazeutische Zeitung , Govi-Verlag, Eschborn*

New RRC (1989): Liposomes: A practical approach. *Oxford University Press, Oxford, GB*

Nicholson RI, Gee JMW und Harper ME (2001): EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37: 9 – 15

Nielsen UB, Kirpotin DB, Pickering EM, Hong K, Park JW, Refaat Shalaby M, Shao Y, Benz CC und Marks JD (2002): Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selected for cellular endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1591: 109 – 118

Nobs L, Buchegger F, Gurny R und Allémann E (2004): Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J Pharm Sci* 93: 1980 – 1992

Oku N und Namba Y (1994): Long-Circulating Liposomes. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 11: 231 – 270

Oku N, Tokudome Y, Koike C, Nishikawa N, Mori H, Saiki I und Okada S (1996): Liposomal Arg-Gly-Asp analogs effectively inhibit metastatic B16 melanoma colonization in murine lungs. *Life Sci* 58: 2263 – 2270

Olson TA, Mohanraj D, Roy S und Ramakrishnan S (1997): Targeting the tumor vasculature: inhibition of tumor growth by a vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int J Cancer* 73: 865 – 870

O'Shaughnessy JA (2003): Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer* 4: 318 – 328

Papahadjopoulos D und Vail WJ (1978): Incorporation of macromolecules within large unilamellar vesicles (LUV). *Ann N J Acad Sci* 308: 259 – 267

Park JW, Hong K, Carter P, Asgari H, Guo LY, Keller GA, Wirth C, Shalaby R, Kotts C, Wood WI, Papahadjopoulos D und Benz CC (1995): Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1327 – 1331

Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Meyer O, Papahadjopoulos D und Benz CC (1997): Anti-HER2 immunoliposomes for targeted therapy of human tumors. *Cancer Lett* 118: 153 – 160

Park YS (2002): Tumor-directed targeting of liposomes. *Biosci Rep* 22: 267 – 281

Parmley SF und Smith GP (1988): Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73: 305 – 318

Parnham MJ und Wetzig H (1993): Toxicity screening of liposomes. *Chem Phys Lipids* 64: 263 – 274

Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Cilli M, Gambini C, Ribatti D, Longhi R, Allen TM, Corti A und Ponzoni M (2003): Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Res* 63: 7400 – 7409

Peeters PA, Oussoren C, Eling WM und Crommelin DJ (1988): Immunospecific targeting of immunoliposomes, F(ab')2 and IgG to red blood cells in vivo. *Biochim Biophys Acta* 943: 137 – 147

Prescott DM und Flexer AS (1990): Krebs, Fehlsteuerung von Zellen; Ursachen und Konsequenzen. *Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg*

Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzales A und Lacal JC (2004): From Ras signalling to ChoK inhibitors: a further advance in anticancer drug design. *Cancer Lett* 206: 137 – 148

Roth HJ und Fenner H (2000): Arzneistoffe. *Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart*

Ruoslathi E (1996): RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697 - 715

Ruoslathi E (2000): Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biology* 10: 435 – 442

Rustum YM, Mayhew E, Szoka F und Campbell J (1981): Inability of liposome encapsulated 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine nucleotides to overcome drug resistance in L1210 cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 17: 809 – 817

Saleh MN, LoBuglio AF und Trail PA (1998): Monoclonal antibody-based therapy of solid tumors: Studies with BR96-doxorubicin. *In: Monoclonal antibody-based therapy of cancer, Grossbard M (ed), Marcel Dekker, New York*, 397

Salomon DS, Bradt R, Ciardiello F und Normanno N (1995): Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183 – 232

Sambrook J, Fritsch E und Maniatis T (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (Cold Spring Harbor, New York, USA)

Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C und Bernabeu C (2002): Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277: 43799 – 43808

Sapra P und Allen TM (2003): Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res* 42: 439 - 462

Sapra P, Moase EH, Ma J und Allen TM (2004): Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B Lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab' fragments. *Clin Cancer Res* 10: 1100 – 1111

Sarti P, Ginobbi P, D'Agostino I, Arancia G, Lendaro E, Molinari A, Ippoliti R und Citro G (1996): Liposomal targeting of leukaemia HL60 cells induced by tranferrin-receptor endocytosis. *Biotechnol Appl Biochem* 24: 269 – 276

Schön D (1995): Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, Band 3. *MMV Medizin Verlag, München*

Schiffelers RM, Koning GA, ten Hagen TL, Fens MH, Schraa AJ, Janssen AP, Kok RJ, Molema G und Storm G (2003): Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J Control Release* 91: 115 –122

Schmidt R (1997): Darstellung und Charakterisierung von Immunoliposomen zur spezifischen Anreicherung an Ädhäsionsrezeptoren. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle*

Schnall SF und Macdonald JS (1996): Chemotherapy of adenocarcinoma of the pancreas. *Semin Oncol* 23: 220 – 228

Schwendener RA, Trub T, Schott H, Langhals H, Barth RF, Groscurt P und Hengartner H (1990): Comparative studies of the preparation of immunoliposomes with the use of two bifunctional coupling agents and investigation of in vitro immunoliposome-target cell binding by cytofluorometry and electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1026: 69 – 79

Schwendener RA und Schott H (1996): Lipophilic 1-beta-D-arabinofuranosyl cytosine derivatives in liposomal formulations for oral and parenteral antileukemic therapy in the murine L1210 leukemia model. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 723 – 726

Sehgal S und Rogers JA (1995): Polymer-coated liposomes: improved liposome stability and release of cytosine arabinoside (Ara-C). *J Microencapsul* 12: 37 – 47.

Seon BK, Matsuno F, Haruta Y, Kondo M und Barcos M (1997): Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with anti-human endoglin immunotoxin. *Clin Cancer Res* 3: 1031 – 1044

Sessa G und Weissmann G (1968): Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* 9: 310 – 318

Shahinian S und Silvius JR (1995): A novel strategy affords high-yield coupling of antibody Fab' fragments to liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1239: 157 – 167

Shih LB, Goldenberg DM, Xuan H, Lu H, Sharkey RM und Hall TC (1991): Anthracycline immunoconjugates prepared by a site specific linkage via an amino-dextran intermediate carrier. Cancer Res 51: 4192 – 4198

Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD und Cordon-Cardo C (1997): Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res* 3: 81 – 85

Singh B, Rawlings N und Kaur A (2001): Expression of integrin alphavbeta3 in pig, dog and cattle. *Histol Histopathol* 16: 1037 – 1046

Skerra A und Plückthun A (1988): Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* 240: 1038 – 1041

Slama JS und Rando RR (1980): Lectin-mediated aggregation of liposomes containing glycolipids with variable hydrophilic spacer arms. *Biochemistry* 19: 4595 – 4600

Staros JV (1988): Membrane-impermeant cross-linking reagents: probes of the structure and dynamics of membrane proteins. *Acc Chem Res* 21: 435 – 441

Straubinger RM, Hong K, Friend D und Papahadjopoulos D (1983): Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell* 32: 1069 – 1079

Stryer L (1988): Biochemie. *Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg*

Sudimack JJ, Guo W, Tjarks W und Lee RJ (2002): A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol. *Biochim Biophys Acta* 1564: 31– 37

Sugano M, Egilmez NK, Yokota SJ, Chen F, Harding J, Huang SK und Bankert RB (2000): Antibody targeting of doxorubicin-loaded liposomes suppresses the growth and metastatic spread of established human lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 60: 6942 – 6949

Tabata M, Kondo M, Haruta Y und Seon BK (1999): Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in scid mice using ^{125}I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 82: 737 – 742

Takahashi N, Haba A, Matsuno F und Seon BK (2001): Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res* 61: 7846 – 7854.

Tarli L, Balza E, Viti F, Borsi L, Castellani P, Berndorff D, Dinkelborg L, Neri D und Zardi L (1999): A high affinity human antibody that targets tumoural blood vessels. *Blood* 94: 192 – 198

Therien HM und Shahum E (1989): Importance of physical association between antigen and liposomes in liposome adjuvanticity. *Immunol Lett* 22: 253 – 258

Thorpe PE (2004): Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 10: 415 – 427

Tolcher AW, Sugarman S, Gelmin KA, Cohen R, Saleh M, Isaacs C, Young L, Healey D, Onetto N und Slichenmyer W (1999): Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 478

Torchilin VP (1998):Polymer-coated long-circulating mircoparticulate pharmaceuticals. *J Microencapsul* 15: 1 – 19

Torchilin VP, Narula J, Halpern E und Khaw BA (1996): Poly(ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes: factors influencing targeted accumulation in the infracted myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1279: 75 – 83

Torchilin VP (2000): Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* 11: 81 – 91

Torchilin VP und Weissig V (2003): Liposomes: A Practical Approach. *Oxford University Press*

Trail PA, Willner D, Lasch SJ, Henderson AJ, Hofstead SJ, Casazza AM, Firestone RA, Hellström I und Hellström KE (1993): Cure of xenografted human carcinomas by BR96-doxorubicin immunoconjugates. *Science* 261: 212 – 215

Trail PA, Willner D und Hellström KE (1995): Site-directed delivery of anthracyclines for cancer therapy. *Drug Dev Res* 34: 196 – 209

Trail PA, King HD und Dubowchik GM (2003): Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 52: 328 – 337

Uyama I, Kumai K, Yasuda T, Tagawa T, Ishibiki K, Kitajima M und Tadakuma T (1994): Improvement of therapeutic effect by using Fab' fragment in the treatment of carcinoembryonic antigen-positive human solid tumors with adriamycin-entrapped immunoliposomes. *Jpn J Cancer Res* 85: 434 – 440

Urdal DL und Hakomori S (1980): Tumor-associated ganglio-N-triosylceramide: Target for antibody-dependent avidin-mediated drug killing of tumor cells. *J Biol Chem* 255: 10509 – 10516

van Hinsbergh VW, Collen A und Koolwijk P(2001): Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 936: 426 – 437

Veronese ML und O'Dwyer PJ (2004): Monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 40: 1292 – 1301

Vervoordeldonk SF, Merle PA, van Leeuwen EF, von dem Borne AE und Slaper-Cortenbach IC (1994): Preclinical studies with radiolabeled monoclonal antibodies for treatment of patients with B-cell malignancies. *Cancer* 73: 1006 – 1011

Vingerhoeds MH, Haisma HJ, Belliot SO, Smit RH, Crommelin DJ und Storm G (1996): Immunoliposomes as enzyme-carriers (immuno-enzymosomes) for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): optimization of prodrug activating capacity. *Pharm Res* 13: 604 – 610

Völkel T, Müller R und Kontermann RE (2004): Isolation of endothelial cell-specific human antibodies from a novel fully synthetic scFv library. *Biochem Biophys Acta Res Commun* 317: 515 – 521

Völkel T, Hölig P, Merdan T, Müller R und Kontermann RE (2004): Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105). Biochim Biophys Acta 1663: 158 – 166.

Wagner CR, Iyer VV und McIntee EJ (2000): Pronucleotides: Toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med Res Rev* 20: 417 – 451

Wang JM, Wilson PB, Kumar S, Pye D und Hunter RD (1994): Quantitation of endothelial cell specific protein E-9 employing a single monoclonal antibody in an indirect sandwich ELISA: *J Immunol Methods* 171: 55 – 64

Watkins SJ, Mesyanzhinov VV, Kurochkina LP und Hawkins RE (1997): The 'adenobody' approach to viral targeting: specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene Ther* 4: 1004 – 1012

Webb MS, Harasym TO, Masin D, Bally MB und Mayer LD (1995): Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models. *Br J Cancer* 72: 896 – 904

Weissig V, Lasch J, Klibanov AL und Torchilin VP (1986): A new hydrophobic anchor fort the attachment of proteins to liposomal membranes. *FEBS Lett* 202: 86 – 90

Williams A und Ibrahim IT (1981): Carbodiimide chemistry: recent advances. *Chem Rev* 81: 589 – 636

Woodle MC und Lasic DD (1992): Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1113: 171 – 199

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F und Massagué J (1994): Mechanism of activation of the TGF-β receptor. *Nature* 370: 341 – 347

Wu NZ, Da O, Rudoll TL, Needham D, Whorton AR und Dewhirst MW (1993): Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res* 53: 3765 – 3770

Xu L, Huang CC, Huang W, Tang WH, Rait A, Yin ZY, Cruz I, Xiang LM, Pirollo KF und Chang EH (2002): Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther* 1: 337 – 346

Yagi N, Ogawa Y, Kodaka M, Okada T, Tomohiro T, Konakahara T und Okuno H (2000): Preparation of functional liposomes with peptide ligands and their binding to cell membranes. *Lipids* 35: 673 – 680

Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Nishibata T, Kobayashi K, Okamoto T, Mukai Y, Shimizu T, Nakagawa S, Nagata S und Mayumi T (2003): Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-α with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 21: 546 – 551

Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP und Jain RK (1995): Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 55: 3752 – 3756

Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paolella G, Sebastio G und Baralle FE (1987): Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 6: 2337 – 2342

Zarovni N, Monaco L und Corti A (2004): Inhibition of tumor growth by intramuscular injection of cDNA encoding tumor necrosis factor alpha coupled to NGR and RGD tumor-homing peptides. *Hum Gene Ther* 15: 373 – 382

Zeng H, Sanyal S und Mukhopadhyay D (2001): Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. *J Biol Chem* 276: 32714 – 32719

Zhao ZG, Im JS, Lam KS und Lake DF (1999): Site-specific modification of a single-chain antibody using a novel glyoxylyl-based labelling reagent. *Bioconjug Chem* 10: 424 – 430

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Hölig
Vorname:	Peter
Geburtsdatum:	16. April 1974
Geburtsort:	Frankfurt a. M.
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1980 – 1984	Grundschule Wächtersbach
1984 – 1990	Gesamtschule Wächtersbach, gymnasialer Zweig
1990 – 1993	Grimmelshausen-Gymnasium Gelnhausen
Juni 1993	Abitur

Zivildienst:

09/1993 – 10/1994	Deutsches Rotes Kreuz Gelnhausen, Rettungsdienst

Studium:

Studiengang	Pharmazie
WS 1994/95 – SS 1995	Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt a. M.
WS 1995/96 – SS 1998	Ruprecht-Karls Universität Heidelberg
SS 1997	School of Pharmacy, University of London
11/1998 – 11/1999	Praktisches Jahr: Schwanen-Apotheke, Gelnhausen und Hoechst Marion Roussel, Frankfurt a. M.
12/1999	Approbation als Apotheker

Promotion:

Thema	Erzeugung und Charakterisierung zielgerichteter liposomaler Trägersysteme für die Tumortherapie
04/2001 – 04/2002	wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A Fahr
04/2002 – 06/2004	wissenschaftlicher Angestellter bei der Firma vectron therapeutics AG (in Insolvenz), Marburg

8.2. Danksagung

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Kissel von der Philipps-Universität Marburg für die Betreuung meiner Dissertation, für viele hilfreiche Anregungen und seine stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft danken.
Herrn Prof. Dr. A Fahr von der Friedrich-Schiller-Universität Jena möchte ich ganz ausdrücklich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation, das immerwährende Interesse am Fortgang der Arbeit, die unzähligen Diskussionen und die Kontakte zu anderen Arbeitsgruppen danken.
Ganz, ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. R. Kontermann für die alltägliche und unermüdliche Betreuung meiner Dissertation bei der vectron therapeutics AG. Seit der anfänglichen gegenseitigen Gewöhnungsphase ("Erwischt") bin ich ihm für seine endlose Diskussionsbereitschaft, sein sekündliches Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Geduld und die ständige Bereitschaft zum Korrekturlesen ausgesprochen dankbar.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Kollegen der vectron therapeutics AG. Hier gilt mein ganz besonderer Dank der liebsten Kollegin und meiner molekularbiologisch besseren Hälfte Dr. Tina Völkel. Mit ihr war es möglich, die oft geforderte interdisziplinäre Zusammenarbeit perfekt im Laboralltag praktisch umzusetzen. Sehr gerne denke ich auch an die fruchtbare Zusammenarbeit und die unzähligen Kaffeerunden bzw. Mensagänge mit den obligatorischen und oftmals „gewittrigen“ Diskussionen über die kleine und große Pharmawelt mit den Kollegen Dr. Andreas Graser und Dr. Thomas Nahde zurück. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Abdo Konur für die Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen und dem Tierarzt S. Hoffmann für die Durchfühung der in-vivo Versuche. Herrn Klaus Weber möchte ich für seine unermüdliche, auch außerhalb der tariflichen Arbeitszeiten, Hilfe bei der Instandsetzung von vielen defekten Geräten danken und erinnere mich sehr gerne an viele emotionale Gespräche über das bedeutende Thema Eintracht Frankfurt.
Des weiteren danke ich den Kollegen vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Marburg, durch die ich die Möglichkeit hatte, meine Dissertation in einem optimalen sozialen Umfeld durchzuführen. Dies war gerade während der turbulenten und stürmischen Zeit in der Biotech-Branche sehr hilfreich. Erwähnen möchte ich hier Florian Unger, mit dem ich zusammen die Marburger Kulturlandschaft systematisch erforscht habe und vom Edersee aus den Segelsport entdeckt habe. Ebenfalls Elke Kleemann soll hier genannt werden, neben dem vorzüglichen Korrekturlesen denke ich gerne an viele

schöne extraliposomale Stunden, z. B. auf dem verschneiten Marburger Weihnachtsmarkt, zurück. Darüber hinaus danke ich Dr. Thomas Merdan und Oliver Germershaus für die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop. Ein ganz herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. U. Bakowsky für die unbürokratische Durchführung der AFM-Aufnahmen. Danken möchte ich auch der Koch-Runde um die drei Damen vom Grill, Claudia Packhäuser, Martina Lehmann und Elke Kleemann, die mir teilweise einige unvergessliche und feurige Gerichte servierten. Ebenfalls unvergeßlich bleibt das gemeinsame Kochen - bei dem bewiesen werden konnte, daß Grüne Soße und Paella äußerst gut harmonieren - mit Frau Dr. Ana Cerra-Pohl. Ein extra Dankeschön geht an meine Mutter, die mich während der nicht allzu leichten letzten Jahre bei meinem Promotionsvorhaben nach allen Regeln der mütterlichen Kunst immer perfekt unterstützt hat.

8.3. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Peter Hölig, geboren am 16. April 1974 in Frankfurt a. M., ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: "Erzeugung und Charakterisierung zielgerichteter liposomaler Trägersysteme" selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

8.4. Veröffentlichungen

8.4.1. Publikationen

Bach M, Hölig P, Schlosser E, Völkel T, Graser A, Müller R und Kontermann RE (2003):
Isolation from phage display libraries of lysine-deficient human epidermal growth factor variants for directional conjugation as targeting ligands.
Protein Eng 16: 1107 – 13.

Völkel T, Hölig P, Merdan T, Müller R und Kontermann RE (2004):
Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105).
Biochim Biophys Acta 1663: 158 – 66.

Hölig P, Bach M, Völkel T, Nahde T, Hoffmann S, Müller R und Kontermann RE (2004):
Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells.
Protein Eng Des Sel 17: 433 – 441

8.4.2. Beteiligung an Patenten der vectron therapeutics AG:

1) „ Drug delivery vehicles and uses thereof”
Patent Nr.: 03027944.2-2114

2) „RGD targeting moiety its production and use”
Patent Nr.: 03027943.4-2405

8.4.3. Vorträge

1) *„Endothelial Cell Targeting using single-chain scFv-Immunoliposomes"*

2nd Ameland Liposome Workshop (Niederlande)
8. – 12. September 2003

2) *„Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD 105)"*

Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Heidelberg
2. April 2004

3) *„Liposomes containing novel RGD lipopeptides for the targeting to integrin expressing endothelial cells"*

Universität Utrecht (Niederlande), Institut für Pharmazeutische Technologie
11. Mai 2004

8.4.4. Poster

1) *„Targeting of immunoliposomes to endothelial cells"*

Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery
15. – 19. Dezember 2003
School of Pharmacy, University of London, London

2) *„Lysine-deficient epidermal growth factor variants for site-specific coupling to liposomes"*

Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Heidelberg
2. April 2004