

Aus dem Departement für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät der
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt in der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München
(PD Dr. Lars Lindner)

**Neuartige thermosensitive Liposomen
zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren**

- Charakterisierung in vitro und in vivo -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Rebecca Schmidt
aus
Meschede

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

In Liebe meiner Mama und meinem Papa gewidmet

Ein Zitat, welches mir in Erinnerung geblieben ist

"Wenn Sie Krebs haben", sagt Folkman, "und eine Maus sind, können wir Ihnen gut helfen."

[Aus: Spiegel, 20/98, Krebs auf Hungerkur]

Ein Bild, welches mir in Erinnerung geblieben ist

Ein Mädchen sitzt umringt von seinen Kuscheltieren auf einem Krankenhausbett und lacht.

Untertitel: *„Es sind nicht die Tier, die man hier sieht, die dieses Kind geheilt haben.“*

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Liposomen.....	3
2.1.1	Verwendung von Liposomen.....	4
2.1.2	Lipidkomposition.....	6
2.1.3	Liposomen zum <i>drug targeting</i> und <i>drug delivery</i>	10
2.1.4	Thermosensitive Liposomen.....	12
2.2	Doxorubicin	16
2.2.1	Physikalische Eigenschaften von Dox.....	18
2.2.2	Pharmakokinetische Eigenschaften von Dox.....	18
2.2.3	Anwendungsgebiete zugelassener Doxorubicinpräparate	19
2.2.4	Nebenwirkungen von Doxorubicin.....	19
2.2.5	Lipomales Doxorubicin und Stealth-Liposomen.....	20
2.3	Hyperthermie in der Krebstherapie.....	22
2.4	Zielsetzung.....	27
3	MATERIAL	28
3.1	Liposomenherstellung und –charakterisierung	28
3.1.1	Lipide.....	28
3.1.2	Chemikalien und Lösungsmittel	29
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	30
3.1.4	Plasmen.....	31
3.2	Zellkultur	31
3.2.1	Zelllinien.....	31
3.2.2	Zellkultivierung	32
3.3	Tierversuche	33
3.3.1	Versuchstiere	33
3.3.2	Arzneimittel	33
3.4	Verbrauchsmaterial.....	34
3.4.1	Herstellung Liposomen.....	34
3.4.2	Zellkultur	34
3.4.3	Tierversuche.....	34
3.5	Geräte.....	35

3.5.1	Herstellung Liposomen.....	35
3.5.2	Charakterisierung Liposomen.....	35
3.5.3	Doxorubicinnachweis aus Plasma, Tumoren und Organen	36
3.5.4	Zellkultur	36
3.5.5	Tierversuche.....	37
3.6	Software	37
4	METHODEN.....	39
4.1	Liposomenherstellung	39
4.2	Liposomencharakterisierung	41
4.2.1	Bestimmung von Liposomengröße und Polydispersionsindex	41
4.2.2	Bestimmung des ζ -Potentials	42
4.2.3	Lipidanalytik.....	42
4.2.3.1	Nachweis des Lipidgehalts	42
4.2.4	Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie (DC) ...	42
4.2.5	Bestimmung des liposomalen Doxorubicingehalts.....	43
4.3	Doxorubicinbestimmung	43
4.3.1	Extraktion aus Plasma.....	43
4.3.2	Extraktion aus Organ- und Tumorgewebe	44
4.3.3	HPLC-Analyse.....	44
4.4	In vitro Öffnungskinetik	44
4.5	Temperaturabhängige Dox-Freisetzung.....	45
4.6	Verdünnungsstabilität	45
4.6.1	Zellkultivierung	46
4.6.2	Zytotoxizitätstests	47
4.6.3	Vorbereitung der Zellen für Tierversuche	49
4.7	Tierversuche	49
4.7.1	Haltung.....	49
4.7.1.1	Mäuse.....	50
4.7.1.2	Ratten.....	50
4.7.2	Angewandte Methoden	50
4.7.2.1	Anästhesie.....	50
4.7.2.1.1	Injektionsnarkose Mäuse	50
4.7.2.1.2	Inhalationsnarkose Ratten.....	50
4.7.2.2	Euthanasie.....	51
4.7.2.3	Organperfusion	51

4.7.2.4	Induktion von Bulktumoren.....	51
4.7.2.5	Implantation der Tumorfragmente.....	51
4.7.2.6	Regionale Hyperthermie Wasserbad.....	52
4.7.2.7	Lokale Hyperthermie Lampe.....	53
4.7.2.8	Therapeutische Studien.....	54
4.7.3	Überblick Versuchsreihen.....	55
4.7.3.1	Maus.....	55
4.7.3.1.1	Tumorhistologie.....	55
4.7.3.1.2	Pharmakokinetik.....	55
4.7.3.1.3	Dox-Anreicherung und Organverteilung unter Tumor-HT.....	56
4.7.3.1.4	Therapeutische Studie im syngenem Tumormodell.....	56
4.7.3.1.5	Therapeutische Studie im xenogenem Tumormodell.....	56
4.7.3.2	Ratte.....	56
4.7.3.2.1	Pharmakokinetik.....	56
4.7.3.2.2	Anreicherung und Organverteilung unter HT.....	57
4.7.3.2.3	Therapeutische Studie - Hyperthermie mit Wasserbad.....	57
4.7.3.2.4	Therapeutische Studie - Hyperthermie mit Lampe.....	57
5	ERGEBNISSE.....	59
5.1	Liposomenherstellung und Charakterisierung.....	59
5.2	Versuche in vitro.....	61
5.2.1	Einfluss von Plasma und Spezies auf Freisetungsverhalten.....	61
5.2.1.1	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50:20:30 (m/m).....	62
5.2.1.2	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 70:20:10 (m/m).....	64
5.2.2	Vergleich von P-Lyso-PC (Dox) und S-Lyso-PC (Dox).....	66
5.2.2.1	Herstellung und Charakterisierung.....	67
5.2.2.2	Öffnungskinetik in HN-Puffer.....	68
5.2.2.3	Temperaturabhängige Dox-Freisetzung in HN-Puffer und FCS.....	70
5.2.3	Einfluss von Verdünnung auf Liposomenstabilität.....	71
5.2.4	Zytotoxizitätstest Zellkultur.....	72
5.3	Versuche in vivo.....	76
5.3.1	Akute und subakute Toxizität der TSL.....	76
5.3.2	Tumorhistologie.....	76
5.3.3	Maus.....	77
5.3.3.1	Pharmakokinetik in der Maus.....	77
5.3.3.1.1	Plasma.....	77
5.3.3.1.2	Organe.....	80

5.3.3.2	Doxorubicinanreicherung und Organverteilung nach HT	85
5.3.3.3	Therapeutische Studie im syngenem Tumormodell.....	88
5.3.3.4	Therapeutische Studie im xenogenem Tumormodell	89
5.3.4	Ratte	90
5.3.4.1	Pharmakokinetik in der Ratte.....	90
5.3.4.2	Doxorubicinanreicherung und Organverteilung nach HT	95
5.3.5	Therapeutische Studie Hyperthermie Wasserbad	101
6	DISKUSSION.....	106
6.1	Speziesabhängige Dox-Freisetzung in vitro.....	106
6.2	Vergleich P-Lyso-PC und S-Lyso-PC TSL (Dox) in vitro.....	109
6.3	Einfluss von Verdünnung auf die Liposomenstabilität	110
6.4	Zytotoxizitätstest.....	112
6.5	Akute und Subakute Toxizität.....	114
6.6	Pharmakokinetik Maus.....	114
6.7	Dox-Anreicherung im Tumor und Organverteilung nach Hyperthermie	118
6.8	Pharmakokinetik Ratte	118
6.9	Dox-Anreicherung nach HT Ratte	120
6.10	Tumorwachstumsstudien Maus und Ratte.....	122
7	ZUSAMMENFASSUNG	125
8	SUMMARY	127
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	129
10	ANHANG.....	135
10.1	Abkürzungsverzeichnis	135
10.2	Tabellenverzeichnis	137
10.3	Abbildungsverzeichnis.....	138
10.4	Veröffentlichungen	141
11	LEBENS LAUF..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
12	DANKSAGUNG... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	

1 EINLEITUNG

Trotz jahrelanger Forschung und vieler Fortschritte bezüglich Ursachen, Prävention und Therapien sind Krebsleiden nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland; Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems [ICD-10]). Über ein Viertel aller Verstorbenen (114 855 Männer und 99 452 Frauen) erlag im Jahr 2008 einem Krebsleiden. Vorwiegend umfasst die Therapie von Tumorerkrankungen die chirurgische Entfernung, Strahlentherapie, Chemotherapie oder eine Kombination dieser drei Möglichkeiten. Chemotherapien sind aufgrund ihrer systemischen Applikation jedoch häufig mit Nebenwirkungen (NW) wie Haarverlust, Erbrechen und Übelkeit verbunden, so dass die Lebensqualität der Patienten deutlich eingeschränkt wird. Hinzu kommen schwere, lebensbedrohliche NW, wie Knochenmarksdepression, Anämie, Kardio-, Nephro- und Hepatotoxizität. Durch diese dosislimitierenden Faktoren können insbesondere in soliden Tumoren häufig keine therapeutisch wirksamen Zytostatikakonzentrationen erreicht werden. Dabei ist die lokale Kontrolle des Tumorwachstums bei vielen Krebsarten für die weitere Prognose und das Gesamtüberleben der Patienten entscheidend. Bei Weichteilsarkomen, kolorektalen und zervikalen Karzinomen steigt mit Tumorgröße und der Ausbildung von Lokalrezidiven das Metastasierungspotential. Daher beschäftigt sich die Forschung mit dem gezielten Transport und der lokalen Freisetzung von Wirkstoffen zur Steigerung der Effizienz derzeitiger Chemotherapeutika und zur Reduktion ihrer NW (*drug targeting* und *drug delivery* Systeme). Liposomen als Wirkstoffträger besitzen enormes Potential. Über einen effektiven und sicheren Einschluss des Wirkstoffs hinaus sind sie für den Organismus untoxisch und akkumulieren aufgrund ihrer Größe und des veränderten Gefäßsystems passiv im Tumorgewebe. Darüber hinaus konnte die Vesikelmembran so optimiert werden, dass Liposomen hohe Plasmastabilität aufweisen und von einer Erkennung und Elimination durch das Immunsystem verschont bleiben. Aber nicht alle Probleme konnten bisher zufriedenstellend gelöst werden. Liposomen, die eine hohe Stabilität besitzen, setzen den Wirkstoff nur sehr langsam frei. Zudem ist die Freisetzung ein passiver Vorgang und nicht kontrollierbar. Viel versprechend sind hier thermosensitive Liposomen (TSL), die den Wirkstoff bei milder, regionaler Hyperthermie (HT; 40-42 °C) aktiv freisetzen, so dass über eine Erwärmung des Tumorgewebes eine Anreicherung des Wirkstoffs erzielt werden kann. Die optimale Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran, die ausreichend Stabilität während des Transports im Blutkreislauf und gleichzeitig eine schnelle Freisetzung gewährleistet, ist immer noch eine Herausforderung. Derzeit wird ThermoDoxTM (Celsion) als erstes Präparat mit TSL in

zwei klinischen Studien getestet. Die Formulierung basiert auf Lysolipiden und enthält Doxorubicin als Wirkstoff. Alternativ hierzu werden neuartige TSL (1), basierend auf synthetischen Phosphatidyloliglyceriden, beschrieben, die eine verbesserte Stabilität bei gleichwertiger Freisetzungsrates zu bisherigen TSL aufweisen. Diese sollen in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* genauer charakterisiert werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Liposomen

Der Begriff Liposom stammt aus dem Griechischen und kann mit Fettkörper ($\lambda\pi\tau\omicron\varsigma$ „lipos“ für Fett; $\sigma\omega\mu\alpha$ „soma“ für Körper) übersetzt werden. Es wird häufig auch der Name Nanosom verwendet, der sich auf die geringe Größe im Nanometerbereich (50-1000 nm Durchmesser) bezieht. Liposomen sind kleine sphärische Vesikel, bestehend aus Doppelmembranen von amphiphilen Lipidmolekülen, in dessen Inneres hydrophile Agenzien eingeschlossen werden können. Zudem besteht die Möglichkeit hydrophobe Stoffe in die Liposomenmembran zu integrieren. Die hydrophilen Gruppen der Lipide ragen jeweils nach Innen und Außen in die Peripherie, wohingegen sich die langen, Fettsäurenketten der zwei Lipidmembranen aneinander lagern.

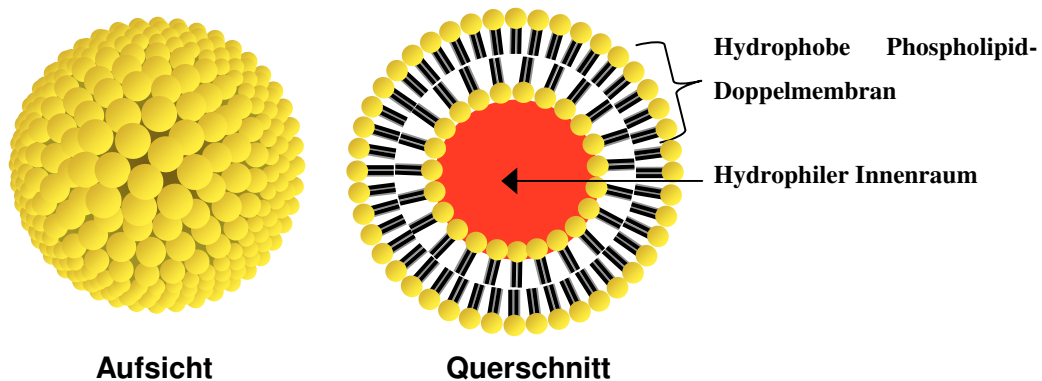


Abbildung 1 Struktur eines Liposoms ; Größe: 100-200 nm

Multilamellare Vesikel (MLV's) bilden sich spontan, sobald ein Phospholipidfilm in wässrige Lösung gebracht wird. Um sie als Arzneimittelträger nutzen zu können, wurden Techniken entwickelt, diese MLV zu unilamellaren Vesikeln (large unilamellar vesicle: LUV's;) von geringerer und einheitlicher Größe (small unilamellar vesicle: SUV's) herzustellen. Hierzu gehört die Extrusion durch Polycarbonatmembranen definierter Porengröße, Injektion von ethanolischer Lipidlösung in die wässrige Phase, Beschallung mit Ultraschall und die Detergenzdialyse. Liposomen werden hauptsächlich aus natürlich vorkommenden Phospholipiden und Cholesterol gebildet und sind damit biokompatibel und bioabbaubar. Sie besitzen eine hohe Variabilität bezüglich ihrer Formulierung (Lipidzusammensetzung; Größe; Oberflächenladung; Liganden; Wirkstoff-Lipid Verhältnis). Somit können ihre biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften (Phasenumwandlungstemperatur; Freisetzungsrage, Stabilität im Plasma und anderen Milieus) der gewünschten Wirkung angepasst werden. Hinzu kommt die Möglichkeit,

Moleküle an die Liposomenoberfläche zu binden und damit z.B. die Zirkulationszeit oder Gewebeverteilung der Partikel zu verändern. Polyethylenglykol (PEG) Polymere verschiedener Länge (PEG₂₀₀₀, PEG₃₅₀₀, PEG₅₀₀₀) können an verschiedene Phospholipidmoleküle kovalent gebunden werden. Diese ragen über die Liposomenmembran hinaus und bilden an der Oberfläche der Liposomen durch lokal hohe Konzentrationen hydrophiler Gruppen einen schützenden Mantel. Hierdurch werden elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen mit Serumproteinen (Opsonine, Komplementfaktoren) verhindert und die Liposomen vor den Zellen des RES (Reticuloendotheliales System) abgeschirmt. PEG-stabilisierte (= Stealth) Liposomen können aufgrund ihrer längeren Zirkulationszeit wie andere Makromoleküle im Tumorgewebe akkumulieren (2), was man als EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*) bezeichnet.

Der EPR-Effekt beruht auf der veränderten Makro- und Mikroarchitektur der tumoralen Blutgefäße. Durch starke Proliferation des Tumorgewebes kommt es zu Abweichungen von der physiologischen Angiogenese. Daraus resultiert ein ungeordnetes, unterschiedlich dichtes Gefäßnetz mit z.T. geschlängelten oder blind endenden Gefäßen und Gefäßshunts. Die Durchblutung ist hierdurch heterogen mit über- und unterversorgten Tumorarealen. Die Gefäße weisen zudem Abweichungen im Wandaufbau auf. Eine *Tunica media* (gattmuskuläre Komponente) fehlt, die Basalmembran ist lückenhaft und das Endothel ist weitgehend fenestriert.

2.1.1 Verwendung von Liposomen

Liposomen wurden erstmals 1964 von den britischen Forschern Bangham und Horne aus dem Babraham Institute in Cambridge im Journal of Molecular Biology beschrieben. Hier zeigten sie elektronenmikroskopische Bilder multilamellarer Lecithin- und Cholesterolliposomen (3). Da die Phospholipiddoppelmembran von Liposomen der Zellmembranstruktur eukaryotischer und prokaryotischer Zellen gleicht, wurden sie von Forschern zunächst als Modell zur Erforschung biologischer Membranen genutzt (4). So werden bis heute Wirkstofftransport, Membranpermeabilität, Interaktion der Membran mit niedermolekularen Substanzen, Fusions- und Bindungsprozesse, der Einfluss von Lipid-Asymmetrie auf Transportvorgänge etc. mit Hilfe von Liposomen untersucht.

Erste Anwendung als Produkt fanden Liposomen als Bestandteile in Cremes oder Sera in der Kosmetik zur Verbesserung der Hydratisierung der Haut, zur Steigerung der Hautpermeabilität für lipophile und hydrophile Stoffe sowie zur zusätzlichen Versorgung der Haut mit essentiellen Lipiden. 1987 wurde von der Firma Dior das erste Liposomenpräparat „Capture“ auf den Markt gebracht, dem bis zur heutigen Zeit viele Produkte auf liposomaler Basis folgten. Lipide der Liposomenmembran sollen verstärkt

in die Haut integriert werden und damit den transepidermalen Wasserverlust gering halten. Dies bewirkt zudem eine Steigerung der Penetration wasserlöslicher kosmetischer oder dermatologischer Stoffe. So können selbst leere Liposomen von Vorteil sein. Zur topischen Applikation in der Dermatologie finden aber auch liposomal eingeschlossene Wirkstoffe Verwendung, wie z.B. Epipervisone Creme® (Wirkstoff Econazol) zur Behandlung von Dermatomykosen.

Seit Ende der 80er Jahre werden Liposomen als nichtvirale Vektoren zur Verbesserung der Transfektionseffizienz (d.h. dem Einschleusen von fremdem genetischem Material in eukaryontische Zellen), auch Lipofektion genannt, erforscht (5). Trotz erster (6, 7) und laufender (multiples Glioblastom (8); solide Tumoren (9)) klinischer Studien erhielt bisher noch kein liposomales Präparat zum *gene delivery* eine Zulassung. Es hat sich gezeigt, dass es schwierig ist alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung zu erfüllen. Hierzu gehört eine geringe Toxizität (keine Aggregatbildung im Blut; keine Entzündungsreaktionen), hohe Transfektionsrate, anhaltende Genexpression und lange Plasmazirkulationszeit.

Obwohl Liposomen schon früh als potentielle Arzneimittelträger in Betracht gezogen wurden kam es erst in den 90er Jahren zu ersten Zulassungen. Hierzu gehörten das Antimykoticum Ambisome® (liposomales Amphotericin B) sowie die Chemotherapeutika Caelyx®, Myocet® (beide liposomales Doxorubicin (Dox)) und Daunoxome® (liposomales Daunorubicin). Bis heute ist jedoch nur eine geringe Anzahl liposomaler Präparate zugelassen, denn der Nachweis erhöhter Wirksamkeit oder Sicherheit gegenüber zugelassenen Präparaten in klinischen Studien ist immer noch problematisch. Auch der hohe Herstellungspreis sowie technische Probleme spielen eine Rolle. Viele Formulierungen sind nicht lagerstabil und müssen daher zeitintensiv kurz vor Applikation am Krankenbett formuliert werden (z.B. Myocet®).

Eine weitere Anwendung finden Liposomen als so genannte Virosomen in Impfstoffen, wo sie die Funktion von Adjuvantien übernehmen und die Immunogenität der Antigene erhöhen. Durch Glycoproteine, z.B. Hämagglutinin und Neuraminidase von inaktivierten Influenzaviren (IRIVs Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes), auf der Oberfläche der Virosomen werden die Partikel von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen verstärkt phagozytiert (10). Diese präsentieren den T-Lymphozyten die Antigene über MHC-II Komplexe. Die T-Lymphozyten werden aktiviert und indirekt die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten angeregt. Virosomen binden aber auch direkt an B-Lymphozyten und stimulieren so deren Proliferation (11). Der Vorteil von Virosomen als Adjuvantien liegt hauptsächlich in ihrer guten Verträglichkeit (nicht immunogen und nicht toxisch). Außerdem sind sie biologisch abbaubar und rufen eine schnelle, lang anhaltende und starke Wirkung hervor. Virosomen werden derzeit z.B. für

die aktuellen Hepatitis A Impfstoffe HAVpur[®] (Chiron-Behring) und Epaxal[®] (Berna Biotech, 2003), sowie die Influenzaimpfstoffe Inflexal[®] V (USA) bzw. Infectovac[®] Flu (D) (Berna Biotech 2005) oder Invivac[®] (Solvay 2005) verwendet.

2.1.2 Lipidkomposition

Jedes Phospholipid besteht aus zwei Einheiten, die sich in ihrer Löslichkeit in Wasser unterscheiden (Abbildung 2).

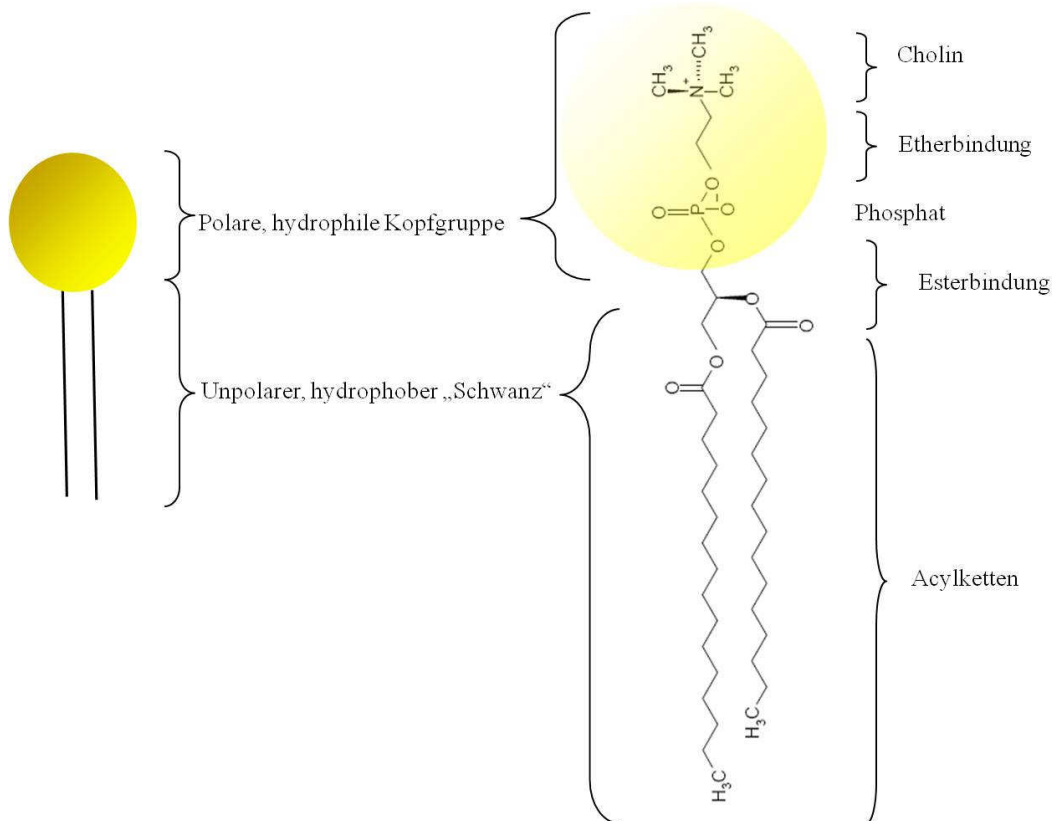


Abbildung 2 Aufbau der Liposomenmembran

1. Polare, hydrophile Kopfgruppe a. Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerol oder Inositol
 b. Phosphat c. Glycerol 2. Unpolarer, hydrophober Teil: Ein- bis zwei Acylketten variabler Länge (10-24 Kohlenstoffatome); Die beiden Fettsäureketten sind über je eine Esterbindung mit zwei Hydroxylgruppen des Glycerolmoleküls verbunden.

Die im getrockneten Zustand in Form planarer Blöcke vorliegenden Phospholipide sind wasserunlöslich aber bilden in wässrigem Milieu Molekülaggregate, sobald die kritische Mizellenkonzentration überschritten wurde. Diese Molekülaggregate liegen nicht zwingend als liposomale Bilayermembranen, sondern abhängig vom molekularen Volumen des hydrophoben Schwanzes, der Oberfläche des hydrophilen Kopfteils und der Länge der Acylketten auch als Mizellen, inverse Mizellen oder hexagonale Phasen I oder II (kreisförmige Stäbchen (Abbildung 3)). Das Verhältnis zwischen diesen Parametern wird auch als Packungsparameter bezeichnet (Abbildung 4).

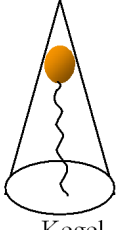
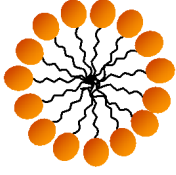
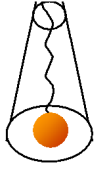
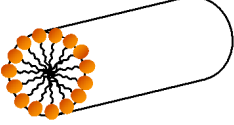
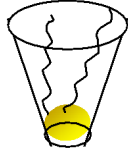
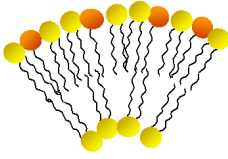
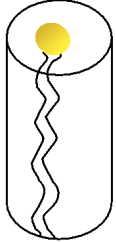
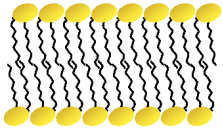
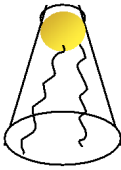
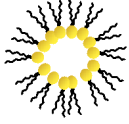
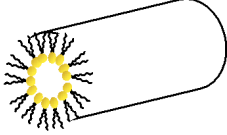
Lipide	Lipidform	Geformte Strukturen	p
Lysophospholipide Detergenzien PEG-konjugierte Lipide Kurzkettige Ceramide <i>Lipide mit einer Alkylkette und großen Kopfgruppenflächen</i>	 Kegel	 Kugelmicelle	< 1/3
<i>Lipide mit einer Alkylkette und kleinen Kopfgruppenflächen</i>	 Kegelstumpf	 Hexagonale Phase I Zylindermicelle	1/3 – 1/2
<i>Lipide mit zwei Alkylketten und großen Kopfgruppenflächen</i>	 Kegelstumpf	 Flexible Doppelschicht	1/2 – 1
Phosphatidylcholin Phosphatidylserin Phosphatidylinositol Phosphatidylglycerin Sphingomyelin <i>Lipide mit mit zwei Alkylketten und kleinen Kopfgruppenflächen</i>	 Zylinder	 Planare Doppelschicht	~ 1
Phosphatidylethanolamin Cholesterol Cardiolipin Lipid A Langkettige Ceramide <i>Lipide mit zwei Alkylketten kleinen Kopfgruppenflächen</i>	 Umgekehrter Kegelstumpf	 Inverse Micelle  Hexagonale Phase II	> 1

Abbildung 3 Aggregatstrukturen von Phospholipiden in Abhängigkeit von ihren Packungsparametern; Modifiziert nach (14, 15)

$$P = \frac{V}{A * l}$$

P = Packungsparameter

V = Volumen des hydrophilen Kopfteils

A = optimale Oberfläche des hydrophoben Kopfteils

l = Länge der Acylketten

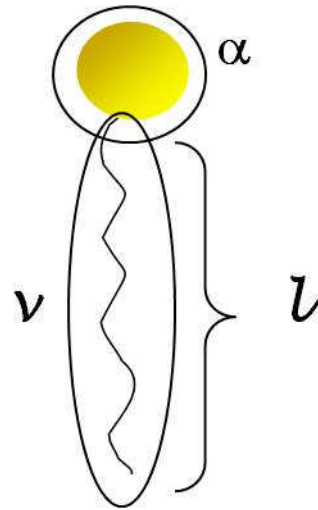


Abbildung 4 Packungsparameter von Phospholipiden

Phospholipide sind unter anderem durch ihre Phasenumwandlungstemperatur (T_m) gekennzeichnet, bei der diese von der soliden Gel, in die flüssig-kristalline Phase übergehen. Die Phasenumwandlung erfolgt in drei Phasen über 4 verschiedene Phasenzustände der Lipidmembran.

Phasenzustände		Anordnung der Lipide	Phasenumwandlungen	
L _c	Gelphase 1	Lammelar; kristallin	T_c	Subumwandlung
L _β	Gelphase 2	Lammelar; all-trans; Neigungswinkel 30°	T_p	Vorumwandlung
P _β	Gelphase 3	Wellen „Ripple „Phase	T_m	Hauptumwandlung
L _α	Flüssig-Kristalline Phase	Neigungswinkel 120° trans-gauche		

Tabelle 1 Thermotrope Phasenzustände

In der Gelphase sind alle Acylketten geordnet und liegen gestreckt in der all-trans Position vor. So entstehen maximale hydrophobe und Van-der-Waals-Kräfte zwischen den einzelnen Molekülen. Bei der T_m des Lipids kommt es zu einer isomerischen Änderung der Konformation der Acylketten von der all-trans zur trans-gauche Position. Die kinetische Energie führt dabei zu einer Rotation in den Kohlenstoffbindungen der Acylketten, so dass diese Winkel von 120 °C bilden. Sind Phospholipide in einer Bilayermembran angeordnet, so führt die Abwinkelung der Acylketten zu einer Unordnung und einer molaren Volumensteigerung in der Membran. Die Bindungskräfte zwischen den Molekülen nehmen hierdurch ab. Im Bereich der T_m kommt es bei TSL zur maximalen Freisetzung des Wirkstoffs.

Die T_m ist spezifisch für jedes Lipid und abhängig von der Länge und Sättigung der Acylketten sowie der Struktur und Ladung der Kopfgruppe (Tabelle 2). Bei Lipiden mit langen, gesättigten Acylketten sind die Bindungskräfte zwischen den Molekülen stärker als bei Lipiden mit kurzen, ungesättigten Acylketten. Dies wirkt sich in einer höheren T_m aus.

Lipid	Kopfgruppe	T_m [°C]
DPPC	Cholin	41,5
DSPC	Cholin	56
DPPG	Glycerin	40,2
DPPG ₂	Diglycerin	39,7
DPPG ₃	Triglycerin	40,8
P-Lyso-PC	Cholin	3
S-Lyso-PC	Cholin	26

Tabelle 2 Phasenumwandlungstemperaturen ausgesuchter Phospholipide

Sind verschiedene Lipide in einer Doppelmembran angeordnet resultiert dies in einer T_m , die zwischen den T_m der einzelnen Lipide liegt. Da verschiedene Lipide in der Membran unregelmäßig verteilt sein können, bestehen bei der T_m häufig beide Phasen gleichzeitig in einer Membran. Es entstehen sogenannte Domänen, was zu Spannungs- (Membranen in der Gelphase) und Druckzonen (Membranen in der flüssig-kristallinen Phase) in der Membran führt. Bei Abkühlung der Liposomenmembran unter ihre T_m zurück zur Gelphase werden die Domänen in der Gelphase größer und treffen an ihren Grenzflächen aufeinander. Da die Kristallgitter der einzelnen Domänen eine unterschiedliche Ausrichtung im Raum besitzen, entsteht keine runde Kugel, sondern eine polygonale Struktur, vergleichbar mit einem Fußball. Die Grenzflächen werden *grain boundaries* genannt. Hier besteht die maximale Unordnung in der Membran, verbunden mit der höchsten Permeabilität. Durch Segregation bestimmter Lipide an *grain boundaries* kann die Permeabilität während der T_m wesentlich gesteigert werden (siehe 2.1.4). Ist dagegen Cholesterol Bestandteil der Liposomenmembran führt dies zu deren Stabilisierung während der T_m . Die 3 β -Hydroxylgruppe des Sterolgerüsts von Cholesterin fügt sich zwischen die Kopfgruppen der Phospholipide ein und erhöht hierdurch die Packungsdichte in der flüssig-kristallinen Phase. Zudem wird die trans-gauche

Isomerisation der Acylketten verhindert. Abhängig vom Cholesterolgehalt der Liposomenmembran sinkt somit die Permeabilität der Membran während ihrer T_m . Beträgt dieser >25 mol % wird anstelle der flüssig-kristallinen Phase eine flüssig-geordnete Phase (engl. *liquid ordered phase* I_0) ausgebildet. Eine schnelle Freisetzung des Wirkstoffs bei der T_m ist hier nicht mehr möglich, so dass TSL in der Regel kein oder nur geringe Anteile an Cholesterol in der Membran besitzen. Da Cholesterol jedoch die Komplementaktivierung in Serum verhindert wird es insbesondere bei sehr instabilen Formulierungen zur Verlängerung der Zirkulationszeit der Liposomenmembran zugesetzt (12);(13).

2.1.3 Liposomen zum *drug targeting* und *drug delivery*

Drug targeting mit Hilfe von Liposomen ist durch zwei Schritte gekennzeichnet:

1. Transport des Arzneimittels im Liposom zum gewünschten Wirkort
2. Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Liposom

Ein großer Vorteil von Liposomen im Vergleich zu anderen Nanocarriern ist, dass sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe in hohen Konzentrationen transportiert werden können. Chemisch labile oder schnell metabolisierte Wirkstoffe werden durch die Liposomenmembran vor Zersetzung bzw. enzymatischem Abbau geschützt. Liposomen sind biokompatibel und sind daher im Gegensatz zu Wirkstoffträgern, die z.B. Polymerlösungen enthalten, weder toxisch noch allergen, was auf ihre Ähnlichkeit mit Membranstrukturen des Organismus zurückzuführen ist. Obwohl sie größer als der freie Wirkstoff sind überwinden Liposomen auch biologische Barrieren wie Zellmembranen oder die Blut-Hirn-Schranke. Liposomen können zudem speziell im Tumor bei ausreichender Zirkulationszeit passiv akkumulieren, da sich Tumorgefäße durch geweitete interendotheliale Verbindungen und Fenestrierungen strukturell von physiologischen Blutgefäßen unterscheiden (PEGylierung siehe 2.1.). Um die Anreicherung im Tumorgewebe gezielt zu erhöhen (aktives Targeting) können verschiedene Liganden, wie monoklonale Antikörper (16), Peptide (z.B. Phagenfusionsprotein Wang 2010), *small molecule ligands* (Vitamin-, Folat- oder Wachstumsfaktorliganden (17, 18), Transferrin (19) oder Oligosaccharide (20), an die Liposomenoberfläche oder ans distale Ende von PEG-Molekülen der Liposomenmembran gebunden werden. Zum einen kann hierdurch die Akkumulation der Liposomen im Tumorgewebe gesteigert werden, zum anderen soll die aktive Endocytose der Liposomen durch Krebszellen gesteigert werden, um Multidrug-Efflux-Pumpen wie p-Glycoprotein zu umgehen. Problematisch ist unter anderem, dass die Vektoren mit den PEG-Molekülen auf der Liposomenoberfläche konkurrieren und die PEG-Moleküle über das Liposom hinaus auch die Vektoren selbst abschirmen. Durch

Variation des Molgewichts der PEG-Moleküle und der Position der Bindungen (21) konnten die Liposomenformulierungen jedoch verbessert werden.

Über das *targeting* hinaus ist die Freisetzung des Wirkstoffs für ein effektives System von besonderer Bedeutung. Stealth-Liposomen haben zwar den Vorteil durch ihre lange Zirkulationszeit im Tumorgewebe angereichert zu werden, aber aufgrund hoher Stabilität ist ihre Wirkstofffreisetzung problematisch. Diese erfolgt passiv durch Diffusion und nach Destabilisierung der Liposomenmembran im Interstitium oder intrazellulär nach Endozytose. Der Nachteil ist, dass die Freisetzung nicht kontrolliert werden kann und sehr langsam verläuft, so dass trotz lokal hoher Wirkstoffspiegel das Arzneimittel nicht bioaktiv ist. So führen diese Formulierungen zwar zu einer Reduktion der systemischen NW, die erhoffte Effizienzsteigerung der Wirkstoffe bleibt aber aus. Daher wurden viele Möglichkeiten der aktiven Freisetzung des Wirkstoffs erforscht. Nicht kontrollierbare Trigger wie pH-Sensitivität der Liposomen sind auf Ziele beschränkt, die bestimmte Bedingungen am Wirkort aufweisen. z.B. sind entzündliches Gewebe und schlecht durchblutete Tumoreale generell eher azidotisch. Zudem besteht die Möglichkeit dass Liposomen nach Endozytose mit Lysosomen (pH 4,5 - 5,0) fusionieren (22). Stärke, Ausmaß und Zeitpunkt des pH-Werts können vom Therapeuten jedoch nicht beeinflusst werden. Dagegen kann die Freisetzung durch Trigger, die durch den Menschen von außen angebracht werden zeitlich und regional gesteuert werden. Voraussetzung ist, dass die Liposomen bis zur Anbringung des Triggers stabil sind und kein weiterer natürlicher Trigger zur Freisetzung führen kann. Äußere Trigger sind z.B. Wärme, Licht oder Ultraschall.

Passiv	Aktiv
<ul style="list-style-type: none"> EPR-Effekt Ziel: Tumorgewebe Erkennung vom RES Ziel: Zellen des Immunsystems; Immunorgane (Leber und Milz) 	<ul style="list-style-type: none"> Antikörper Peptide Oligosaccharide

Tabelle 3 *Passives und aktives drug targeting*

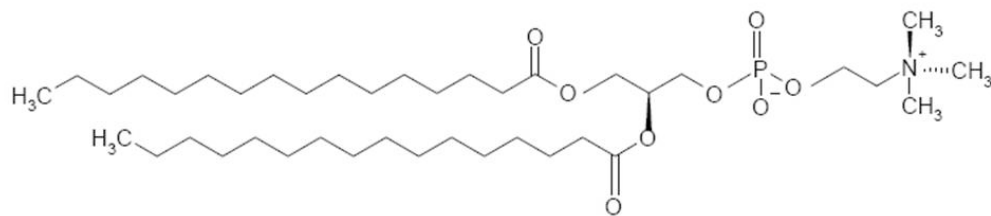
Passiv	Aktiv	
	<u>Interne Trigger</u>	<u>Äußere Trigger</u>
<ul style="list-style-type: none"> Diffusion über die Liposomenmembran Destabilisierung der Liposomenmembran Endocytose und intrazellulärer <i>drug release</i> 	<ul style="list-style-type: none"> pH-Wert Enzyme 	<ul style="list-style-type: none"> HT Ultraschall (HIFU) Licht

Tabelle 4 *Passive und aktive drug delivery Systeme*

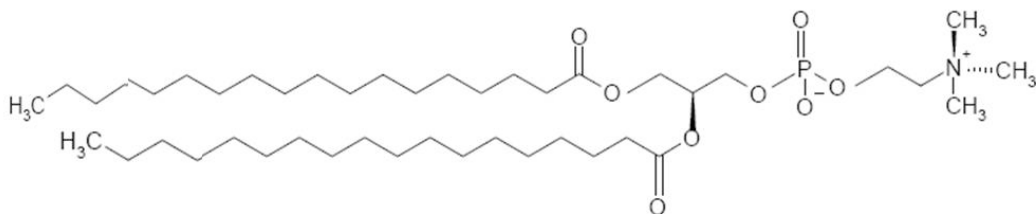
2.1.4 Thermosensitive Liposomen

TSL haben den Vorteil, dass die Wirkstofffreisetzung durch geringgradige Erwärmung des erkrankten Gewebes gezielt erfolgt. Liposomen werden als thermosensitiv bezeichnet, wenn sie bei ihrer T_m , basierend auf den T_m der einzelnen Lipide, den Wirkstoff schnell freisetzen.

Yatvin und Weinstein stellten 1978 in der Fachzeitschrift *Science* mit DPPC:DSPC 75:25 (m/m) die erste TSL-Formulierung vor (23). Diese Formulierung war für eine klinische Anwendung jedoch noch nicht ausgereift. Die T_m von 44 °C war zu hoch für eine klinisch relevante HT und die Applikation der regionalen HT sowie dafür geeignete Geräte waren klinisch noch nicht etabliert. Problematisch war zudem eine langsame und nur unzureichende Wirkstofffreisetzung. Da jedoch das hohe Potential der TSL im Bereich *drug targeting* erkannt worden war, wurde nach weiteren Formulierungen mit niedrigeren T_m und rascher Wirkstofffreisetzung geforscht. (13, 24-26).



Strukturformel 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin [DPPC]



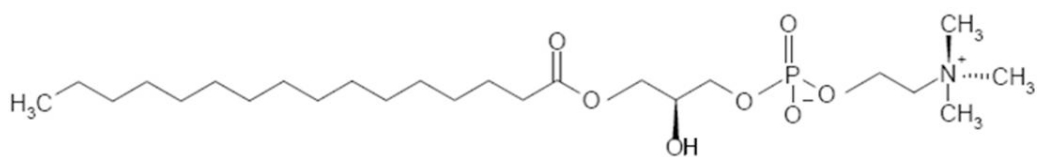
Strukturformel 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin [DPPC]

Abbildung 5 Strukturformeln der Phospholipide DPPC und DSPC

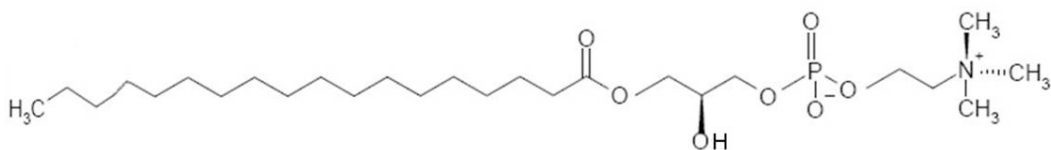
Die Optimierung der Lipidkomposition für ein effektives *drug targeting* und *drug delivery* stellte sich in der Folgezeit jedoch komplexer und kritischer dar, als zunächst erhofft. Liposomen, die eine ausreichende Stabilität im Plasma aufwiesen setzten den Wirkstoff erst bei sehr hohen, für eine klinische Anwendung nicht akzeptablen Temperaturen frei. Außerdem erfolgte die Freisetzung verzögert, unvollständig und über einen weiten Temperaturbereich, so dass keine präzise Kontrolle der Freisetzung durch HT möglich war. Ein weiteres Problem stellte wie bei anderen Liposomen die schnelle Elimination durch Zellen des RES dar. DPPC:P-Lyso-PC:DSPE-PEG₂₀₀₀ 90:10:4 (m/m)

ist die erste Formulierung, welche in klinischen Studien eingesetzt wird. Sie wurde an der Duke University in den USA entwickelt und wird durch Celsion Corporation unter dem Namen ThermoDox™ hergestellt. Diese TSL-Formulierung setzt innerhalb von 20 Sekunden 100 % des eingeschlossenen Dox frei (27). Bei der schnellen Freisetzung des Liposomeninhalts spielen die Lyso- und PEG-Lipide eine entscheidende Rolle. Beide segregieren während der T_m überwiegend an den ungeordneten Stellen der Membran, wie z.B. an den *grain boundaries*. Die T_m von Lyso- und PEG-Lipiden ist niedriger als die von DPPC und DSPC, so dass die Umwandlung von der Gel- zur flüssig kristallinen Phase an den *grain boundaries* beginnt und micellare Strukturen in der Membran gebildet werden. Dies führt zur Entstehung von Poren in der Liposomenmembran, dessen Ränder von den micellaren Strukturen stabilisiert werden. Außerdem wird der Abgang von micellaren Discs bei höheren Lysolipidkonzentrationen diskutiert (28, 29). Die Porenbildung ermöglicht damit neben den strukturellen Defekten an den *grain boundaries* eine sehr schnelle Freisetzung des Wirkstoffs („burst release“) bei der T_m der ThermoDox™ Formulierung. Die PEG-Lipide haben die zweite Funktion, die Liposomen vor Zellen des RES abzuschirmen und die Zirkulationszeit zu verlängern (siehe 2.1)

In einer Phase-I Studie, bei denen Sarkome oder Karzinome von Hunden mit ThermoDox™ und lokaler HT mittels Mikrowellen behandelt wurden, zeigte sich allerdings, dass das Nebenwirkungsprofil (Neutropenie; Kardiotoxizität, Nephrotoxizität) stark demjenigen von FDox gleicht. Die maximal tolerierte Dosis (MTD) lag sogar etwas unterhalb von FDox und Doxil®. Die ersten vier Tiere reagierten trotz Infusion über einen Zeitraum von bis zu 30 min mit Blutdrucksenkung und Hyperventilation. Die Autoren führten diese Toxizität auf eine Aktivierung des Komplementsystems durch die Liposomen verbunden mit Histaminausschüttung zurück.

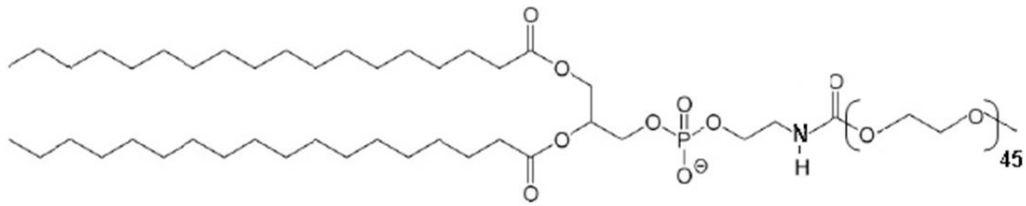


Strukturformel 1-Palmitoyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholin [P-Lyso-PC]

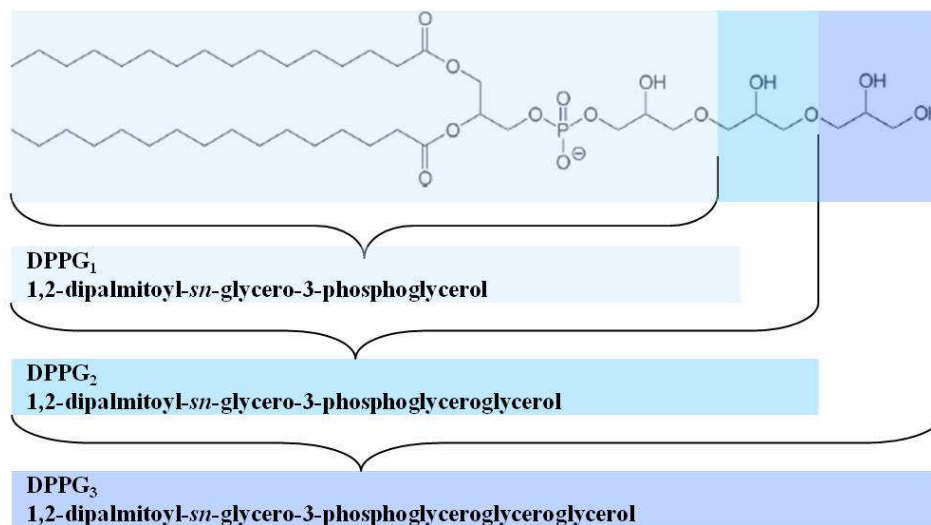


Strukturformel 1-Stearoyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholin [S-Lyso-PC]

Abbildung 6 Strukturformeln der Lysolipide

Strukturformel DSPE-PEG₂₀₀₀1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylene-glycol)-2000]**Abbildung 7 Strukturformel DSPE-PEG₂₀₀₀**

Nach Prämedikation der Tiere mit Antihistaminika und Steroiden traten diese Symptome nicht mehr auf. Pharmakokinetische Daten von ThermoDoxTM glichen in dieser Studie eher freiem Doxorubicin als Doxil[®]. Dies ist entweder auf eine geringe Stabilität *in vivo* oder die schnelle Freisetzung von Dox im hyperthermierten Tumorgewebe zurückzuführen. ThermoDoxTM wird derzeit in leicht variierten Formulierungen (DPPC:S-Lyso-PC:DSPE-PEG₂₀₀₀ 85:9,8:5,2 (m/m)) in zwei klinischen Studien am Menschen getestet. Nach Abschluss einer Phase-I Studie beim hepatozellulären Karzinom (HCC) in Kombination mit RFA (Radiofrequenzablation; engl: radiofrequency ablation) wird die Effizienz von ThermoDoxTM seit Januar 2008 in einer Phase III Studie untersucht. Im August 2010 verkündet Celsion, dass das National Cancer Institute im Journal of Oncology diese Studie als Vorrangig zur Therapie der HCC empfehle. Für diese Indikation erhielt ThermoDoxTM von der FDA außerdem den „*orphan drug*“- Status. Bei der zweiten Studie (Phase I/II) handelt es sich um einen Dosis-Eskalationsversuch bei Thoraxwandrezidiven von Mammakarzinomen (RBC). Hier sind derzeit jedoch noch keine Veröffentlichungen verfügbar.

**Abbildung 8 Strukturformeln DPPG_n**

TSL basierend auf den synthetischen Phosphoglycerolmolekülen PG₂ (DPPC:DSPC:DPPG₂ 50:20:30 m/m) und PG₃ (DPPC:DSPC:DPPG₃ 50:20:30 m/m) weisen ähnliche Charakteristika auf wie Lyso-PC basierte TSL (1). PG₂ bzw. PG₃ sind an ihrer Kopfgruppe mit einem bzw. zwei zusätzlichen Molekülen Glycerin verestert. Mit steigender Glycerinanzahl erhöht sich ebenfalls die Anzahl der freien Hydroxylgruppen und damit die Polarität der Moleküle (30). Dies ermöglicht die Auftrennung der beiden Lipide mittels Dünnschichtchromatografie (siehe 4.2.4.). In einer Toxizitätsprüfung am bebrüteten Hühnerei (HET-CAM-Test für engl. hen's egg test on chorioallantoic membrane) wurde bei einer Konzentration von 5% für DPPG₁, DPPG₃ keine Toxizität (Reizindex = 0,0) festgestellt. DPPG₂ führte zu einer schwachen, transienten Reizreaktion (Reizindex 3,3).

PG₂- und PG₃-TSL (Dox) besitzen vergleichbare Freisetzungsraten bei einer um etwa ein Grad Celsius höheren T_m als Lyso-PC TSL (Dox). Daher wird ein ähnlicher Freisetzungsmechanismus (Porenbildung an den grain boundaries) wie bei Lyso-PC basierten Liposomen vermutet, was bisher jedoch noch nicht genauer untersucht wurde. PG-TSL besitzen im Gegensatz zu Lyso-PC TSL (Dox) ein negatives Oberflächenpotential, welches in der Regel zu einer stärkeren Aktivierung des Komplementsystems und einer schnelleren Elimination der Liposomen durch Zellen des RES führt (31). Dennoch zeigen DPPG_n-TSL (Dox) *in vitro* und *in vivo* bei Körpertemperatur eine höhere Stabilität gegenüber Lyso-PC TSL (Dox), was ein Vorteil für die klinische Anwendung der DPPG_n-TSL (Dox) sein könnte. Als Grund für die geringere Stabilität der Lyso-PC TSL (Dox) wird die Größe (2000 Da) des PEG-Moleküls als Anhang an die Kopfgruppe von DSPE diskutiert (1). Diese tendiert abhängig von der Konzentration in der Liposomenmembran zur Bildung zusätzlicher Strukturen wie Mizellen oder mizellaren Discs und kann somit zu Membranstabilitäten führen. Dagegen besitzen DPPG₂ und DPPG₃ nur eine Kopfgruppenmodifikationen von 74 Da bzw. 148 Da, bei denen diese Beobachtung nicht zutrifft.

Die schnellen Freisetzungsraten sowohl der PG-basierten, als auch der Lyso-PC basierten TSL machen eine Freisetzung des Wirkstoffs im Blutgefäßsystem des Tumors möglich. Diese Strategie ist insbesondere geeignet, wenn der eingeschlossene Wirkstoff eine starke Gewebefixierung aufweist. Ist dies nicht der Fall wird nur ein geringer Anteil ins Tumorgewebe diffundieren und der Großteil über das Blutgefäßsystem den Tumor verlassen, so dass das eigentliche Ziel der lokalen Wirkstoffanreicherung verfehlt würde. Da direkt im Anschluss an die intravenöse Injektion der Liposomenlösung die höchsten Wirkstoffkonzentrationen im Blutstrom zu erwarten sind, sollte die HT-Behandlung gleichzeitig mit der Applikation durchgeführt werden. Von Vorteil bei dieser Strategie ist nicht nur der hohe Wirkstoffspiegel zum Zeitpunkt der Freisetzung, sondern auch eine

mögliche Zerstörung der Tumorgefäße (32). Auch Wirkstoffe mit geringer, schwacher Gewebefixierung können mittels TSL transportiert werden. Da eine Wirkstofffreisetzung in diesem Fall jedoch erst sinnvoll ist, wenn die Liposomen im Tumorgewebe vorliegen, sollte die HT-Behandlung versetzt zur Applikation der Liposomenlösung erfolgen. So kann eine Anreicherung der TSL ähnlich der Stealth-Liposomen über den EPR-Effekt erfolgen. Allerdings ist zu erwarten, dass derzeitige TSL-Formulierungen zu geringeren intratumoralen Wirkstoffkonzentrationen führen dürften als Stealth-Liposomen, da ihre Halbwertszeit im Plasma geringer ist. Außerdem sind höhere NW zu erwarten, da mehr Wirkstoff unspezifisch freigesetzt würde. Nach der HT-Behandlung würde der intratumorale Wirkstoff im Gegensatz zu den Stealth-Liposomen allerdings vollständig bioaktiv vorliegen. Welche Formulierung oder Methode zu den höchsten lokalen, tumoralen bzw. niedrigsten Wirkstoffkonzentrationen im gesunden Körpergewebe führen ist bisher nicht bekannt.

2.2 Doxorubicin

Doxorubicin (Synonyme: Hydroxyldaunorubicin, Adriamycin, Adriablastin, Adriacin, Rubex) gehört innerhalb der antibiotischen Zytostatika zur Wirkstoffgruppe der Anthrazykline und ist ein 14-Hydroxyderivat von Daunorubicin. Man unterscheidet zwischen den natürlichen Anthrazyklinen wie Dox, Daunorubicin und Aclarubicin und den halbsynthetischen Analoga Epirubicin und Idarubicin (2. Generation). Anthrazykline sind amphiphatische Moleküle. Derzeit befindet sich die dritte Generation Anthrazykline (Disaccharidische Derivate), zu denen z.B. Sabarubicin (MEN 10755) zählt, in ersten klinischen Studien (33). Anthrazykline besitzen einen coplanaren, hydrophoben, von Naphthacen abgeleiteten Anthrachinonkern, der aus 3-4 aneinander fixierten, aromatischen Ringen besteht und der an Position C-7 einen hydrophilen Aminozucker (Daunosamin) alpha-glykosidisch gebunden hat. Dox hat am C-13-Kohlenstoffatom eine Hydroxymethylgruppe, Daunorubicin eine Methylgruppe. Die zusätzliche Hydrogenbindung führt zu einer erhöhten Hydrophilität von Dox. Dox wurde 1969 erstmals aus dem Bakterium *Streptomyces peuceus subspecies caesius* isoliert. Diese Subspezies wurde durch induzierte Mutationen mittels N-nitroso-N-Methylurethan aus *Streptomyces peuceus* gewonnen, welches den Prototyp der Anthrazykline Daunorubicin synthetisiert. Beheimatet ist das Bakterium ursprünglich im Adriatischen Meer – daher der frühere Name Adriamycin. Dieser wurde entsprechend einer Namenskonvention in Dox umbenannt (Dox = *dissolved oxygen*; Rubicin: roter Fluoreszenzfarbstoff). Obwohl seit der Entdeckung von Dox in den 70er Jahren viele neue antineoplastische Wirkstoffe entwickelt wurden, ist Dox noch immer eines der effektivsten und meist eingesetzten Wirkstoffe innerhalb der medikamentösen Tumorthherapie. Während Daunorubicin und Idarubicin hauptsächlich bei hämatologischen Tumoren (v.a. akuten Leukämien)

verwendet wird hat Dox ein breiteres Wirkungsspektrum, welches insbesondere die Gruppe der soliden Tumoren einschließt.

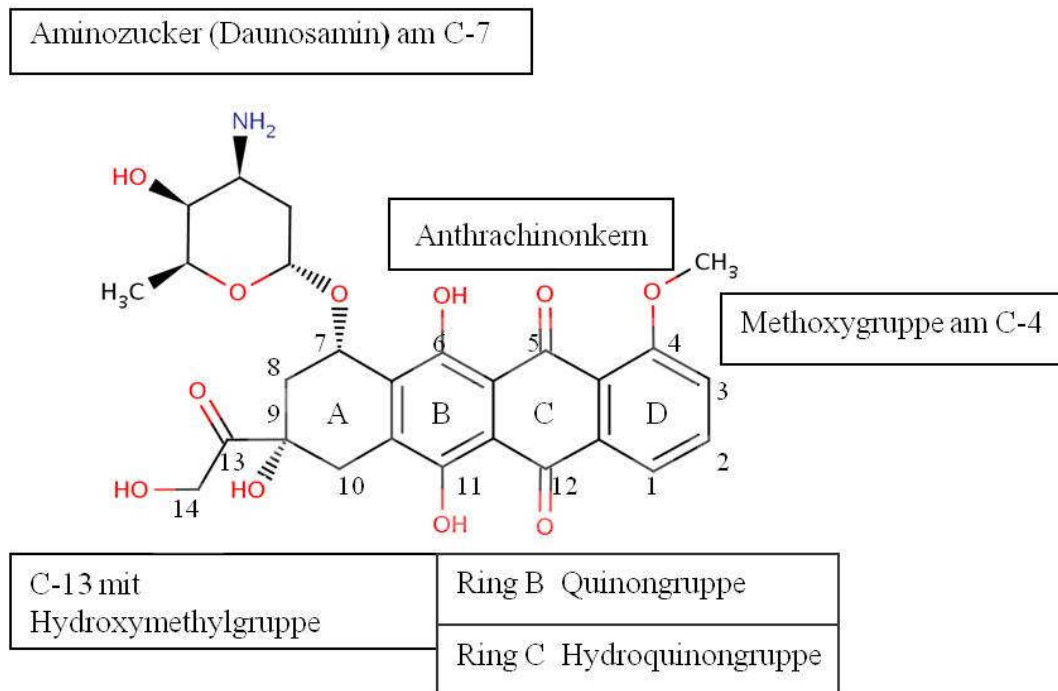


Abbildung 9 Strukturformel Doxorubicin

Die antitumorale Wirkung der Anthrazykline summiert sich aus verschiedenen Effekten, deren separate quantitative Bedeutung am Gesamteffekt noch diskutiert wird. Jahrelang galt die senkrechte Interkalation des planaren Anthrazyklinrings zwischen zwei Basenpaare der DNA-Doppelhelix zu den Hauptmechanismen. Dies führt zu einer sterischen Behinderung der Bindung der Enzyme für Replikation und Transkription (34), wobei der Aminozucker durch hydrogene Bindung an das Zuckerphosphat-Rückgrad sowie Van-der-Waals-Kräfte Stabilität gewährleistet. Es besteht eine Präferenz für die Sequenzen mit häufiger Cytosin – Guanin Nukleinbasenpaarung in den Promotorregionen der Gene. Derzeit wird für klinisch relevante Dosierungen jedoch die Wirkung als Topoisomerase II α – Gift als wichtigste antineoplastische Wirkung diskutiert. Dox stabilisiert eine Zwischenreaktion, bei der DNA-Stränge durch die Topoisomerase geschnitten werden. Es bindet kovalent an Tyrosinreste der Topoisomerase II, so dass ein Dreifachkomplex „DNA-Topoisomerase II-Dox“ entsteht. Ist die Topoisomerase II in ihrer Funktion behindert, kann die notwendige Dekondensierung der Doppelhelix zur Replikation und Transkription nicht mehr stattfinden. Somit werden sowohl Zellteilung als auch Proteinbiosynthese beeinträchtigt was zur Apoptose der Zelle führt. Des Weiteren werden Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und Lipidperoxidation durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Superoxidanionenradikalen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikalen ($\cdot OH$) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie Austausch von

Schwesterchromatiden als Wirkungen von Dox beschrieben. Diese scheinen für die antineoplastische Wirkung jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen (35) und vorwiegend die Ursache für NW der Anthrazykline (insbesondere die Kardiotoxizität) zu sein.

2.2.1 Physikalische Eigenschaften von Dox

Doxorubicinhydrochlorid ist ein rotoranges, hygroskopisches, kristallines Pulver, welches gut löslich in Wasser ist.

Internationaler Freiname	Doxorubicin
Systematischer Name (IUPAC)	(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-Amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracen-5,12-dion
Chemische Formel	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁
Molekulargewicht	543,5174061 g/mol
MG Dox-HCL	580 g/mol
Fluoreszenz	
Anregung	$\lambda = 470 \text{ nm}$
Emission	$\lambda = 500\text{-}600 \text{ nm}$

Tabelle 5 Physikalische Eigenschaften von Dox

2.2.2 Pharmakokinetische Eigenschaften von Dox

Plasmaproteinbindung	ca. 75 %
Distribution	Multiphasische Verteilungskinetik T _{1/2α} 12 min T _{1/2β} 25 – 30 h
Verteilungsvolumen	500-2900 l/m ² Körperoberfläche
Metabolismus	Leber (Cytochrom P 3450 3A4)
aktiver Metabolit	Doxorubicinol (Aldo-Keto-Reduktase)
inaktive Metaboliten	Adriamycinol, Deoxyrubicinaglykon, Glucuronide, Sulfatkonjugate
Exkretion	Galle: Faeces (40-50 %) innerhalb von 7d Niere: Urin (5-15 %) innerhalb von 5d

Tabelle 6 Pharmakokinetische Eigenschaften von Dox (Mensch)

2.2.3 Anwendungsgebiete zugelassener Doxorubicinpräparate

Sarkome	Ewing-Sarkom
	Rhabdomyosarkom
	Weichteilsarkom
	Osteosarkom
Karzinome	Mamma-, Ovarial-, Endometriumkarzinom
	Schilddrüsen-, Magen-, Harnblasenkarzinom
	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)
Hämoblastosen	Non-Hodgkin-Lymphom
	Hodgkin-Lymphom
	Akute lymphatische Leukämie
	Multipl. Myelom
Blastome	Neuroblastom
	Nephroblastom (Wilms-Tumor)

Tabelle 7 Anwendungsgebiete zugelassener Dox-Präparate

2.2.4 Nebenwirkungen von Doxorubicin

Die Summe der Wirkungen von Dox führt zu einer starken Toxizität, welche sich nicht spezifisch auf Tumorzellen sondern auf alle Zellen (insbesondere in exponentieller Wachstumsphase) bezieht. Hierdurch ergibt sich ein breites Nebenwirkungsspektrum (siehe Tabelle). Daher wird Dox, obwohl es zu den Anthrazyklin-Antibiotika zählt ausschließlich in der Tumorthherapie und nicht zur antibakteriellen Therapie verwendet. Außerdem wird Dox in der Regel mit anderen Zytostatika kombiniert, um deren additive und synergistische Wirkungen auszunutzen und die Dosis des einzelnen Zytostatikums reduzieren zu können. Akut dosislimitierend, jedoch reversibel für Dox ist die Myelosuppression. Dagegen sind neben der ebenfalls reversiblen, aber seltener auftretenden akuten Kardiotoxizität insbesondere die für Dox spezifische, dosisabhängige chronische Kardiomyopathie und kongestive Herzinsuffizienz ein längerfristiges Problem. Sie gehören zu den schwerwiegenden, häufigen NW, deren zugrunde liegende molekulare pathologische Mechanismen kontrovers diskutiert werden. Übereinstimmung findet jedoch die Hypothese der Herzmuskelschädigung durch die Bildung eines Überschusses an ROS durch Anthrazykline-Eisenkomplexe. ROS wiederum führen zu vielfältigen Zelldefekten, wie Peroxidation von Membranlipiden, DNS-Schäden und Veränderungen von Proteinaktivitäten. Außerdem leiten sie die Apoptose der Herzmuskelzellen ein und beeinflussen die Genexpression. Dass insbesondere das

Myokard betroffen ist, wird durch dessen relativ niedrigen Spiegel an Enzymen wie Dismutasen und Katalasen erklärt, welche für eine Inaktivierung der ROS zuständig sind. Bisher wurde aufgrund früher Studien in dem 70er Jahren stets empfohlen eine maximale kumulative Doxorubicindosis von 550 mg/m^2 Körperoberfläche nicht zu überschreiten, da ab dieser die Inzidenz der Kardiomyopathien erheblich zunimmt (36). In aktuellen Studien (37) werden für diese Dosis jedoch viel höhere Prävalenzen ($\sim 26 \%$) beschrieben, was auf verbesserte diagnostische Möglichkeiten als auch einen längeren Beobachtungszeitraum der Patienten zurückzuführen ist. Zudem schwanken die Angaben der Abhängigkeit von Dosis und Kardiotoxizität stark – so dass die Entwicklung einer kongestiven Kardiomyopathie nicht ausschließlich von der Dosis sondern auch von individuellen Eigenschaften (genetische Prädispositionen) abhängig zu sein scheint.

Da insbesondere Peak-Plasmakonzentrationen das Risiko für den Patienten steigern, an einer Kardiomyopathie zu erkranken (38) ist eine Infusion über einen längeren Zeitraum (6-96 h) diesbezüglich vorteilhafter als eine Bolusinjektion. Jedoch erhöht dies wiederum die Gefahr einer Paravasation des Zytostatikums, was mit schwersten Gewebenekrosen einhergehen kann. Zudem werden andere NW wie Mukositis und Myelosuppression bei längeren Infusionszeiten häufiger beobachtet als bei Bolusinjektionen.

Die Suche nach einem Anthrazyklinderivat mit vergleichbarer Effektivität zu Dox aber reduzierter Kardiotoxizität war bislang nicht erfolgreich. 2007 wurde das erste Präparat (CARDIOXANE®; Wirkstoff Dexrazoxan) zur Vorbeugung von chronischer kumulativer Kardiotoxizität durch Verwendung von Dox oder Epirubicin zugelassen. Das EDTA-Analogon Dexrazoxan bildet mit Metallionen, wie z.B. Fe^{3+} oder Cu^{2+} Chelate. So wird die Komplexbildung von Eisen mit Anthrazyklinen herabgesetzt und die Bildung der herzscheidigenden ROS verringert. Jedoch zeigte sich auch, dass es in Kombination mit Dexrazoxan besonders bei angestrebten höheren Doxorubicindosen zu einem signifikanten Anstieg der myelosuppressiven Wirkungen (insbesondere Neutropenie und Thrombozytopenie) der Chemotherapie kommt. Ziel ist es daher so geringe Doxorubicinkonzentrationen im Herzgewebe zu erreichen wie möglich, z.B. durch Veränderung der pharmakokinetischen Eigenschaften dieses Chemotherapeutikums.

2.2.5 Liposomales Doxorubicin und Stealth-Liposomen

Mit der Einführung der ersten liposomalen Doxorubicinpräparate Caelyx® (1996) und Myocet® (2000) konnte die Kardiotoxizität von Dox signifikant verringert werden (39). Myocet® (früher Evacet™) und Caelyx® (USA: Doxil) sind zwei Formulierungen, deren unterschiedliche Lipidzusammensetzung ihrer Liposomenmembran die Pharmakokinetik (PK) von Dox entscheidend beeinflussen. FDox besitzt eine schnelle und starke Gewebefixierung, ein hohes Verteilungsvolumen und eine kurze Plasmahalbwertszeit $T_{1/2\alpha}$

von 12 min beim Menschen. Eingeschlossen in Liposomen ist es weder bioaktiv noch wird es selber metabolisiert. Myocet[®] (Lecithin-Cholesterin 55:45 m/m) mindert die maximale Plasmakonzentration (*peak*), welche nach Infusion von FDox auftritt. Nach initialer Aufnahme der Liposomen in das RES wird der Wirkstoff hauptsächlich von Makrophagen in der Leber und Milz freigesetzt. Durch eine langsame erneute Freisetzung von Dox aus diesem RES-Depot, wird eine anhaltende Infusion nachgeahmt. Die AUC (Area under the curve), welche der Menge eines Arzneimittels proportional ist, die den systemischen Blutkreislauf erreicht, wird dabei vergleichbar zu einer Applikation von FDox aufrechterhalten. Myocet[®] verringert die kardialen NW von Dox, die Wirksamkeit wird jedoch nicht erhöht. Caelyx[®] (HSPC:Cholesterin:MPEG₂₀₀₀ 56:38:5) hingegen zielt auf die Verhinderung des schnellen Abbaus der klassischen Liposomen durch Zellen des Immunsystems. Durch Modifikation der Liposomenmembran mit amphiphilem PEG konnte für diese so genannten „Stealth[™]-Liposomen“ eine signifikant höhere Plasmahalbwertszeit erreicht werden (40).

Auch wenn NW wie Kardiotoxizität von Dox durch die liposomale Formulierung verringert werden konnten, konnte durch Caelyx[®] wie bei Myocet kein Therapievorteil in Bezug auf die Wirksamkeit erzielt werden. Außerdem tritt im Zusammenhang mit einer Caelyx[®] -Behandlung häufig die Palmar Plantare Erythrodysesthesie (PPE), auch als Hand-Fuß-Syndrom (HFS) bezeichnet auf (41). Bei einer Behandlung mit FDox wurde die PPE bisher nicht beobachtet, sie ist jedoch ebenso charakteristisch für 5-Fluorouracil und Cytarabin. Die Ätiologie ist nicht eindeutig geklärt. Vieles deutet auf eine Akkumulation der Liposomen in der Haut (42) und einer vermehrten Ausscheidung der Zytostatika über ekkrine Schweißdrüsen hin, die insbesondere an Hand- und Fußsohlen stark vertreten sind. Anfänglich milde Symptome wie Dysästhesien und Erytheme an Hand und Fußsohlen können sich innerhalb weniger Tage verschärfen und Hautrisse, Ulzerationen sowie starke Schmerzen nach sich ziehen. Auch wenn die PPE im Gegensatz zur Kardiotoxizität von Dox keine lebensbedrohliche NW darstellt kann sie den Patienten psychisch stark belasten und zu enormen Einschränkungen im Alltag führen. Da die PPE dosisabhängig ist und sowohl von der Peak-Plasmakonzentration als auch der kumulativen Dosis beeinflusst wird (43) ist eine Unterbrechung der Therapie oder Dosisreduktion häufig die effektivste Gegenmaßnahme. Die Folge ist eine Beeinträchtigung der Therapiewirksamkeit.

Zulassungsgebiete für Myocet und Caelyx[®]

Myocet[®]

- In Kombination mit Cyclophosphamid für die First-line-Behandlung von metastasiertem Brustkrebs

Caelyx®

- Als Monotherapie bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom mit erhöhtem kardialen Risiko
- Patienten mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nach Versagen einer platinhaltigen First-Line-Chemotherapie
- In Kombination mit Bortezomib zur Behandlung des progressiven multiplen Myeloms bei Patienten, die zumindest eine vorangegangene Therapie erhalten haben, und die sich bereits einer Knochenmarkstransplantation unterzogen haben bzw. dafür ungeeignet sind
- Patienten mit AIDS-assoziiertem Kaposi-Sarkom mit niedrigen CD4-Werten (<200 CD4-Lymphozyten/mm³) und umfangreichem mukokutanem und viszeralem Befall

2.3 Hyperthermie in der Krebstherapie

Hyperthermie (HT) (griechisch Überwärmung) in der Krebstherapie ist definiert als moderate Erhöhung der Gewebe- über die Körpertemperatur (39-45 °C), um einen therapeutischen Nutzen zu erhalten. Im Gegensatz zum Fieber ist bei einer durch externe Wärmezufuhr induzierten HT der Sollwert zur Regulation der Körpertemperatur im Hypothalamus nicht erhöht. So ist die passive HT zur so genannten Fiebertherapie (aktive HT) abzugrenzen, bei der durch Pyrogene (Autolysate von Bakterien, Bestandteile von Bakterienwänden) die Körperkerntemperatur durch körpereigene Mechanismen angehoben wird. Sie wurde Ende des 19. Jahrhunderts von Medizinern wie Busch, Fehleisen und William Coley als erste systemische Krebstherapie entwickelt und geht auf allgemeine Beobachtungen zurück, dass bei Krebspatienten mit fieberhafter Infektion Remissionen auftraten (44). Allerdings war zu dieser Zeit die Fieberreaktion schwer zu kontrollieren (keine standardisierten Pyrogene, fehlende Möglichkeit zur Behandlung von NW) und trotz anfänglicher Erfolge geriet die Fiebertherapie mit der Entdeckung der Radiotherapie und später den Zytostatika zur Krebsbehandlung in Vergessenheit. Sie wird gegenwärtig nur noch selten im Bereich der „biologischen Krebstherapie“ angewandt.

Ebenfalls abzugrenzen ist die HT gegenüber thermoablativen Verfahren wie laserinduzierter interstitieller Thermotherapie (LITT), hochfrequenzinduzierter Thermotherapie (HIT) und hochfokussiertem Ultraschall (HIFU; engl. *high-intensity focused ultrasound*), bei denen mittels Lasern oder fokussiertem Ultraschall über Sonden im Tumor Temperaturen von 60 - 100 °C zu irreversiblen Koagulationsnekrosen führen. Sie kommen nur bei wenigen Tumorarten als Alternative zur operativen Entfernung in Frage, z.B. bei Leberkrebs, wenn der Allgemeinzustand des Patienten eine Operation

sowie eine Chemotherapie verbunden mit dessen NW nicht mehr zulässt.

Die passive lokale und regionale HT hat heutzutage wieder einen hohen Stellenwert in der Krebstherapie erlangt. Nach einer anfänglichen Euphorie in den 70er Jahren führten einige enttäuschenden klinischen Studien in den USA zu einem Interessenverlust seitens der Wirtschaft und der medizinischen Forschung. Seitdem die Methoden der Wärmeerzeugung durch bessere technische Ausrüstung, geschultes Personal und genauere Thermometrie jedoch standardisiert wurden zeigen klinische Studien Vorteile der kombinierten Therapie gegenüber konventionellen Therapien (45), betreffend höheren Ansprechraten, verbesserter lokaler Tumorkontrolle, verbesserten palliativen Effekten oder verlängerten Gesamtüberlebensraten. Die Erfolge der letzten Jahre machen deutlich wie wichtig die korrekte Durchführung der HT für einen therapeutischen Nutzen ist.

Angewandt wird HT insbesondere an lokal fortgeschrittenen, schlecht- oder nicht-resezierbaren, primären oder rezidivierenden Tumoren definierter Größe. Standardtherapien, soweit für die vorliegende Tumorerkrankung vorhanden, werden dagegen einer zusätzlichen HT-Behandlung Vorzug gegeben. Da HT sowohl gesunde Körper- als auch Tumorzellen gleichermaßen beeinflusst wird in der Regel selektiv Tumorgewebe erwärmt. Außerdem sind Zellen sensitiver gegenüber Wärme, wenn sie sich in einer hypoxischen, nährstoffarmen Umgebung mit niedrigem pH-Wert befinden (46). Dies ist insbesondere in nekrotischen Arealen größerer Tumoren der Fall, welche entstehen wenn aus dem beschleunigten Größenwachstum eine schlechtere Durchblutung des Tumorgewebes resultiert (47). Da in wenig vaskularisiertem Tumorgewebe zudem die Wärmekonvektion beeinträchtigt ist werden hier auch höhere Temperaturen erreicht.

HT allein kann in Abhängigkeit von Ausmaß und Expositionsdauer der Temperaturerhöhung sowie Zellart und Phase des Zellzyklus (Sensibilität insbesondere in Mitose- u. S-Phase; geringe Sensibilität in der G₀-Phase) zu irreversiblen Gewebeeränderungen führen. Einen direkt zytotoxischen Effekt haben jedoch erst Temperaturerhöhungen von > 42,5 °C. Diese beruhen auf Proteindenaturierung in verschiedenen Zellkompartimenten, so dass intrazelluläre Strukturen wie Zytoskelett, Spindelapparat, Zellkern- und Organellenmembranen verändert werden. Diese strukturellen Beeinträchtigungen haben wiederum Einfluss auf den Zellmetabolismus, Zellintegrität und Zellproliferation. Direkte DNA-Schäden werden durch milde HT dagegen nicht verursacht (48). HT besitzt darüber hinaus immunmodulatorische Effekte, deren therapeutischer Nutzen Gegenstand derzeitiger Forschungsprojekte ist. HT induziert die Genexpression von Heat-Shock-Proteinen, insbesondere HSP-70 und HSP-27. Diese können als HSP-Peptid-Komplexe humane Tumorantigene präsentieren und so die Erkennung und Attackierung durch zytotoxische T-Zellen sowie NK-Zellen verbessern (49). Auf der anderen Seite sind HSP's zum Schutz zellulärer Funktionen vor

Stress zuständig. So gibt es Veröffentlichungen die zeigen, dass HSP immunologische Resistenz und Zytoprotektion induziert (50). Da die Stressantwort auf HT mehrere Tage über die Behandlungsdauer anhält sind die widersprüchlichen Ergebnisse hauptsächlich auf unterschiedlichen Analysezeitpunkten nach HT zurückzuführen.

Insgesamt konnten klinische Studien bei einer monotherapeutischen HT-Behandlung keine länger anhaltenden Remissionen aufweisen. Hinzu kommt, dass alleinige HT in einigen Tiermodellen metastasierendes Potenzial (51) aufwies. Als mögliche Ursachen wird eine veränderte metabolische Aktivität der Zellen verbunden mit geringerer Präsentation von Zelloberflächenantigenen diskutiert. Dies hat zur Folge, dass die Erkennung des Tumors durch Immunzellen beeinträchtigt und das Tumorwachstum beschleunigt wird. Somit kann es auch zu einer früheren Metastasierung kommen. Ebenso könnte die Wirkung von Enzymen, die eine Invasion der Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße sowie Gewebe katalysieren, durch HT beschleunigt werden.

Daher wird HT in der Regel mit Strahlen- und/oder Chemotherapie kombiniert (52). Milde HT (bis 43 °C) hat eine Reihe hämodynamischer Effekte zu Folge: so führt sie zu Vasodilatation, erhöhtem Blutfluss pro Zeiteinheit, und erhöhter Permeabilität von Tumorgefäßen. Systemisch applizierte Zytostatika werden vermehrt ins Tumorgewebe transportiert und es können lokal höhere Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden. Durch die verbesserte Tumordurchblutung steigt aber auch der Oxygenierungsgrad (53, 54), durch dessen Erhöhung insbesondere Radiotherapie supraadditiv begünstigt werden kann (55). Radiosensibilisierung ist auf mehrere Effekte zurückzuführen. Hypoxische Zellen sind verglichen mit gut oxygenierten Zellen relativ resistent gegenüber Strahlentherapie. Gerade diese Zellen sind wie zuvor beschrieben dagegen besonders sensibel gegenüber erhöhten Temperaturen. Weitere, molekulare Effekte der HT als Radiosensitizer werden kontrovers diskutiert. Neben der Inaktivierung von Enzymen (DNA-Polymerasen), die für die Reparatur von DNA-Schäden zuständig sind (56), wird ebenso eine Blockade der Bindungsstellen von Reparaturenzymen an die DNA durch Proteinaggregate diskutiert. Beides führt dazu, dass Doppelstrangbrüche nicht mehr repariert werden und es zu letalen Chromosomenaberrationen kommt.

Über die hämodynamischen Veränderungen hinaus steigert HT auch die zytotoxische Wirksamkeit vieler Chemotherapeutika. Dabei spielt je nach Wirkstoffklasse unterschiedliche, zum Teil komplexe Mechanismen eine Rolle. Auch der umgekehrte Weg, eine Steigerung der Zytotoxizität von HT durch Chemotherapeutika wird diskutiert (57). Zum Beispiel werden Reparaturmechanismen der Zelle durch Zytostatika verhindert, so dass thermische Schädigungen der Zelle nicht mehr behoben werden können. Die Chemosensibilisierung tritt bei alkylierenden Zytostatika (Cyclophosphamid) durch eine erhöhte Reaktionsrate auf, bei interkalierenden

Antibiotika durch eine erhöhte Zellpermeabilität und bei Bleomycin durch verminderte Reparaturmechanismen (58, 59). Für Anthrazykline, wie das in dieser Arbeit verwendete Doxorubicin, ist eine erhöhte intrazelluläre Anreicherung des Wirkstoffs beschrieben worden. Sowohl für Radio- als auch für Chemotherapie gibt die TER (*Thermal Enhancement Ratio*) Auskunft über die Erhöhung der Effizienz einer Bestrahlung bzw. eines Zytostatikums. Sie ist immer auch abhängig von der Höhe und Zeitdauer der applizierten Wärme, dem Zeitpunkt der Zytostatikagabe gegenüber HT, von der Tumorentität und der Dosis des Zytostatikums bzw. der Bestrahlung. Sie kann außerdem für Zytotoxizitätstests, Tiermodelle und klinische Studien berechnet werden. Im Tiermodell zeigte sich für Doxorubicin bei Temperaturen von 40-45 °C eine TER von 1,0 (60) und eine komplexe Interaktion, die als Wirkungsverstärkung einem additiven Effekt entspricht (61).

HT hat in Kombination mit den in dieser Arbeit verwendeten TSL zwei Funktionen. Zum einen ist sie ein Trigger zur Freisetzung des liposomal eingeschlossenen Wirkstoffes, zum anderen können die zytotoxischen Wirkungen auf Krebszellen und thermodynamische Effekte auf Tumordurchblutung, wie sie oben ausführlich beschrieben werden genutzt werden. Mit ThermoDoxTM wurde HT erstmals in klinischen Studien auch als Mittel zur Freisetzung eines liposomalen Zytostatikums genutzt.

	Indikation	Wärmeerzeugung	Geräte
Lokale Oberflächen-HT	Fortgeschrittene Tumoren, die wenige cm unter der Haut liegen (maligne Melanome; Kopf- und Hals-Karzinome, Hautmetastasen, Lymphknoten) <ul style="list-style-type: none"> ● Beckentumoren (Zervix-, Blasen- Rektumkarzinome) Weichteilsarkome; ● Mammakarzinom-Rezidive ● Lymphknotenmetastasen von HNO-Karzinomen ● Ösophaguskarzinom 	Elektromagnetische Wellen (Mikro-, Radiowellen) 50-1000 MHz; Ringapplikatoren (SIGMA-60/SIGMA-Eye) mit mehreren Antennen <ul style="list-style-type: none"> ● Elektromagnetische Wellen (70 – 100 MHz) ● Ultraschallwellen 	BSD 500 BSD 500 BSD 2000 BSD 2000 3D RF-8 Thermotron
Lokoregionale HT		<u>Invasive HT</u>	
<ul style="list-style-type: none"> ● Isolierte hypertherme Perfusion 	Lebertumoren Extremitätentumoren	Intraluminale Antennen	
<ul style="list-style-type: none"> ● Interstitielle HT 	Mammakarzinome, Prostatakarzinome	Intratumorale Antennen	BSD 500
<ul style="list-style-type: none"> ● Intrakavitäre HT 	Harnblasenkarzinom; Peritonealkarzinose	Applikatoren in Hohlorganen	
Teil- und Ganzkörper-HT	Generalisierte Tumorerkrankungen, zur Behandlung von Metastasen Wenn die Lokalisation des Primärtumors eine RHT nicht zulässt	Radiative Systeme Wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung	IRATHERM [®] 800/1000/2000 AquaTherm-System

Tabelle 8 Onkologische HT ; Einteilung

2.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden erstmals PG₂ und PG₃ basierte TSL mit enkapsuliertem Dox im Tiermodell getestet. Für die Dissertation wurde Dox für den Einschluss in die Liposomen gewählt, da es zum einen ein etabliertes, routinemäßig eingesetztes Chemotherapeutikum zur Behandlung zahlreicher aber insbesondere solider Tumoren ist, zum anderen mit Caelyx[®] und Myocet[®] bereits liposomale Formulierungen zum Vergleich in der Klinik eingesetzt werden. Des Weiteren bindet Dox schnell und unabhängig vom aktuellen Zellzyklus an das Tumorgewebe, so dass eine Redistribution von Dox zurück in den Blutkreislauf nach Freisetzung aus den Liposomen während der HT weitgehend verhindert wird. Insbesondere klinisch ist ein liposomaler Einschluss von Dox interessant, da dessen NW notwendige Höchstdosen limitieren. Durch eine lokale Freisetzung könnten die zur Tumorremission benötigten Doxorubicinkonzentrationen im Tumorgewebe erreicht werden. Über die klinischen Aspekte hinaus erfüllt Dox auch wichtige chemische Eigenschaften. Es lässt sich aufgrund seiner amphiphatischen Eigenschaften aktiv bei hohen Ausbeuten in Liposomen einschließen und kann über seine Fluoreszenz einfach quantifiziert werden.

Nach Prüfung der Toxizität PG₂- und PG₃- basierter TSL sollten pharmakokinetische Studien Aufschluss über die Zirkulationszeit und Verteilung geben. Darüber hinaus sollte getestet werden, in wieweit eine Behandlung mit HT Einfluss auf die PK liposomalen Dox hat. Im Tumormodell, bei dem nach systemischer Applikation der Liposomenlösung der Tumor mit HT behandelt wird, sollte die Anreicherung von Dox im Tumorgewebe untersucht werden. Da für Tiermodelle im Gegensatz zur Humanmedizin keine standardisierten Geräte zur Wärmeapplikation vorhanden sind, ist hier die gleichmäßige Erwärmung des Tumors problematisch. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein subkutanes Tumormodell gewählt, um eine kontrollierbare HT des Tumorgewebes durchführen zu können. Zusätzlich sollten Tumorwachstumsstudien in syngenem und xenogenem Tumormodellen die Effizienz der neuartigen PG-TSL (Dox) zeigen. Die *in vivo* Ergebnisse sollten durch weitere Charakterisierung *in vitro* gestützt und ergänzt werden. Neben der genauen Charakterisierung (Größe; Polydispersionsindex (PDI), ζ-Potential, Phasenumwandlungstemperatur (T_m), Einschlusskinetik, Wirkstoff-Lipid Verhältnis temperaturabhängige Dox-Freisetzung, Öffnungskinetik) gehörten hierzu Versuche zur Liposomenstabilität in verschiedenen Plasmen und der Einfluss von Verdünnung auf die Liposomenstabilität. In der Zellkultur wurden verschiedene TSL-Formulierungen in ihrer Zytotoxizität bei verschiedenen Bedingungen (37 °C oder 42 °C; 15 min oder 60 min) verglichen. Alle Experimente wurden im Vergleich zu freiem Wirkstoff, NTSL (Dox) und Lyso-PC basierten TSL durchgeführt.

3 MATERIAL

3.1 Liposomenherstellung und –charakterisierung

3.1.1 Lipide

Lipid	M [g/mol]	Chemische Formel	Abkürzung	Bezugsquelle
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	734,06	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	DPPC	Genzyme Pharmaceuticals Schweiz-Liestal
1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	790,17	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈ P	DSPC	Genzyme Pharmaceuticals Schweiz-Liestal
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol	744,97	C ₃₈ H ₇₅ O ₁₀ P	DPPG (PG ₁)	Genzyme Pharmaceuticals Schweiz-Liestal
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglycerol	819,04	C ₄₁ H ₈₁ O ₁₂ P	DPPGOG (PG ₂)	Synthese und Bereitstellung von Prof. Eibl Göttingen
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglyceroglycerol	893,12	C ₄₄ H ₈₇ O ₁₄ P	DPPGOGOG (PG ₃)	Synthese und Bereitstellung von Prof. Eibl Göttingen
1-Palmitoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	495,64	C ₂₄ H ₅₀ O ₇ N	P-Lyso-PC	Genzyme Pharmaceuticals Schweiz-Liestal
1-Stearoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	523,70	C ₂₆ H ₅₄ O ₇ N	S-Lyso-PC	Genzyme Pharmaceuticals Schweiz-Liestal
1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylen-glycol)-2000]	2805,54	C ₁₃₉ H ₂₇₁ N ₄ O ₅₇ P	DSPE-PEG ₂₀₀₀	Avanti Polar Lipids Alabaster, Alabama, USA

Tabelle 9 *Verwendete Lipide zur Liposomenherstellung*

3.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
Formaldehydlösung 4 %	Krankenhausapotheke; Klinikum Großhadern	Tumorfixation für Histologie
Chloroform	Merck; D-Darmstadt	Lösung des Lipidfilms; DC
Methanol	Roth; D-Buchenau	Lösung des Lipidfilms; DC
L-Histidin	Roth; D-Buchenau	Puffer; Liposomenherstellung
Triton X-100	Roth; D-Buchenau	Liposomencharakterisierung
Citronensäure-Monohydrat	Merck; D-Darmstadt	Liposomenherstellung
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Merck; D-Darmstadt	DC
NaCl	Roth; D-Buchenau	Liposomenherstellung und Charakterisierung
Ammoniaklösung 25 %ig	Merck; D-Darmstadt	DC Laufmittel
Perchlorsäure HClO ₄ 70 %	Merck; D-Darmstadt	Phosphatbestimmung
Schwefelsäure H ₂ SO ₄ 96 %	Merck; D-Darmstadt	Phosphatbestimmung; DC
HEPES	Biomol GmbH; D- Hamburg	Pufferzusatz
Sephadex® G-50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; D-Steinheim	Umpuffern der Liposomenlösung
Molybdäntrioxid MoO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; D-Steinheim	Molybdänblauspray DC
Molybdänpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; D-Steinheim	Molybdänblauspray DC

Tabelle 10 Chemikalien und Lösungsmittel ; Verwendet zur Liposomenherstellung und – charakterisierung

3.1.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Natriumchloridlösung 0,9 %	Natriumchlorid 4,5 g Aqua Millipore® 500 ml	Bestimmung Phosphat- gehalt
Lösung I	H ₂ SO ₄ 35,3 g Aqua Millipore® ad 100 ml	Bestimmung Phosphat- gehalt
Lösung II	Ammoniumheptmolybdat- Tetrahydrat 3g 10 % Triton X-100 120 mg Aqua Millipore® ad 100 ml	Bestimmung Phosphat- gehalt
HN-Puffer	20 mM Hepes (4,8g) 150 mM NaCl (8,8 g) Aqua Millipore® ad 1 l (pH 7,4 oder pH 7,8)	Liposomenherstellung und Charakterisierung
Citratpuffer	300 mM Zitronensäure pH 4,0	Liposomenherstellung
Ammoniumsulfatpuffer	300 mM Ammoniumsulfat pH 4,0	Liposomenherstellung
Sephadex Säulenmaterial	Sephadex® G-50 10g 0,9 % NaCl-Lösung ad 150ml	Liposomenherstellung
Histidin-Puffer	L-Histidin 6,21g (20 mM) NaCl 8,77 g (150 mM) Aqua Millipore® ad 1 l pH 6,4	Liposomenherstellung
Laufmittel	40 % Chloroform 60 % Methanol 1 % Ammoniaklösung (5 %ig)	DC
Molybdänblauspray	<u>150 ml Lösung I</u> Molybdäntrioxid 40,1 g ad 1 l 25 %ige H ₂ SO ₄ <u>150 ml Lösung II</u> - Molybdänpulver 1,8 g - Lösung I 500 ml <u>600 ml Aqua bidest</u>	DC

Tabelle 11 Puffer und Lösungen; verwendet zur Liposomenherstellung und –
charakterisierung

3.1.4 Plasmen

Plasma	Stamm	Bezugsquelle
Mausplasma	C57BL/6	Sera Laboratories International Ltd. UK-Haywards Heath
Rattenplasma	Brown Norway	Sera Laboratories International Ltd UK-Haywards Heath.
Hamsterplasma	Syrischer Goldhamster	Sera Laboratories International Ltd UK-Haywards Heath.
Humanplasma		Sera Laboratories International Ltd UK-Haywards Heath.

Tabelle 12 Plasmen; verwendet bei der Messung der Dox-Freisetzung

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Tumormodell	Kulturmedium/ Zusätze
BFS-1	Dr. P. Manegold ICF; D-München	syngen (Maus)	RPMI 1640 Medium +10 % FCS
FaDu	ATCC; USA	xenogen (Maus)	MEM Earle +10 % FCS
BN175	G. Koning Erasmus MC NL-Rotterdam	syngen (Ratte)	RPMI 1640 Medium +10 % FCS

Tabelle 13 Verwendete Zelllinien für Tiermodelle und Zytotoxizitätstest

BFS-1

Der BFS-1 Tumor ist ein durch Methylcholanthrene A induziertes Fibrosarkom und wächst syngen in der C57BL/6 Maus. In der Zellkultur wachsen BFS-1 Zellen adhärent im Monolayer.

FaDu

Erstmals beschrieben wurde die Zelllinie FaDu von Rangan, 1972. Die Zellen wurden 1968 aus einem Plattenepithelkarzinom im Hypopharynx eines männlichen, 56-jährigen

Patienten in Kalkutta mittels Stanzbiopsie isoliert und nach ihm benannt. Nach mehr als 100 Passagen wurde die Zelllinie 1974 in die American Type Culture Collection (HTB-43TM; ATCC, Rockville MD; USA) aufgenommen. Subkutan in Nacktmäusen injiziert wachsen sie als ein nicht verhornendes, niedrig differenziertes Karzinom (Zietmann 1988). Die mediane Volumenverdopplungszeit zwischen 100 mm³ und 400 mm³ betrug in dieser Studie vier Tage. In der Zellkultur wachsen sie adhärent im Monolayer.

BN 175

Der BN 175 Tumor ist ein nichtimmunogenes, schnell wachsendes und metastasierendes Fibrosarkom, welches syngen in der Brown Norway Ratte wächst. Erstmals beschrieben wurde es von Kort (1984), der ehemalige Zuchtratten auf spontanes Tumorwachstum beobachtete. Der BN 175-Tumor stammt aus der retroperitonealen Region einer weiblichen Zuchtratte.

3.2.2 Zellkultivierung

Bezeichnung	Bezugsquelle
Isopropanol 70 %	Krankenhausapotheke Innenstadt, LMU München
Fetales Kälberserum	Biochrom AG; D-Berlin
RPMI 1640 Medium; Heses gepuffert; mit stabilem Glutamin; ohne NaHCO ₃	Biochrom AG; D-Berlin
RPMI 1640 Medium; NaHCO ₃ - gepuffert; mit stabilem Glutamin;	Biochrom AG; D-Berlin
MEM Earle; Heses gepuffert; ohne NaHCO ₃	Biochrom AG; D-Berlin
MEM Earle; NaHCO ₃ gepuffert	Biochrom AG; D-Berlin
PBS-Dulbecco; ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺	Biochrom AG; D-Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG; D-Berlin
Trypsin-EDTA	Biochrom AG; D-Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl-Roth GmbH + Co; D-Karlsruhe
Cell Proliferation Agent (WST-1)	Roche Diagnostics GmbH; D-Mannheim
Mycoplasmentest MycoAlert [®]	Lonza; Rockland USA

Tabelle 14 *Verwendete Medien und Reagenzien in der Zellkultur*

3.3 Tierversuche

3.3.1 Versuchstiere

Spezies	Stamm	Geschlecht	Bezugsquelle
Maus	C57/Bl 6	♂	Janvier F- Le Genest-St-Isle
Maus	NMRI-nu (nu/nu)	♂	Janvier F- Le Genest-St-Isle
Ratte	Brown Norway (BN)	♂	Charles River Laboratories; D-Sulzfeld

Tabelle 15 Versuchstiere

3.3.2 Arzneimittel

Bezeichnung	Wirkstoff	Bezugsquelle
Ketavet 100mg/ml	Ketamin	Pfizer, Pharmacia GmbH, D-Karlsruhe
Rompun®	Xylazin	Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen
Doxorubicin (Adriamycin)	Doxorubicin-HCl	Krankenhausapotheke Klinikum Großhadern und Sigma-Aldrich Chemie GmbH; D-Steinheim 2mg/ml
Caelyx®	Liposomales Dox	Krankenhausapotheke Klinikum Großhadern 2mg/ml
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol	Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen
Heparin-Natrium 25000 IE/5 ml	Hochmolekulares Heparin	Ratiopharm GmbH D-Ulm
Forene®	Isofluran	Abbott D-Wiesbaden
Conaxia® GO ₂ X 100 %	Sauerstoff	Linde Gas Therapeutics GmbH & Co. KG D-Unterschleißheim
Isotone Natriumchloridlösung		B. Braun Melsungen AG D-Melsungen

Tabelle 16 Arzneimittel, die in den Tierversuchen eingesetzt wurden

3.4 Verbrauchsmaterial

3.4.1 Herstellung Liposomen

Material	Bezugsquelle
Polycarbonat Filter 100 nm	Whatman; D-Dassel
Polycarbonat Filter 200 nm	Whatman; D-Dassel
Polyester Drain Disc	Whatman; D-Dassel
Glaswolle	Assistent; D-Sondheim

Tabelle 17 Verbrauchsmaterial bei der Liposomenherstellung

3.4.2 Zellkultur

Material	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen 25cm ² ; 75 cm ²	Thermo Electron LED GmbH; Nunc; D-Langensfeld
Greiner Röhrchen	Thermo Electron LED GmbH; Nunc; D-Langensfeld
96 Napf-Platten; Microtest TM Primaria TM	Becton Dickinson Labware Europe;
Kryoröhrchen	Nunc; D-Langensfeld

Tabelle 18 Verbrauchsmaterial Zellkultur

3.4.3 Tierversuche

Material	Bezugsquelle
Solofix [®] Blutlanzetten	B. Braun; D-Melsungen
Mikrovetten	Sarstedt; D-Nürnbrecht
Spritzen	Heiland; D-Hamburg
Feather Disposable Scapels	Feather Safety Razor Co LTD.; Japan-Osaka
Kanülen	Heiland; D-Hamburg

Tabelle 19 Verbrauchsmaterial Tierversuche

3.5 Geräte

3.5.1 Herstellung Liposomen

Gerät	Bezugsquelle
Rotationsverdampfer Laborota 4001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG D-Schwabach
Digitaler Vakuumregler Vac Control Automatic RS	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG D-Schwabach
Thermobarrel Extruder	Individuell angefertigt vom MPI für Biophysikalische Chemie, D-Göttingen
Extruder Lipex™	Northern Lipids Inc.; Canada-Burnaby
Vakuum-Exsikkator	Nalgene; NY-USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG; D-Hamburg
Ultrazentrifuge RC-5 Superspeed reffridgerated Centrifuge	Thermo Electron Corporation; D-Osterode
Feinwaage Precisa 205 A SCS	Precisa Gravimetrics AG - CH- Dietikon
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG; D-Hamburg
Vakuum Pumpe	Arcotronics; D-Berg

Tabelle 20 Verwendete Geräte für Liposomenherstellung

3.5.2 Charakterisierung Liposomen

Gerät	Bezugsquelle
Heizblock	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik; D-Bielefeld
Pierce Reacti-Vap™ Bedampfungseinheit	Thermo Fisher Scientific; D-Schwerte
Zetasizer Nano	Malvern instruments, UK-Worcestershire
Spectrofluorophotometer RF-450	Shimadzu Europa GmbH; D-Duisburg
Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer	Varian, USA-Pao Alto
Spectrophotometer Beckmann D 640	Beckman Coulter GmbH; D-Krefeld
Pharmacia LKB Multitemp II	Pharmacia, D-Freiburg

Tabelle 21 Verwendete Geräte für Liposomencharakterisierung

3.5.3 Doxorubicinnachweis aus Plasma, Tumoren und Organen

Geräte	Bezugsquelle
Reax2 Überkopfmischer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; D-Schwabach
Reacti-Therm Heizblock	Thermo Fisher Scientific; D-Schwerte
Pierce Reacti-Vap TM Bedampfungseinheit	Thermo Fisher Scientific; D-Schwerte
Minifuge RF	Heraeus; UK- Newport Pagnell
HPLC	
- 510 HPLC-Pumpen	
- 717plus Autosampler	Waters HPLC; D-Eschborn
- 470 Fluoreszenzdetektor (Ex: $\lambda = 480$ nm; Em: $\lambda = 560$ nm)	
- C18-Säule (250 mm x 4,6 mm innerer Durchmesser; 5 μ l Partikelgröße Porengröße: 125 Å)	Phenomenex Ltd., D-Aschaffenburg
TissueLyser	Qiagen GmbH, D-Hilden
Vorsäulenhalter Guard-Pack	MedChrom GmbH; Flörsheim-Dalsheim
Vakuumkammer VISIPREP	Supelco; Sigma-Aldrich

Tabelle 22 *Verwendete Geräte für Dox-Nachweis aus Plasma, Tumoren und Organen*

3.5.4 Zellkultur

Geräte	Bezugsquelle
CO ₂ -Inkubator	Binder; D-Tuttlingen
Zentrifuge Labofuge 400 R	Haereus; D- Hanau
Wasserbad	Memmert GmbH; D-Schwabach
Umwälzthermostat mit Wasserbad	Edmund Bühler GmbH; D-Tübingen
Sterilwerkbank	Glaire BSB 4, ICN Flow, Eggstein
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss (D-Jena)
Digitalkamera Power Shot G9	Canon; D-Krefeld
Absaugpumpe BVC 21	Vacuubrand GmbH + CO KG

Microplate Reader MRX Dynatech Laboratories

Tabelle 23 Verwendete Geräte in der Zellkultur

3.5.5 Tierversuche

Gerät	Bezugsquelle
Präzisionswaage; PFB 6000-1	Kern und Sohn GmbH; D-Balingen
Wasserbad Mäuse	Grant Instruments UK-Cambridgeshire
JB Aqua 26L; Wasserbad Ratten	Grant Instruments UK-Cambridgeshire
Digitaler Tumormessschieber	Vettech Solutions LTD; UK-Cheshire
Heizmatte	Vettech Solutions LTD; UK-Cheshire
Inhalationsnarkosegerät	Vettech Solutions LTD; UK-Cheshire
Schermaschine Contura	Wella AG; D-Darmstadt
Temperaturmessung intratumoral	Greissinger electronic GmbH; D-Regenstauf
Temperaturmessung rektal GTF 101-5/05150	Greissinger electronic GmbH
Kaltlichtquelle Optech PL 2000	Exacta Optech Labcenter S.p.A; I-San Prospero

Tabelle 24 Verwendete Geräte bei den Tierversuchen

3.6 Software

Software	Anwendung
Windows XP 2000	Betriebssystem
MS Office 2003	Textverarbeitung; Tabellenkalkulation
Pubmed	Literaturrecherche
Relevation™ Program	Absorptionsmessungen (WST-Test)
Irfanview	Fotos
Un-scan-it gel Version 5.1 (Silk Scientific Corp.)	Berechnung DC

EndNote; Thomson Reuters	Literaturverwaltung
Origin	AUC Berechnung PK; IC ₅₀
Zetasizer Nano series software	Berechnung der Größe und des ζ -Potentials der Liposomen
MPower (Waters)	HPLC

***Tabelle 25** Verwendete Softwareprogramme ; bei der Bearbeitung der Dissertation und der Auswertung von Ergebnissen*

4 METHODEN

4.1 Liposomenherstellung

Die Liposomen wurden mit der Filmhydratations- und Extrusionsmethode hergestellt (1); (62).

Lipidfilm

Die raumtemperierten Lipide wurden einzeln mit der Feinwaage abgewogen und separat in Chloroform bzw. Chloroform/Methanol (9:1) gelöst. Aus dem molaren Verhältnis der Lipide der herzustellenden Liposomenmembran, der Gesamtlipidkonzentration (50 mM) und der gewünschten Gesamtmenge an Liposomenlösung wurde berechnet, wie viel Milliliter der jeweils gelösten Lipide benötigt wurden. Die berechneten Mengen wurden in einem Glasrundkolben (250 ml bzw. 500 ml bei mehr als 4 ml Gesamtmenge) vereinigt und unter folgenden Bedingungen durch Entfernung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer ein homogener Lipidfilm hergestellt:

Temperatur [°C]	Druck [mbar]	Zeit [min]
40	350	15
60	150	60
60	40	120

Tabelle 26 Physikalische Bedingungen bei der Herstellung der Lipidfilme

Der Lipidfilm wurde für mindesten 12 h im Exsikkator unter Lichtabschluss im Vakuum getrocknet.

Hydratisierung

Zur Hydratisierung des Lipidfilms wurde Citratpuffer (300 mM; pH 4) verwendet. Bei der Hydratisierung bilden sich in wässriger Lösung aus dem Lipidfilm spontan multilamellare Lipidvesikel. Die Hydratisierung fand ebenfalls im Rotationsverdampfer bei 60 °C bis zur vollständigen Lösung des Lipidfilms statt (etwa 30 min).

Extrusion

Die so gewonnenen MLV wurden entweder per Hand im Thermobarrel (kleine Mengen von 2-4 ml) oder per Druckextrusion im LipexTM Extruder (große Mengen von bis zu 10 ml) durch 2 aufeinanderliegende Polycarbonatfilter (Porengröße von 100 nm bzw. 200

nm) extrudiert.

Handextrusion im Thermobarrel.

Je 1ml Liposomenlösung wird in eine Hamiltonspritze aufgezogen und per Hand durch die Polycarbonatfiltermembranen in eine zweite Hamiltonspritze gedrückt. Dieser Vorgang wurde 17-mal wiederholt. Um eine Verunreinigung mit multilamellaren polydispersen Liposomen zu vermeiden, wurde darauf geachtet die Liposomenlösung am Ende der Extrusion nicht aus der Hamiltonspritze zu entnehmen, mit dem die Liposomenlösung eingefüllt wurde.

Druckextrusion im Lipex™ Extruder

Die Liposomenlösung wird durch Stickstoffdruck (5-20 bar) aus einer N₂-Druckflasche durch die Polycarbonatmembranen extrudiert. Zur Stabilisierung der Filter liegen diese einer Polyesterscheibe (Whatman Nuclepore™ *drain disc*) auf. Der Vorgang fand diskontinuierlich über 10 Durchgänge statt. Das doppelwandige Stahlgehäuse des Lipex™ Extruders wurde während der Extrusion über zuführende Schläuche aus einem auf 60 °C temperiertes, zirkulierendes Wasserbad erwärmt. Die Erwärmung über die T_m der Lipide erleichtert den Extrusionsvorgang. Bei beiden Verfahren wurden nach der Extrusion die Filter auf Integrität untersucht.

Umpufferung

Nach dem Abkühlen der Dispersion auf Raumtemperatur erfolgte die Abtrennung von nicht eingeschlossenem Citrat durch Gelfiltration über eine Sephadex-Säule. Als Eluent diente HN-Puffer mit einem pH von 7,4. Damit wurde ein transmembraner pH-Gradient zwischen Liposomeninneren (pH 4) – und (pH 7,4) erzeugt. Die Citratliposomen wurden bei -20 °C gelagert.

Remote-Loading Verfahren

Es gibt unterschiedliche Verfahren, um hydrophile Substanzen ins Liposomeninnere einzuschließen. So ist es möglich den Wirkstoff schon bei der Hydratisierung des Lipidfilms hinzuzufügen, so dass dieser bei der Vesikelbildung spontan eingeschlossen wird. Für amphiphile Substanzen wie Dox kann jedoch über das Remote-Loading Verfahren eine deutlich höhere Einschlusseffizienz erreicht werden (63, 64). Für das Remote-Loading Verfahren muss eine Liposomenlösung mit transmembranem pH-Gradient hergestellt werden. Hierzu wird der Lipidfilm mit einer sauren Lösung hydratisiert und die Liposomenumgebung durch Gelfiltration mit geeignetem Puffer neutralisiert. Doxorubicin liegt als schwach basisches, amphiphiles Molekül außerhalb der Liposomenmembran ungeladen vor und kann durch seine hydrophoben Eigenschaften über die Liposomenmembran ins Liposomeninnere diffundieren. Hier wird es protoniert

und kann als geladenes Molekül nicht zurück diffundieren. Der Vorgang setzt sich so lange fort, bis das gesamte Dox im Liposomeninhalt eingeschlossen ist oder keine weiteren Protonen mehr zur Verfügung stehen. Über das gleiche Verfahren lassen sich auch andere Anthrazykline wie Daunorubicin, Epirubicin, Vincristin oder Ciprofloxacin in Liposomen einschließen.

Die Citratliposomenlösung wurde mit HN-Puffer pH 7,8 verdünnt und wie die Doxorubicinstammlösung in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen 5 min bei 37 °C oder 38 °C im Thermomixer vorinkubiert. Die anhand des angestrebten, molaren Wirkstoff-Lipid Verhältnis von 0,13 errechnete Menge Dox wurde zu den Citratliposomen pipettiert. Um den liposomalen Einschluss des Dox über die Zeit zu testen, wurde sofort eine 20 µl Probe entnommen. Diese wurde mit 3 ml gekühltem HN-Puffer pH 7,4 in einer Küvette verdünnt, die Fluoreszenz im Spektrofluorometer (Ex 470 nm; Em 555 nm) ermittelt und als 100 %-Wert Ausgangsfluoreszenz festgelegt. Weitere Messzeitpunkte waren 5, 10, 15, 20, 30, 45 und 60 min nach der ersten Messung und wurden auf den Ausgangswert referenziert. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Dox-Einschlussmenge. Sobald die gemessene Fluoreszenzintensität < 10 % der Ausgangsfluoreszenz betrug oder es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität kam wurde der Einschluss gestoppt und die Dispersion bei 4 °C für mindestens 30 min. abgekühlt. Anschließend wurde die Dox-Liposomenlösung zentrifugiert (2.000 g/10 min/RT), um evtl. vorhandene LUV's aus der Liposomenlösung zu entfernen. Der trübe Überstand wurde auf 4 Zentrifugenröhrchen verteilt und mit dem Sorvall Rotor SS-34 zentrifugiert (19.000 U/min, 45 min, 15 °C). Nicht liposomales Dox verbleibt im Überstand. Dieser wird vorsichtig dekantiert und das Pellet mit etwa 20 mL Histidin-Puffer (4 °C; pH 6,4) aufgenommen. Der Vorgang wird ein-zweimal wiederholt, bis der Überstand klar ist und die Liposomenlösung von verbleibendem nicht liposomalen Dox gereinigt wurde. Abschließend wird das Pellet in Histidin-Puffer pH 6,4 gründlich resuspendiert, gevortext, mindestens für 30 min bei 4 °C abgekühlt und als Aliquots bei -20 °C gelagert.

4.2 Liposomencharakterisierung

4.2.1 Bestimmung von Liposomengröße und Polydispersionsindex

Zur Bestimmung der Liposomengröße wurde die Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) durchgeführt. Der Messbereich liegt ca. zwischen 3 nm und 100 µM. Mit einem Laser werden die Partikel angeregt und die resultierende Streuung des Lichtes in einem Winkel von 173° mit einem Photomultiplier zu verschiedenen Zeitpunkten detektiert. Aus der Geschwindigkeit der Änderung der gemessenen Streulichtintensitäten lässt sich über die Diffusionskonstante der Partikel mittels der Stoke-Einsteingleichung die Größe der

Liposomen berechnen. Da kleine Partikel in einer Dispersionslösung schneller diffundieren (Brownsche Molekularbewegung) führt dies auch zu schnelleren Schwankungen der Streulichtintensität. Des Weiteren lässt sich mit dieser Methode der Polydispersionsindex (PDI), welcher ein Maß für die Breite der Größenverteilung ist, errechnen. Die Liposomenlösung wurde für die Messung 1:50 mit Millipore®-Wasser verdünnt. Das Softwareprogramm Zetasizer Nano series berechnete die mittlere Größe (Z-Average) und den PDI der Liposomenlösung.

4.2.2 Bestimmung des ζ -Potentials

Als Zetapotential definiert man die Potentialdifferenz ξ zwischen der Scherfläche diffundierender Liposomen gegenüber ihrer Umgebung. Hierzu wird die Wanderungsgeschwindigkeit geladener Partikel in einem elektrischen Feld mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie ermittelt. Das Zetapotential wird in mV angegeben. Die Liposomenlösung wurde für die Messung 1:50 mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und unter Vermeidung von Luftblasenbildung in eine Küvette pipetiert. Jede Probe wurde dreimal bei einer Temperatur von 25 °C vermessen und hieraus der Mittelwert gebildet

4.2.3 Lipidanalytik

4.2.3.1 Nachweis des Lipidgehalts

Der Lipidgehalt der Liposomenlösung wurde anhand der Phosphatanalyse von Eibl und Lands (65) gemessen. Er kann indirekt über den anorganischen Phosphatgehalt bestimmt werden. Beide sind proportional zueinander, da jedes Lipidmolekül ein Molekül Phosphat enthält. Bei der Durchführung des Versuchs ist es daher besonders wichtig rückstandsfreie (phosphatfreie) Glasgefäße sowie ionenarmes Millipore®-Wasser zu benutzen. Für jede Probe wurden Doppelwerte erhoben. Zur Bestimmung einer Eichgeraden wird mit einer 100 mM Standardphosphatlösung aus Kaliumphosphat eine Verdünnungsreihe (100; 50; 25; 12,5; 6,25 nM) hergestellt. Die Proben selber werden in 2 Konzentrationen (1:50 und 1:40) verdünnt. In schwefelsaurer Lösung und mit 70 %iger Perchlorsäure werden die Proben zwei Stunden im Heizblock auf 300 °C erhitzt. Nach Abkühlung und Zugabe einer Lösung aus Ammoniumheptmolybdad sowie dem Detergenz Triton X-100 (= Octylphenolpolyethylenglykolether) bildet sich durch Fällung Ammoniummolybdato-phosphat. Nach 20 minütiger Inkubation bei RT wird die entstehende Trübung der Proben bei einer Wellenlänge von 660 nm im Spektrofluorometer vermessen. Die Phosphatkonzentration wird mittels der Eichgeraden errechnet und ist proportional zum Lipidgehalt der Liposomenlösung.

4.2.4 Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Kontrolle der Phospholipidzusammensetzung der Liposomenmembran wurde 1 μ mol

Liposomensuspension mit je 2 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt und mit Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) versetzt und gemischt. Um die Phasen zu trennen wurden die Proben 10 min zentrifugiert (1600 g) und anschließend die untere organische Phase entnommen und gesammelt. Die wässrige Phase wurde wiederum mit Chloroform/Methanol 3:1 gemischt und erneut zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde mittels kontinuierlicher Stickstoffzufuhr verdampft. Mit Chloroform/Methanol 9:1 (v/v) wurde eine 20 mM Lipidlösung hergestellt. Die Proben wurden auf Kieselgel 60 DC Platten aufgetragen und in das Laufmittel gestellt. Da DPPC und DSPC nur ungenau voneinander getrennt werden, kann eine einzelne Bestimmung dieser beiden Lipidanteile nicht erfolgen. Die Phospholipide wurden selektiv mit Molybdänblauspray angefärbt.

4.2.5 Bestimmung des liposomalen Doxorubicingehalts

Der Doxorubicingehalt der Liposomenlösung wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Je 20 µl Probe wurden mit HN-Puffer (pH 7,4) 1:2, 1:3 und 1:4 verdünnt. Für die Eichgerade wurde aus 50 µl Doxorubicin-Standardlösung (2mg/ml) und HN-Puffer (pH 7,4) eine Verdünnungsreihe (2,88 - 1,44 - 0,72 - 0,36 - 0,18 - 0,09 - 0,00 µM Dox) in Doppelbestimmung hergestellt. Je 20 µl Probe bzw. Eichgeradenprobe wurden nach Zugabe von 200 µl des Detergenz 10 % Triton X-100 über 15 min bei 45 °C im Thermomixer inkubiert. Je 20 µl werden in einer Küvette überführt und sofort mit 3 ml HN-Puffer (4 °C; pH 7,4) verdünnt. Die Fluoreszenz wird anschließend bei einer Extinktion von 470 nm, einer Emission von 555 nm sowie einer Verstärkung von 900 mV im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Über die Eichgerade erfolgt die Bestimmung des Doxorubicingehalts. Als Kontrolle wurde der Doxorubicingehalt von Caelyx[®] oder Adriamycin[®] mitbestimmt.

4.3 Doxorubicinbestimmung

4.3.1 Extraktion aus Plasma

Um Doxorubicin aus Plasma und Organewebe zu isolieren wurde das Extraktionsprotokoll von Galettis mit geringfügigen Veränderungen übernommen. Je 50 µl Plasmaproben wurden mit Phosphatpuffer auf 1 ml verdünnt und 100 µl Interner Standard (10 µg/ml Daunorubicin) und 10 ml Dichlormethan/Isopropanol 9:1 (v/v) hinzugefügt. Nach intensiver Vermischung wurden die Proben zentrifugiert und die organische Phase in ein neues Reagenzglas überführt. Das Extrakt wurde durch konstante Stickstoffbegasung bei 40 °C in einer Verdampfungsanlage getrocknet. Das Sediment wurde in 1 ml 80 mM Phosphatdihydrogenat/ Azetonitril 73:27 (v/v) aufgenommen und nach Zentrifugation in die HPLC-Autoinjektorgefäße übertragen.

4.3.2 Extraktion aus Organ- und Tumorgewebe

Zu 100 mg Gewebeproben wurden 1,5 ml Methanol/Wasser 2:1 (vol/vol) und 100 µl interner Standard (10 µg/ml Daunorubicin) zugegeben. Die Homogenisierung wurde in 2ml Eppendorfgefäßen mit Wolframkarbidkugeln im TissueLyser (30 Hz; 5 min) durchgeführt. Um Doxorubicin von seiner Bindung an die DNA zu lösen wurde zu jeder Probe 200 µl Silbernitrat (33 % w/v) zugefügt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden in Zentrifugationsröhrchen zusammen mit 5 ml Chloroform/Isopropanol 2:1 (v/v) überführt. Nach intensivem Vermischen und Zentrifugation wurde die organische Phase in ein neues Reagenzglas überführt, vom Lösungsmittel befreit und wie in 4.3.1 für Plasma beschrieben, weiter verfahren.

4.3.3 HPLC-Analyse

Die Doxorubicinkonzentration wurde nach Extraktion aus Plasma und Gewebe mit der HPLC bestimmt. Die Läufe wurden mit einer C₁₈-Säule durchgeführt. Mit einem Autoinjektor wurden je 50 µl Probenmaterial auf die Säule gegeben und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert. Als mobile Phase wurde 80 mM Phosphatdihydrogenat/Acetonitril 73:27 v/v verwendet. Als Standard diente eine 2 mg/ml Doxorubicinlösung (Adriablastin). Die Messung erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor (Ex: λ= 480 nm; Em: λ= 560 nm).

4.4 In vitro Öffnungskinetik

Die Öffnungskinetik gibt die zeitabhängige Freisetzungsrates einer liposomalen Formulierung bei definierter Temperatur an. Dabei macht man sich die Fluoreszenzlöschung (Quenching Doxorubicins bei Konzentrationen > 400 µM) zu Nutze. Die in diesen Versuchen eingesetzten Liposomen haben bei einem Wirkstoff-Lipid Verhältnis von 0,13 (v/v) im hydrophilen Innenraum eine Doxorubicinkonzentration von > 1 mM (66) Eingeschlossen in Liposomen ist das Fluoreszenzsignal von Doxorubicin also gequenchet. Bei Doxorubicinfreisetzung in Puffer oder Serum kommt es zum „Dequenching“, bei dem Doxorubicin wieder verdünnt wird, so dass die Fluoreszenzintensität steigt. Diese Eigenschaft ermöglicht eine kontinuierliche und sensitive Messung der Freisetzung Doxorubicins. Als 100 %-Referenzwert wird dabei die Fluoreszenzintensität bei Zugabe des Detergenz Triton X-100 (10 %) zur Liposomenlösung festgelegt. Die Freisetzung aus den Liposomen erfolgt nach einer Kinetik erster Ordnung.

Die Liposomenlösungen wurden mit His-Puffer pH 7,4 1:10 verdünnt. Für die 100 %-Referenzwert wurden die Liposomenlösungen 1:1 mit Triton X-100 (10 %) versetzt, im Thermomixer bei 45 °C für 15 min vorinkubiert und anschließend 1:10 mit HN-Puffer pH

7,4 verdünnt. Im Messgerät (Varian Cary Eclipse Spektrofluorometer) standen vier einzelne Küvetten zu Verfügung, so dass die Messung von vier Proben gleichzeitig möglich war. Während eines Messvorgangs konnte somit eine Messprobe zusammen mit dem 100 % Referenzwert je doppelt bestimmt werden. Um eine konstante, definierte Temperatur in den Küvetten zu gewährleisten wurden über eine eingebaute Heizvorrichtung am Gerät je 3 ml Puffer bzw. FCS bei der gewünschten Temperatur 20 min vorinkubiert. Mit der Zugabe von je 20 µl der Liposomenverdünnung (mehrmaliges zügiges auf- und abpipettieren) in die Küvetten wurde die Messung gestartet. Kreuzförmige Magnetrührstäbchen in den Küvetten gewährleisteten eine gleichmäßige Temperaturverteilung sowie eine homogene Vermischung der Liposomenlösungen. Über einen Zeitraum von 20 min wurde alle 20 Sekunden die Fluoreszenzintensität nach Anregung mit einer Xenonlampe (Extinktion $\lambda = 493$ nm; Emission $\lambda = 513$ nm) gemessen. Um Photobleichen zu verhindern erfolgte zwischen den Messungen keine Anregung der Messprobe. Für die Berechnung der Öffnungsgeschwindigkeit (siehe (1)).

4.5 Temperaturabhängige Dox-Freisetzung

Die temperaturabhängige Freisetzung von Dox aus den Liposomen wurde mit einem Spektrofluorometer gemessen. Die Messung erfolgt wie bei der Erstellung der Öffnungskinetik über die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Freisetzung des Wirkstoffs.

Die Liposomenlösungen wurden jeweils 1:10 in HN-Puffer, FCS oder Plasma verdünnt und je 20 µl für 5 min bei RT, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C und 45 °C (in Doppelbestimmung) im Thermomixer inkubiert. Direkt im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben mit je 1 ml HN-Puffer (pH 7,4; 4 °C) verdünnt und bis zur Messung der Fluoreszenz im Spektrofluorometer bei einer Extinktion von 470 nm sowie einer Emission von 550 nm auf Eis gelagert. Zudem wurde die Fluoreszenzintensität nach einer Stunde Inkubation der Liposomenlösung in gleichen Milieus bei 37 °C und 42 °C ermittelt. Die Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Detergenz Triton X-100 (10 %) zur Liposomenlösung und 15 min Inkubation bei 45 °C wurde als 100 % Referenzwert festgelegt. Das freigesetzte Dox wurde berechnet aus:

$$\text{Dox-Freisetzung [\%]} = (I(t) - I_0) * 100 / I_{\infty} - I_0$$

$I(t)$ = Fluoreszenzintensität nach t (min)

I_0 = Hintergrundfluoreszenz

4.6 Verdünnungsstabilität

Die Liposomenlösungen wurden 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und in

einen Dialyseschlauch pipettiert. Der Dialyseschlauch wurde zweimal für jeweils 2 h und einmal mindestens 12 h in 5 l physiologischer Kochsalzlösung bei geringfügiger Durchmischung mittels Magnetrührer inkubiert. Die Umgebungstemperatur sowie die Temperatur der physiologischen Kochsalzlösung betragen 4 °C. Anschließend wurden die Doxorubicinkonzentration und der Lipidgehalt der Standardliposomenlösung, der verdünnten Standardliposomenlösung sowie der dialysierten Liposomenlösung in einem Assay gemessen. Aus diesen Werten wurde das jeweilige Wirkstoff-Lipid Verhältnis ermittelt und die Veränderung vor- und nach der Dialyse berechnet.

Für folgende Formulierungen wurde der Versuch jeweils dreimal separat durchgeführt:

- NTSL (Caelyx[®])
- PG₂-TSL (Dox)
- PG₃-TSL (Dox)
- P-Lyso-PC TSL (Dox)

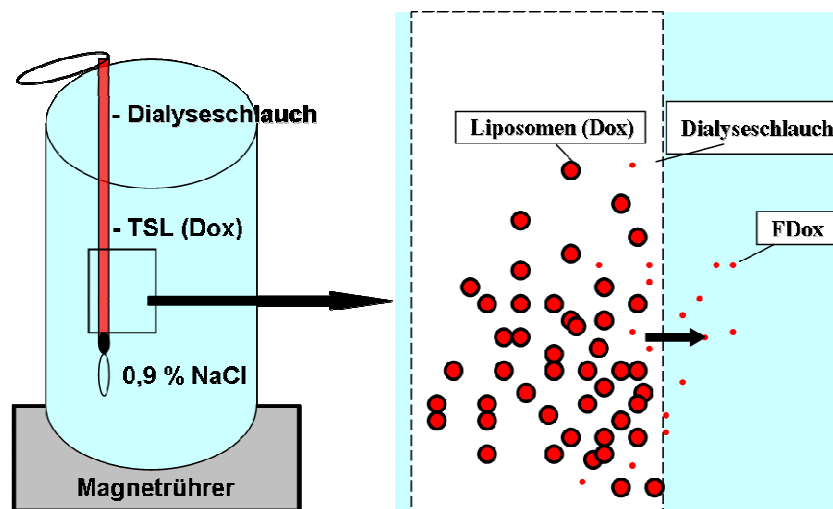


Abbildung 10 Dialyse der Liposomenlösung nach der Verdünnung Zellkultur

4.6.1 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C bei 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchte in 75 cm³ oder 150 cm³ Kulturflaschen (im jeweiligen Medium; siehe Materialien/ Zellen) kultiviert.

Passagieren der Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten wurden sie passagiert. Hierfür wurden sie zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, mit 1 % Trypsin-EDTA benetzt und ca. 2 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sich der Zellrasen von der Oberfläche löste. Aufgrund der starken Adhärenz der FaDu-Zellen

wurden diese zusätzlich schonend mit einem Zellschaber vom Untergrund abgeerntet. Mit frischem Medium versetzt wurden die Zellen im Greiner Röhrchen 5 min bei 150 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet resuspendiert und in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät.

Einfrieren der Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem N₂ wurden die Zellen gezählt und nach dem Abzentrifugieren in Einfriermedium (90 % FCS; 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1,5 x 10⁶ Zellen wurden in 1ml eiskaltem Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt und im Isopropanol gefüllten Kryocontainer bei -80 °C für 24 h gelagert, so dass die Zellen pro min etwa um 1 °C abkühlen. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff bei -196 °C eingefroren.

Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Kurz vor Schmelzen des letzten Eises wurden die Zellen in ein Greiner Röhrchen mit frischem Medium überführt, der Überstand inklusive des Einfriermediums nach Zentrifugation (2 min bei 160 g) abgesaugt und die resuspendierten Zellen in frischem Medium ausgesät.

Mykoplasmentest

Da eine Mycoplasmenkontamination Einfluss auf Zellproliferation und somit auf die Versuchsergebnisse haben kann, wurde vor den Versuchen von jeder Zelllinie Mediumüberstand entnommen und mit dem MycoAlert[®] Mycoplasma Detection Kit (Lonza) nach Herstellervorschrift getestet.

4.6.2 Zytotoxizitätstests

Um die zytotoxische Effizienz der liposomalen Formulierungen im Vergleich zu freiem Doxorubicin (FDox) sowie nicht thermosensitiven Liposomen auch in der Zellkultur testen und vergleichen zu können, sowie einen IC₅₀-Wert zu bestimmen wurde ein Zellviabilitätstest in Kombination mit HT-Behandlung etabliert. Als Zelllinie wurden BN175 gewählt, die auch im Rattenmodell *in vivo* verwendet wurden. Die Zytotoxizität wurde mit dem colorimetrischen WST-Test bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht auf der reduktiven Spaltung des hellroten Farbreagens WST-1 (chromogenes Tetrazoliumsalz; (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) zum orangen wasserlöslichen Formazansalz durch intrazelluläre Enzyme wie das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase System metabolisch aktiver Zellen. Die Quantifikation des umgesetzten WST-1 erfolgt photometrisch mit einem Multiwell-Spektrophotometer (ELISA-Reader). Die Zunahme der Absorption gemessen

als optische Dichte korreliert direkt mit der Menge mitochondrialer Dehydrogenase in den Näpfen und damit mit der Zahl aktiv metabolischer Zellen. Da der Test abhängig von der linearen Wachstumskurve der Zellen ist wurde in Vorversuchen die optimale Zellzahl/Napf ermittelt, bei der zum Zeitpunkt der Testauswertung unbehandelte Zellen zu 100 % konfluent waren.

Die Zellen wurden in 96-Napf Mikrotiterplatten ausgesät (2000 Zellen in 100 µl Medium/Napf) und zur Ausbildung der Adhärenz 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Da während der HT im Wasserbad keine CO₂-Begasung der Zellen stattfindet wurde die Verdünnungsreihe nicht mit Bikarbonat- (HCO₃⁻), sondern mit HEPES-gepuffertem Kulturmedium hergestellt. Dies stellt die Aufrechterhaltung des pH-Wertes von 7,2-7,4 während der HT sicher. Die Verdünnungsreihe (höchste Konzentration 200 µmol/l, davon ausgehend jeweils 1:3 Verdünnungen) wurde in absteigender Konzentration auf die Zellen pipettiert und die Mikrotiterplatten mehrmals mit Parafilm umwickelt, um den Deckel wasserdicht zu versiegeln. Die Platten wurden für 15 bzw. 60 min in einem auf 37 °C oder 42 °C temperierten Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Zytostatika enthaltende Medium abgesaugt, mit 100 µl frischem Kulturmedium versetzt und erneut im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂- Begasung inkubiert. Nach 48 h wurde 10 µl WST-1 Gebrauchslösung/ Napf hinzu pipettiert und die relative Absorption der Färbelösung nach 1, 2, 3 und 4 h photometrisch im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert. Bei der Auswertung wurde die Hintergrundadsorption in den ersten Näpfen subtrahiert, in denen nur Medium + WST-Reagenz enthalten war. Außerdem wurde jede Platte bei 450 nm vor WST-Zugabe gemessen. Die Werte wurden ebenfalls abgezogen. Die IC₅₀-Werte wurden anhand der aufgestellten Diagramme abgelesen.

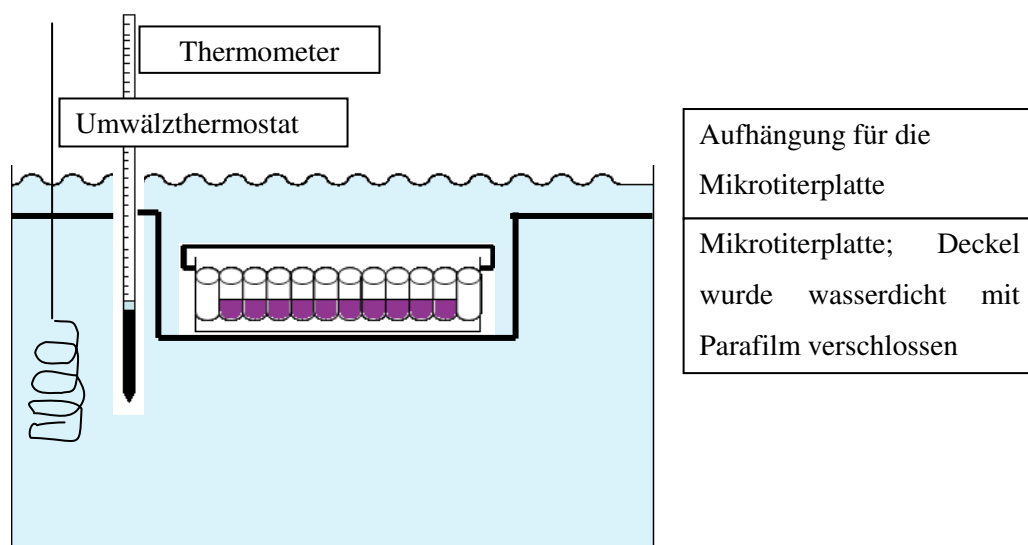


Abbildung 11 Aufbau HT der Zellen im Wasserbad

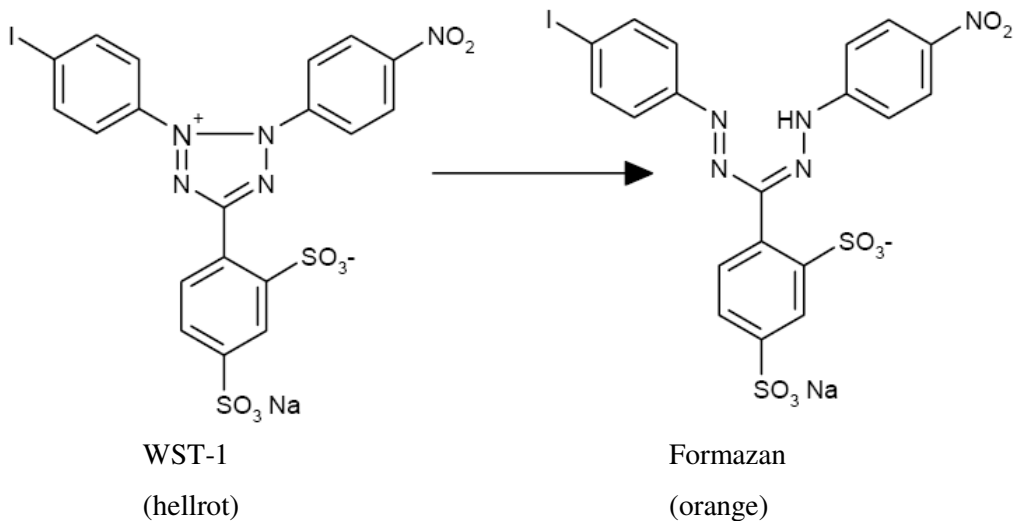


Abbildung 12 *NADH* abhängige Spaltung des Farbreagens WST-1 (hellrot) in Formazan (orange)

4.6.3 Vorbereitung der Zellen für Tierversuche

Zur Induktion von Bulktumoren *in vivo* wurden entsprechende Tumorzellen hierfür wie beschrieben, jedoch ohne den Zusatz von Antibiotika, zum Kulturmedium vermehrt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte in einem guten Zustand waren (wenige tote Zellen, exponentielle Wachstumsphase, Adhärenz; geringe Passageanzahl). Nach mehrmaligem Waschen mit je 6ml PBS wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst und in der Neubauer-improved Zählkammer gezählt. Nach 5 min Zentrifugation (150 g) wurden die Zellen in eisgekühltem Medium aufgenommen und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 50 μ l verdünnt.

4.7 Tierversuche

4.7.1 Haltung

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden im Rahmen des von der Regierung Oberbayern genehmigten Antrags „Aktivierung thermosensitiver Trägersysteme durch regionale HT“ (Az. 55.2-1-54-2531-46-07) und unter Einhaltung der Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes (§ 8) durchgeführt. Für Versuche mit Ratten wurde ein Erweiterungsantrag auf die Tierspezies Ratte, eine Erhöhung der Tierzahl um <10 % der Tiere sowie die Anmeldung eines weiteren Durchführungsortes gestellt, der am 13.05.2009 genehmigt wurde. Nach Anlieferung durch den Züchter wurde den neuen Versuchstieren eine Eingewöhnungszeit an die Laborbedingungen von mindestens einer Woche gewährt, bevor mit den Versuchen begonnen wurde.

4.7.1.1 Mäuse

Die Mäuse waren im Tierstall des Departments Pharmazie (zugehörig zum Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie-Biotechnologie) untergebracht. Es wurden männliche Tiere der Stämme C57BL/6 und NMRI nude/nude im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Sie wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in IVC-Käfigen (Typ II lang; Techniplast, Buguggiate, Italien), in Gruppen von bis zu 5 Tieren gehalten. Die Käfige waren ausgestattet mit einem roten Maushaus (Techniplast, Italien), einem Holztunnel (Abedd, A-Koeflach), sowie Zellstoff. Autoklaviertes Standardzuchtfutter (Sniff, Spezialdiät Maus: Haltung, D-Soest) und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Bei einem Hell-Dunkel Zyklus von 12 Stunden wurden eine Raumtemperatur von 21 °C, sowie eine relative Luftfeuchte von 60 % aufrechterhalten.

4.7.1.2 Ratten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden männliche Brown Norway Ratten mit einem Mindestgewicht von 200 Gramm verwendet. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 21 °C; relative Luftfeuchtigkeit von 60 %) im Tierstall des Forschungslabor B, der Medizinischen Klinik I im Klinikum Großhadern. Die Ratten wurden in Gruppen mit bis zu vier Tieren pro Käfig (offene Haltung; Makrolonkäfige Typ II long; hoher Deckel; LIGNOCEL FS 14-Einstreu der Fa. Sniff; Fat Rat Hut der Fa. Bioserv; Zellstoff) bei freiem Zugang zu autoklaviertem Futter (Fa. Sniff Ratte-Haltungsfutter) und Wasser gehalten. Der Hell-Dunkel Zyklus betrug 12 h.

4.7.2 Angewandte Methoden

4.7.2.1 Anästhesie

4.7.2.1.1 Injektionsnarkose Mäuse

Die Injektionsnarkose wurde sowohl für die subkutane Implantation der Tumorfragmente als auch während der HT-Behandlung an Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden Ketamin (100 mg/ml), 2 % Xylazin und isotonische Kochsalzlösung im Verhältnis 38,5:23:38,5 m/m gemischt und je Tier 50 µl i.p. verabreicht. Bei frühzeitigem Erwachen der Tiere wurde mit Ketamin i.m. nachdosierte.

4.7.2.1.2 Inhalationsnarkose Ratten

Die Ratten wurden während der HT-Behandlung, für die pharmakokinetischen Untersuchungen und zur subkutanen Implantation der Tumorfragmente mit Isofluran anästhesiert. Die Einleitung der Inhalationsnarkose erfolgte in einer Induktionskammer mit 4-5 %igem Isofluran. Als Trägergas diente ausschließlich medizinischer Sauerstoff (2 l/min). Die Narkose wurde während der gesamten Behandlungsphase bei 1,5-2 %

Isofluran aufrechterhalten

4.7.2.2 Euthanasie

Vor Organperfusionen wurden die Mäuse mittels CO₂-Begasung euthanasiert, in allen anderen Fällen durch zervikale Dislokation. Die Ratten wurden in der Induktionskammer für mindestens 10 min mit 5 % Isofluran in tiefe Narkose versetzt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Bei den Tumorwachstumsstudien wurden die Empfehlungen der GV-SOLAS „Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch“ berücksichtigt. Mäuse sollen getötet werden, bevor das Volumen solider syngener, s.c. Tumoren 3 cm³ bzw. der Durchmesser 1,5 cm beträgt. Bei xenogenen, soliden s.c. Tumoren werden maximale Volumina von 4 cm³ bzw. maximale Durchmesser von 2 cm empfohlen. Für solide, syngene Rattentumoren gelten maximale Volumen von 50 cm³ bzw. maximale Durchmesser von 5 cm. Weitere Abbruchkriterien sind Exulzerationen, Gewichtsverluste von über 20 % bezogen auf das Normalgewicht und das Auftreten klinischer Symptome (Apathie, Anzeichen von Schmerzverhalten, Atembeschwerden etc.).

4.7.2.3 Organperfusion

Die Organperfusion wurde bei allen Tieren durchgeführt, deren Organe für die Doxorubicinbestimmung entnommen wurden. Nach Euthanasie wurden die Tiere auf der Präparationsunterlage in Rückenlage fixiert und Bauch- und Brusthöhle über einen Längsschnitt in der Linea alba zugänglich gemacht. Aus der linken Herzkammer wurde mit einer Kanüle ca. 1 ml Blut entnommen und anschließend das rechte Herzohr zum Abfluss des Blutes mit einem ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet. Über eine Butterflykanüle, die von der linken Herzkammer aus bis in die Aorta vorgeschoben wurde, konnte mit einer Peristaltikpumpe physiologische NaCl-Lösung in den Kreislauf des Tieres perfundiert werden. Der Vorgang wurde fortgesetzt bis die zurücklaufende Flüssigkeit aus dem rechten Herzohr klar war. Herz, mittlerer Leberlappen und Milz wurden entnommen und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.7.2.4 Induktion von Bulktumoren

Zur Induktion von Bulktumoren wurden Tumorzellen wie unter 4.6.3. beschrieben vorbereitet und direkt im Anschluss auf Eis gekühlt zur Tierhaltung verbracht. Die narkotisierten Tiere wurden in der Flankenregion geschoren, die Haut desinfiziert und die Zellen subkutan injiziert. Das Tumorwachstum wurde täglich kontrolliert und alle 2 Tage gemessen.

4.7.2.5 Implantation der Tumorfragmente

Um ein gleichmäßiges Tumorwachstum ohne Versprengung von Tumorgewebe zu

erhalten wurden den Tieren statt einer Tumorzellsuspension in einer kleinen OP etwa 2 mm große Tumorstückchen unter die Haut implantiert. Hierfür wurde in einem „Spendertier“ zunächst ein etwa 1cm großer Bulkumor erzeugt. Nach Euthanasie wurde der Tumor entnommen und in ca. 2 mm große Stücke zerteilt. Nach Rasur und Hautdesinfektion der lateralen Hintergliedmaße wurde unter Narkose ein etwa 0,5 - 1 cm großer Hautschnitt durchgeführt. Mit einer Pinzette wurde dieser vorsichtig gespreizt und ein kleiner subkutaner Tunnel erzeugt. In diesen wurde ein ca. 2 mm großes Tumorfragment eingebracht und der Hautschnitt anschließend bei den Ratten mit 1-2 Einzelknopfnähten, bei Mäusen mit Gewebekleber verschlossen. Tumorfragmente wurden zudem bis zur späteren Implantation zur Erzeugung eines neuen Bulkumors bei -80 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.7.2.6 Regionale Hyperthermie Wasserbad

Zur HT-Behandlung wurden die Tiere anästhesiert und die tumortragende Gliedmaße einmal mit Folie umwickelt, um eine Ödematisierung des Gewebes zu verhindern. Ein Wasserbad wurde randvoll mit VE-Wasser gefüllt, auf 42 °C erwärmt und mit einer 1 cm dicken Plexiglasscheibe abgedeckt. Durch Perforationen in der Plexiglasscheibe konnte die tumortragende Gliedmaße in das Wasserbad getaucht werden, während das Tier auf isolierenden Styroporplatten auf der Plexiglasscheibe lag. Vor Beginn der Behandlung wurde das Tumorgewebe 10 min im Wasserbad vorgewärmt. Die systemische Applikation der Liposomenlösung erfolgte bei der Maus in die V. coccygea und bei der Ratte in die V. penis. Anschließend folgte eine HT-Behandlung über 1 h, während der die Körpertemperatur des Tieres mit einer rektalen Messsonde kontrolliert wurde. Bei einem Anstieg über 37 °C wurde die Körpertemperatur durch die Luftströmung eines Ventilators abgesenkt.

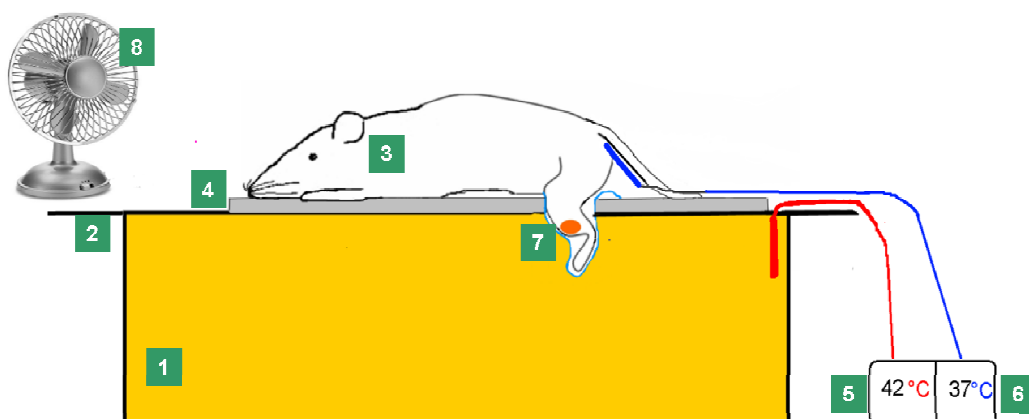


Abbildung 13 Skizze HT mit Wasserbad im Tiermodell;

1 Wasserbad 2 Plexiglasscheibe 3 Versuchstier (Maus/ Ratte) 4 Isolierende Unterlage 5 Temperaturmessung Wasserbad 6 Rektale Temperatur Versuchstier 7 Hintergliedmaße mit Tumor; hellblau: Folie 8 Ventilator zur Herabsetzung der Körpertemperatur



Abbildung 14 Foto HT mit Wasserbad im Tiermodell

4.7.2.7 Lokale Hyperthermie Lampe

Die Ratten wurden während der HT auf eine auf 38 °C temperierte Wärmematte gelegt, um die physiologische Körpertemperatur während der Narkose aufrechtzuerhalten. Vor Beginn der HT wurde die den Tumor umgebende Haut mit Watte abgeklebt, um eine lokale HT des Tumorgewebes zu gewährleisten und eine unbeabsichtigte Erwärmung gesunden Gewebes zu vermeiden. Nach der systemischen Applikation der Liposomenlösung wurde eine feine Kanüle in die Mitte des Tumors geschoben, um anschließend die Temperaturmesssonde einführen zu können. Der bewegliche Schwanenhalslichtleiter der Kaltlichtlampe wurde mit einem Abstand von 8-10 cm zum Tumor platziert (Abbildung 15). Sobald eine Tumorentemperatur von 41 °C erreicht worden war (5-10 min) begann die HT-Behandlung von 1 h. Die Tumortemperatur wurde während der gesamten HT kontrolliert und alle 5 min protokolliert. Bei Abweichungen von 41 °C wurde die Lichtintensität (stufenlos verstellbar) oder der Abstand des Lichtleiters zum Tumor angepasst. Nach der HT wurden die Tiere nach Erwachen aus der Narkose zurück in die Käfige gesetzt.



Abbildung 15 Foto; Aufbau Tiermodell; HT mit Kaltlichtquelle

4.7.2.8 Therapeutische Studien

Das Tumorzellen wurden anhand der Ellipsoidformel (67) ermittelt. Hierfür wurde alle zwei Tage die maximale Länge, Breite und Höhe des Tumors mit einem digitalen Messschieber gemessen.

Ellipsoidformel zur Tumorzellenberechnung

$$V = a \times b \times c \times \frac{\pi}{6}$$

V = Tumorzellen

a = max. Tumorzellenlänge

b = max. Tumorzellenbreite

c = max. Tumorzellenhöhe

Bei Berechnung der relativen Tumorzellen wurde auf die Tumorzellengröße zu Beginn der Behandlung referenziert.

4.7.3 Überblick Versuchsreihen

4.7.3.1 Maus

4.7.3.1.1 Tumorhistologie

Für die histologische Charakterisierung wurde wie in 4.7.2.4 für Bulktumoren beschrieben FaDu-Zellen in die rechte und linke Flankenregion einer NRMI-nude Maus bzw. BN175 Zellen in gleicher Position einer BN Ratte injiziert. Bei Erreichen eines Durchmessers von 1 cm wurden die Tiere euthanasiert, der Tumor exzidiert und in 4 % Formalin gebettet. Die histologischen Schnitte (He-Färbung) wurden nach Standardmethoden im Institut für Pathologie am Campus Großhadern der LMU München angefertigt.

4.7.3.1.2 Pharmakokinetik

Die Injektion der Liposomenlösung erfolgte über die V. coccygea. Jedem Tier wurde je einmal aus der linken, bzw. rechten V. facialis ca. 200 µl Blut entnommen. Durch den Nackengriff wird die Maus fixiert und gleichzeitig die V. facialis gestaut. Die Vene wird anschließend mit einer Blutlanzette punktiert, das heraustropfende Blut im heparinisierten Eppendorfgefäß (2,5 µl Heparin 25.000 IE auf 100 µl Blut) aufgefangen und anschließend zur Plasmagewinnung 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Jede Probe umfasste ca. 50 - 100 µl Plasma und wurde bis zur Doxorubicinbestimmung mittels HPLC bei -20 °C gelagert. Nach Euthanasie durch CO₂-Begasung wurden die Organe perfundiert (siehe 4.8.2.) und Leber, Herz und Milz bei -80 °C ebenfalls bis zur Messung der Doxorubicinkonzentration eingefroren. Aufschluss über Entnahmezeitpunkte von Blutproben und Plasma sowie verwendete liposomale Formulierungen siehe Tabelle 27.

	Formulierung	Blutabnahme	Organentnahme
Kontrollen	NTSL (Caelyx [®])	5-15-30-60-240-480- 1440-2880-4320	30-480-4320
	FDox	5-10-15-30-45-60	30-60
TSL (Dox)	PG ₁ -TSL (Dox)		
	PG ₂ -TSL (Dox)	5-15-30-60-120- 240-480-720-1440	30-240-1440
	PG ₃ -TSL (Dox)		
	P-Lyso-PC TSL (Dox)		

Tabelle 27 Pharmakokinetik Maus; Blutabnahme- und Organentnahmezeitpunkte [min] nach Injektion

Die Probenanzahl für jeden Zeitpunkt beträgt 5. Die Abnahmezeitpunkte für freies Doxorubicin, NTSL (Caelyx®) und der TSL unterscheiden sich, da unterschiedliche Halbwertszeiten zu erwarten waren.

4.7.3.1.3 Dox-Anreicherung und Organverteilung unter Tumor-HT

Mäusen vom Stamm C57BL/6 wurde in beide Hintergliedmaßen je ein BFS-1 Tumor subkutan implantiert (4.8.2.4). Sobald die Tumoren im größten Querschnitt einen Durchmesser von 0,6 - 0,8 cm erreicht hatten wurden die Tiere in die Behandlung eingeschlossen. Die HT wurde wie in 4.8.2.5 beschrieben für einen der beiden Tumoren durchgeführt, während der zweite Tumor nicht erwärmt wurde. Die Tiere wurden direkt im Anschluss an die HT getötet, perfundiert, erwärmte und nicht erwärmte Tumoren sowie Herz, Leber und Milz für spätere Doxorubicinbestimmung bei -80 °C eingefroren. Pro Formulierung wurden 3 Tiere verwendet. Die Doxorubicindosis betrug 5mg/kg.

<u>TSL (Dox)</u>	<u>Kontrollen</u>
• PG ₁ -TSL (Dox)	• FDox
• PG ₂ -TSL (Dox) 100 nm	• NTSL (Caelyx®)
• PG ₂ -TSL (Dox) 200 nm	
• PG ₃ -TSL (Dox)	
• P-Lyso-PC TSL (Dox)	

4.7.3.1.4 Therapeutische Studie im syngenem Tumormodell

Die therapeutische Studie wurde mit je 10 Tieren pro Formulierung durchgeführt. Tumormodell und gestestete Formulierungen siehe Anreicherungsstudie. Die Doxorubicindosis betrug 5 mg/kg.

4.7.3.1.5 Therapeutische Studie im xenogenem Tumormodell

Um die Effizienz von TSL (Dox) auch in einem xenogenem Tumormodell zu testen wurde immundefizienten NMRI-nude Mäusen das humane Plattenepithelkarzinom FaDu implantiert. Für diese Studie wurden die im syngenem Tumormodell effizientesten TSL (Dox) ausgewählt (PG₂-TSL, PG₃-TSL, P-Lyso-PC TSL) und die gleiche Dosis von 5 mg/kg verabreicht. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse mit NaCl oder FDox behandelt. Es wurden 8 Mäuse pro Formulierung eingesetzt.

4.7.3.2 Ratte

4.7.3.2.1 Pharmakokinetik

Die PK in der Ratte wurde während HT-Behandlung einer Hintergliedmaße mittels Wasserbad (siehe 4.8.6.) durchgeführt, um den Einfluss der lokalen Wirkstofffreisetzung

auf die Wirkstoffkinetik zu zeigen. Es wurden die PK Ergebnisse von Tieren verglichen, die eine HT-Behandlung mit 37 °C oder 42 °C temperierten Wasserbad erhielten.

	Formulierung	Blutabnahme
Kontrolle	NTSL (Caelyx [®])	2-5-10-20-30-45-60
	PG ₂ -TSL (Dox)	
TSL (Dox)	PG ₃ -TSL (Dox)	2-5-10-20-30-45-60
	P-Lyso-PC TSL (Dox)	

Tabelle 28 Pharmakokinetik Ratte; n = 3 pro Zeitpunkt

Zur Erleichterung der Blutabnahme wurde den Ratten 30 min vor Versuchsbeginn 40 µl Heparin 25.000 IE/ml s.c. verabreicht. Die Versuche fanden unter Isoflurannarkose statt. Vor systemischer Applikation der Liposomenlösung über die V. penis wurde eine erste Blutprobe gewonnen. Die Blutabnahme erfolgte durch Anritzen der V.coccygea mit einem Skalpell, etwa 1,5 cm vom distalen Ende des Schwanzes, durch einen ca. 2 mm tiefen Schnitt. Die Blutropfen wurden mit Mikrovetten (Antikoagulant: Lithium-Heparin) aufgefangen, sofort auf Eis gekühlt und zur Plasmagewinnung 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Plasma wurde bis zur Doxorubicinbestimmung über die die HPLC bei -20 °C eingefroren. Weitere Blutproben wurden aus gleicher Stelle entnommen.

4.7.3.2.2 Anreicherung und Organverteilung unter HT

Die Anreicherungsstudie wurde wie die Anreicherungsstudie in den Mäusen durchgeführt (Gleiche Formulierungen; PG₂ -TSL (Dox) nur als 100 nm Liposomen). Zusätzlich wurden 3 Ratten, die mit den langzirkulierenden NTSL (Caelyx[®]) behandelt wurden erst 24 h nach HT zur Organ- und Tumorentnahme getötet. Allen Tieren wurde terminal vor der Organperfusion 200 µl Blut aus der rechten Herzkammer entnommen, um die Doxorubicinkonzentration aus dem Plasma zu bestimmen.

4.7.3.2.3 Therapeutische Studie - Hyperthermie mit Wasserbad

Je 6 Tiere wurden mit 5 mg/kg PG₂-TSL (Dox), PG₃-TSL(Dox), P-Lyso-PC TSL (Dox), NTSL (Caelyx[®]), FDox oder NaCl behandelt und Tumorwachstum, sowie Gewicht der Tiere alle zwei Tage kontrolliert.

4.7.3.2.4 Therapeutische Studie - Hyperthermie mit Lampe

In einem Vorversuch wurde evaluiert, in welchem minimalen Abstand die Lampe zum Tumor positioniert werden kann, um Verbrennungen der Haut zu vermeiden und eine konstante, intratumorale Temperatur von 41 °C zu erreichen. Außerdem wurden 2 Tiere

mit 5 mg/kg Doxorubicin +HT behandelt, um auszuschließen, dass die Toxizität bei der Wasserbad-HT durch eine zu hohe Dosis verursacht wurde. Anschließend wurde für den entscheidenden Versuch die Dosis auf 2 mg/kg Dox reduziert. Je 6 Tiere wurden mit PG₃-TSL (Dox) oder P-Lyso-PC TSL (Dox) behandelt. Jeden zweiten Tag wurden die Tiere gewogen und die Tumorgöße mit einem digitalen Messschieber gemessen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Liposomenherstellung und Charakterisierung

Alle verwendeten Liposomenchargen wurden nach der Herstellung bezüglich Vesikelgröße, PDI, ζ -Potential, T_m und Wirkstoff-Lipid Verhältnis charakterisiert (Ergebnisse siehe Diagramme). Um die gewünschte Lipidkomposition der Vesikelmembran zu prüfen, wurde außerdem mittels Dünnschichtchromatographie der molare, prozentuale Anteil von DPPG_n, und Lysolipiden bestimmt. Eine Auftrennung zwischen DPPC und DSPC war nicht möglich, so dass der Gesamtgehalt bestimmt wurde. Die prozentualen Anteile entsprachen bei den verwendeten Chargen den zuvor abgewogenen Mengen. Bei den PG-TSL (Dox) lagen keine messbaren Mengen, bzw. bei den Lyso-PC TSL (Dox) keine erhöhten Anteile an Lysolipiden vor. Somit lag zum Zeitpunkt der Verwendung in keiner Charge eine Beeinträchtigung der Liposomenqualität z.B. durch Lipidhydrolyse vor.

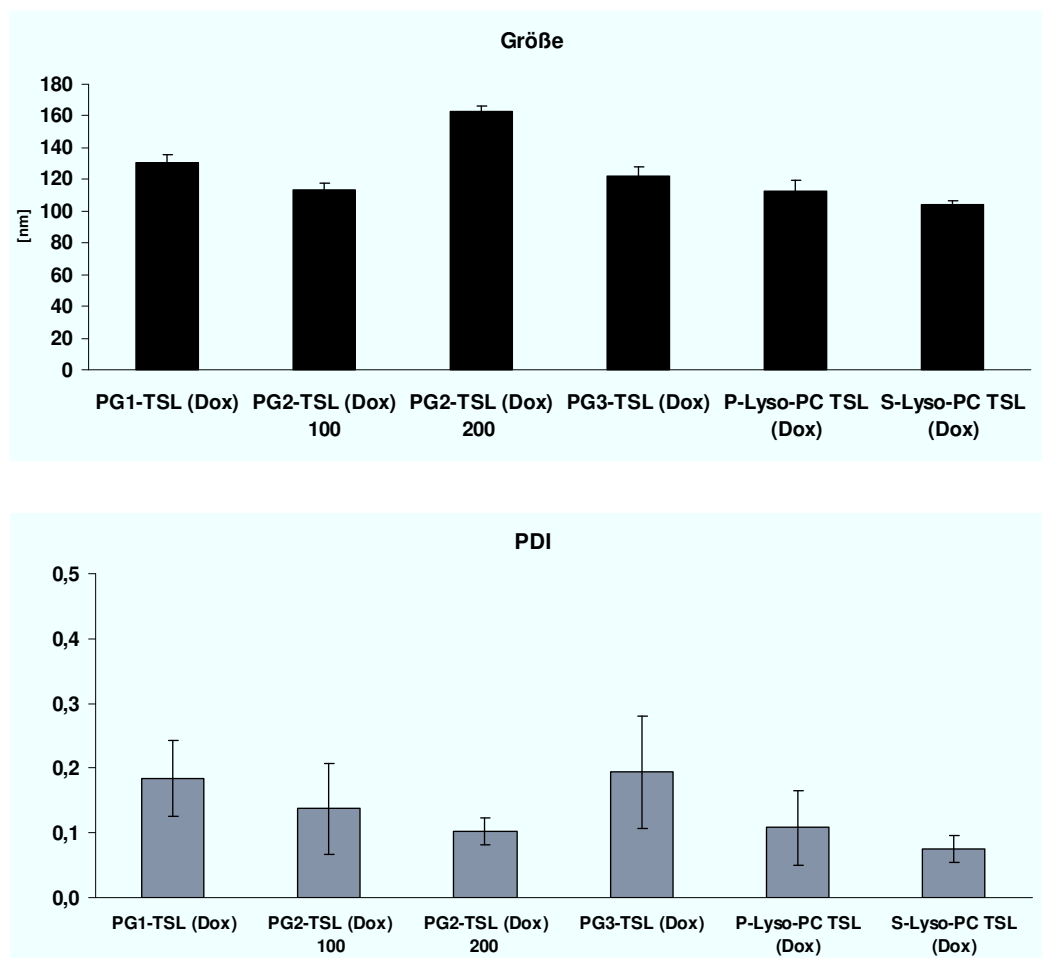


Abbildung 16 Größe und PDI verwendeter Liposomenchargen ; Extrusion aller Chargen durch 100 nm Polycarbonatfilter (Ausnahme: PG₂-TSL (Dox) 200 durch 200 nm Polycarbonatfilter)

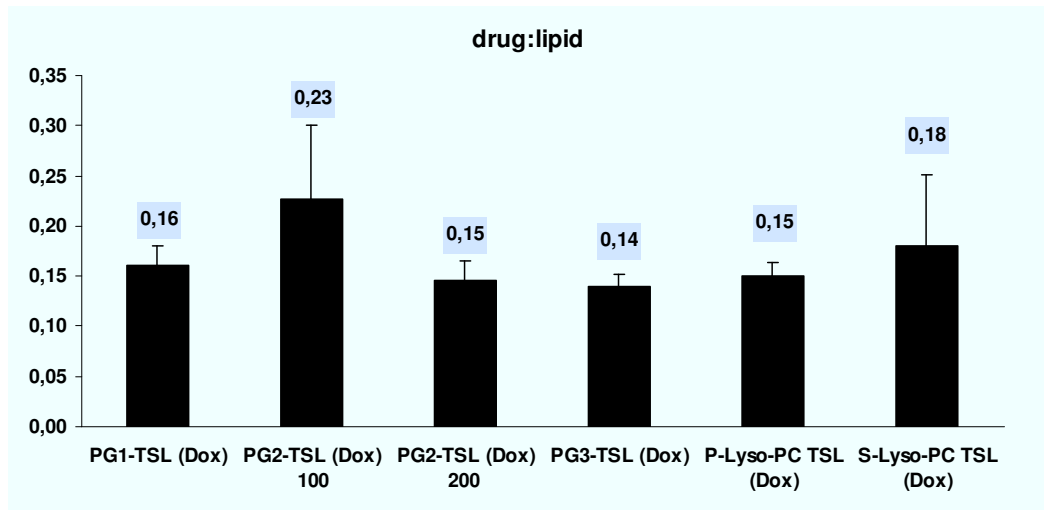


Abbildung 17 Wirkstoff-Lipid Verhältnis verwendeter Liposomenchargen

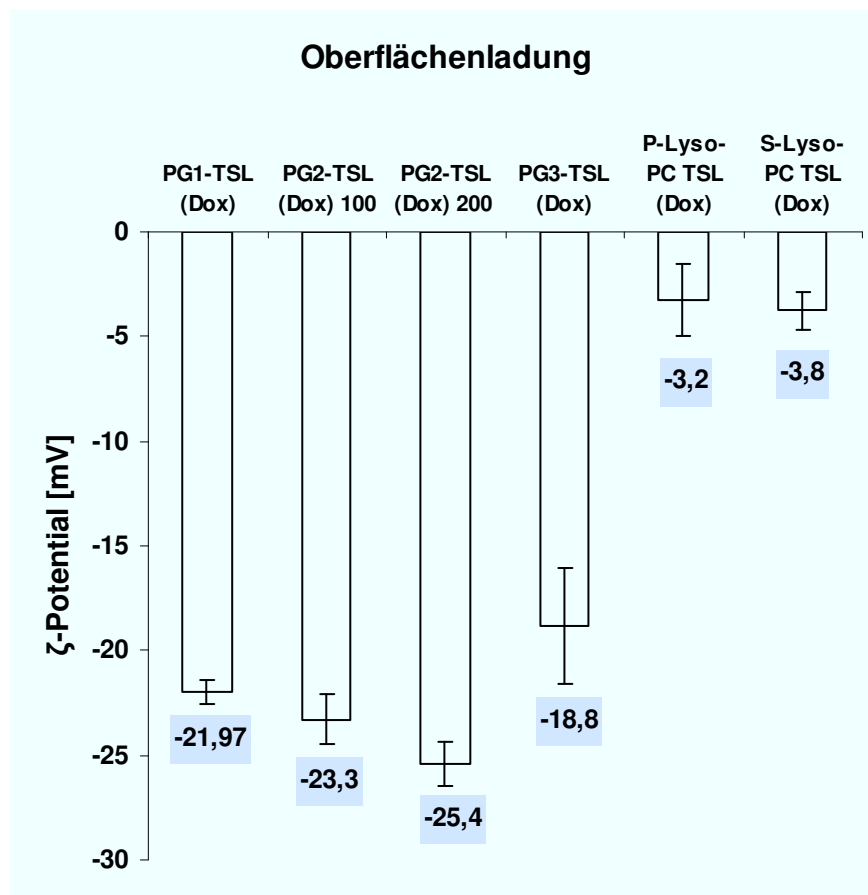


Abbildung 18 Zetapotential verwendeter Liposomenchargen

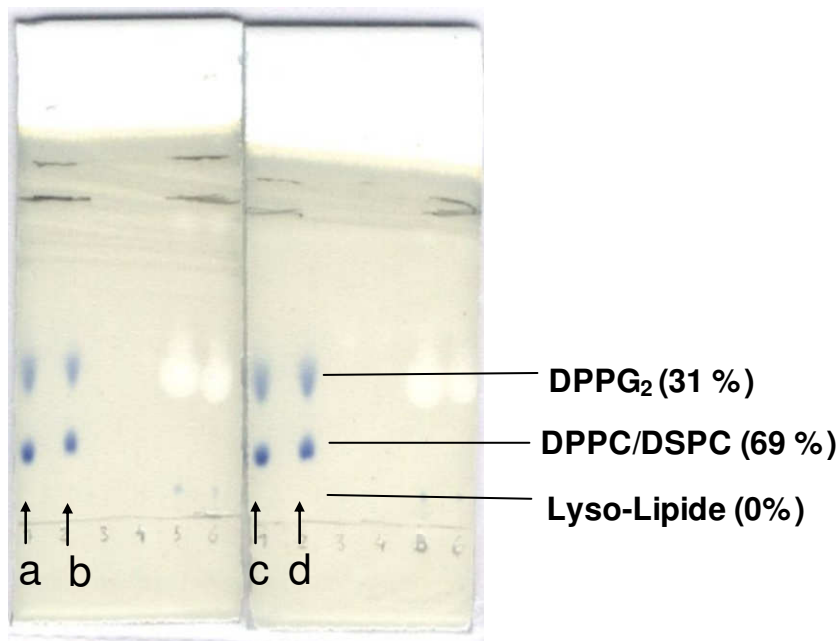


Abbildung 19 Repräsentative Dünnschichtchromatographie ; DPPG₂-TSL der Chargen a, b, c und d

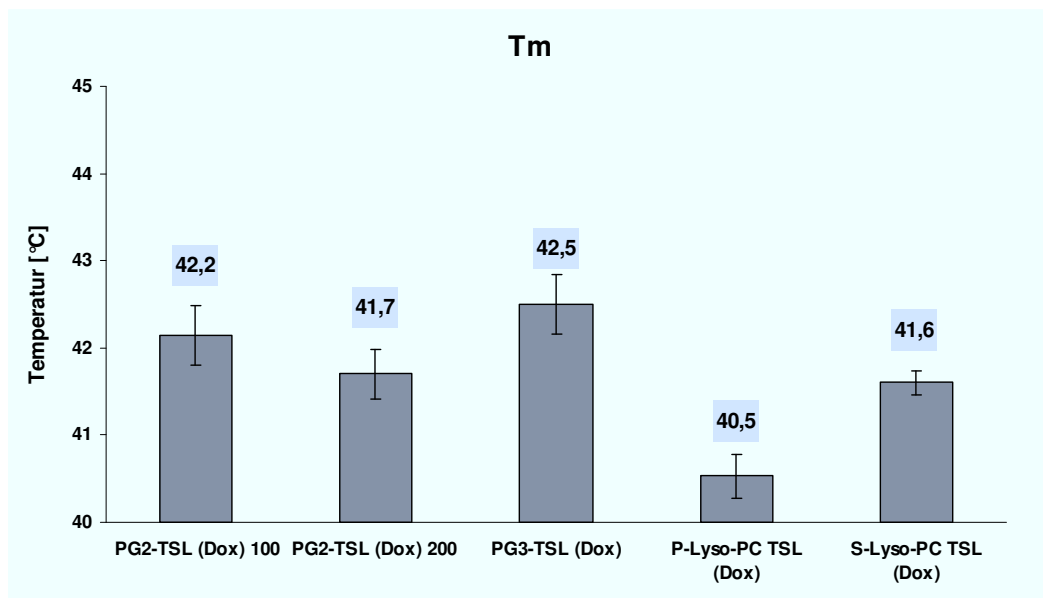


Abbildung 20 Phasenumwandlungstemperatur verwendeter Chargen; (PG1-TSL (Dox) nicht gemessen)

5.2 Versuche in vitro

5.2.1 Einfluss von Plasma und Spezies auf Freisetzungverhalten

Die Versuche wurden mit zwei PG-TSL Formulierungen durchgeführt, die sich in ihrem molaren Anteil an PG₂ in der Membran unterschieden. Neben der klassischen Formulierung mit 30 % PG₂ wurden die Versuche mit einer 10 %igen PG₂-Formulierung

wiederholt. Letztere weist eine höhere Stabilität auf und eignet sich besser den Effekt von Plasma allein auf die Freisetzungsrates der PG-TSL herauszustellen. Außerdem sollten mögliche Unterschiede in der Freisetzungsrates verschiedener Plasmen anhand einer zweiten PG-TSL Formulierung dargestellt werden.

PG-TSL (Dox)	Größe (nm)	PDI	Wirkstoff-Lipid Verhältnis [m/m]
DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50:20:30 (m/m)	121	0,11	0,1
DPPC/DSPC/DPPG ₂ 70:20:10 (m/m)	117	0,09	0,1

Tabelle 29 TSL (Dox) für Messung der temperaturabhängigen Dox-Freisetzung

Dox-Freisetzung wurde getestet in:

- HN-Puffer (pH 7,4)
- FCS
- Mausplasma
- Hamsterplasma
- Rattenplasma
- Humanplasma

5.2.1.1 DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (m/m)

60 min Inkubation

Die Freisetzungsmenge innerhalb von 60 min ist bei 37 °C in allen Plasmen mit etwa 15 - 20 % vergleichbar. In HN-Puffer wurde dagegen nur 1,9 ±1,5 % Dox aus den TSL freigesetzt. Eine höhere Freisetzung erfolgte dagegen in FCS mit 35,6 ±10,5 %. Bei 42 °C beträgt die Freisetzung nach einer Stunde in allen Milieus 90-100 %.

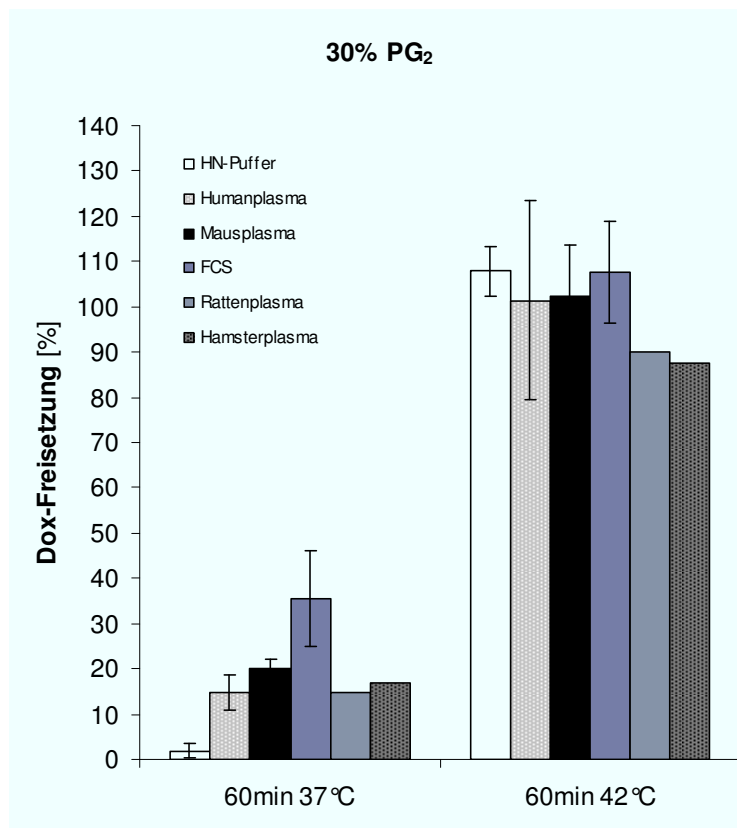


Abbildung 21 Dox-Freisetzung nach 60 min Inkubation ; in HN-Puffer, FCS und in Plasmen verschiedener Spezies

5 min Inkubation

Bei 37 °C sind die TSL unabhängig in welchem Milieu sie inkubiert wurden weitgehend stabil (< 10 % Freisetzung). Bei einer Temperatur von ≥ 40 °C werden jedoch über 90 % des enkapsulierten Wirkstoffs freigesetzt. Die Freisetzungen gemessen in verschiedenen Plasmen sowie Puffer unterscheiden sich jedoch im Temperaturbereich zwischen 38-40 °C. Die Freisetzung beträgt in Mäuseplasma bei 38 °C schon 25 % während in allen anderen Plasmen nur um die 10 %, in HN-Puffer unter 1 % freigesetzt werden. Bei 39 °C ist der Unterschied der Freisetzungsraten zwischen Mausplasma (89.6 ± 10.5 %) und Plasma anderer Spezies (28.5 ± 2.3 % in Humanplasma, 29.3 ± 4.1 % in Rattenplasma, 34.6 ± 4.4 % in Hamsterplasma and 38.3 ± 2.3 % in FCS) am deutlichsten.

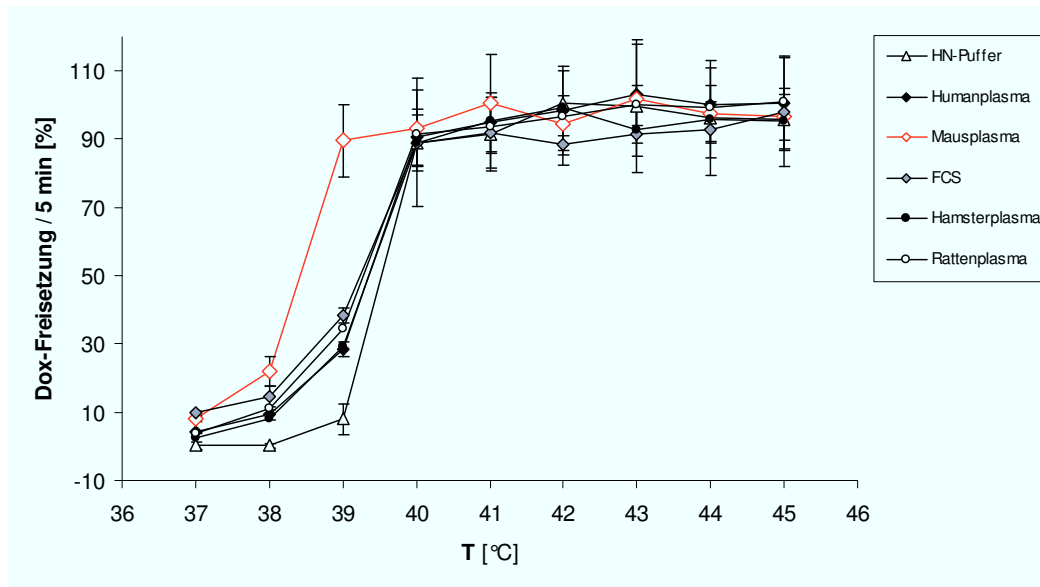


Abbildung 22 Dox-Freisetzungsprofil von PG_2 -TSL (Dox); nach 5 min Inkubation in HN-Puffer und Plasmen verschiedener Spezies; rot: Freisetzung in Mausplasma

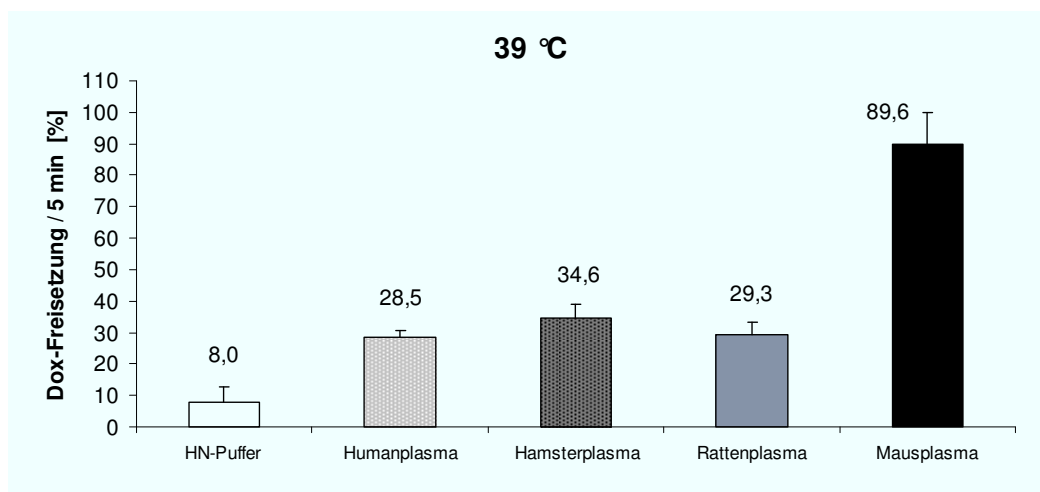


Abbildung 23 Vergleich der Dox-Freisetzung aus PG_2 -TSL (Dox); in HN-Puffer und Plasmen verschiedener Spezies; nach 5 min Inkubation bei 39 °C

5.2.1.2 DPPC/DSPC/DPPG₂ 70:20:10 (m/m)

60 min Inkubation

In HN-Puffer bei 37 °C sind die 10 % PG_2 -TSL (Dox) mit einer Freisetzungsrate von $1,2 \pm 1,7$ % auch über 60 min stabil. Bei gleicher Temperatur wird in Humanplasma $6,1 \pm 0,2$ % und in FCS $10,2 \pm 2,1$ % freigesetzt. Am instabilsten ist diese Formulierung in Mausplasma, wo die Dox-Freisetzung $12,8 \pm 0,2$ % beträgt. Werden die TSL bei 42 °C inkubiert wird auch in HN-Puffer etwa die Hälfte des eingeschlossenen Dox freigesetzt ($49,4 \pm 23,6$ %). In Human- und Mausplasma sowie FCS beträgt die Freisetzungsrate unter diesen Bedingungen $76,8 \pm 3,5$ % $81,9 \pm 4,6$ % bzw. $92,5 \pm 6,4$ %.

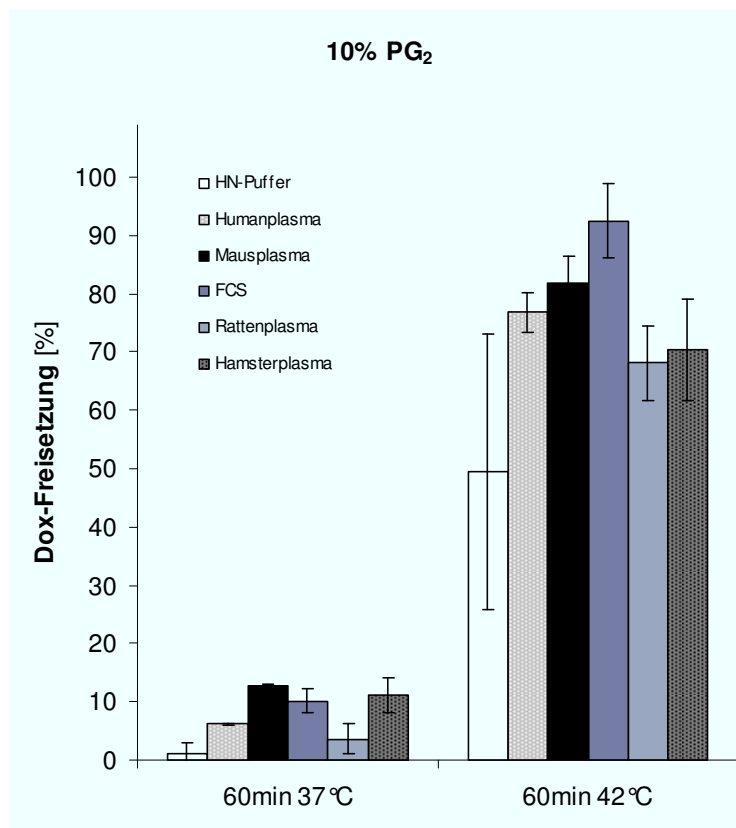


Abbildung 24 Dox-Freisetzung aus DPPC:DSPC:DPPG₂ 70:20:10 (m/m) ; nach 60 min Inkubation in HN-Puffer, FCS und in Plasmen verschiedener Spezies

5 min Inkubation

Die 10 mol % PG₂-TSL (Dox) sind in Puffer über einen Temperaturbereich von 37 °C – 45 °C stabil. Die Dox-Freisetzung bleibt hier stets unter 2 %. In verschiedenen Plasmen und in FCS gemessen ergibt sich die gleiche Tendenz wie mit den 30 mol % PG₂-TSL (Dox). In Mausplasma beginnt die Freisetzung schon bei niedrigeren Temperaturen. Die Unterschiede sind insbesondere bei 39 und 40 °C deutlich. Gegenüber den anderen Plasmen mit Freisetzungsraten von $8,8 \pm 3,5$ % (Rattenplasma), $10,9 \pm 1,2$ % (Hamsterplasma) und $9,1 \pm 0,3$ % (Humanplasma) wird in Mausplasma bei 39 °C mit $22,7 \pm 5,6$ % bereits doppelt so viel Dox freigesetzt. Auch bei 40 °C ist die Freisetzungsrates in Mausplasma mit $36,4 \pm 6,7$ % deutlich höher als in anderen Plasmen. Bei Temperaturen über 40 °C sinkt die Freisetzungsrates im weiteren Kurvenverlauf bis 45 °C bei in allen Plasmen

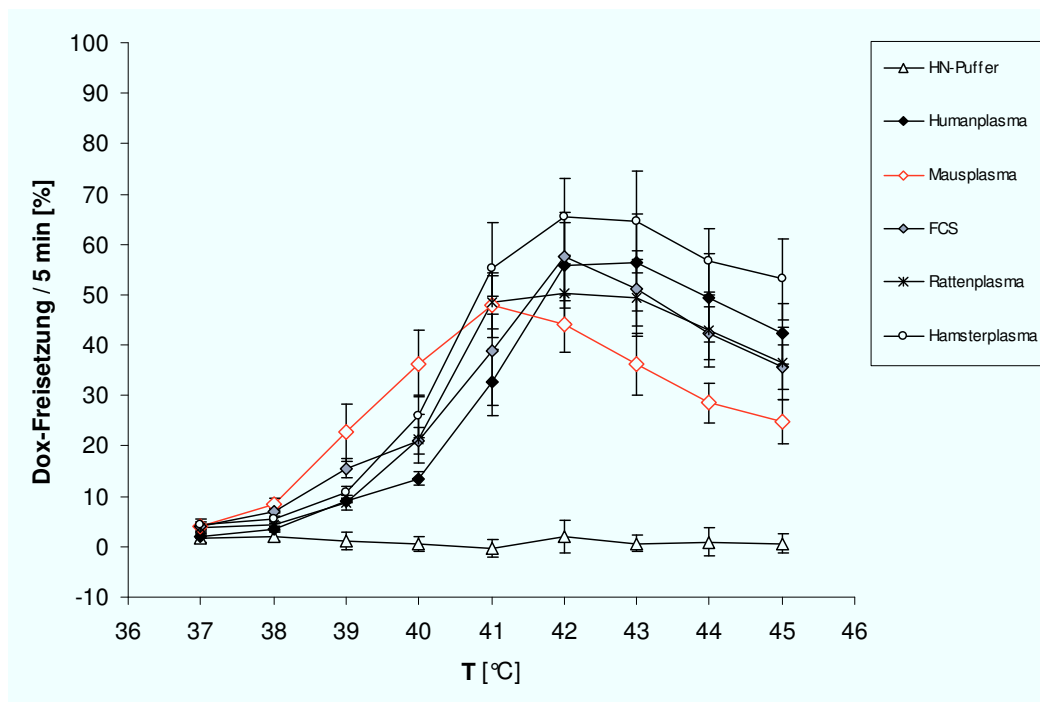


Abbildung 25 Dox-Freisetzungsprofil von DPPC:DSPC:DPPG₂ 70:20:10 (m/m) ;nach 5 min Inkubation in HN-Puffer und Plasmen verschiedener Spezies; rot: Freisetzung in Mausplasma

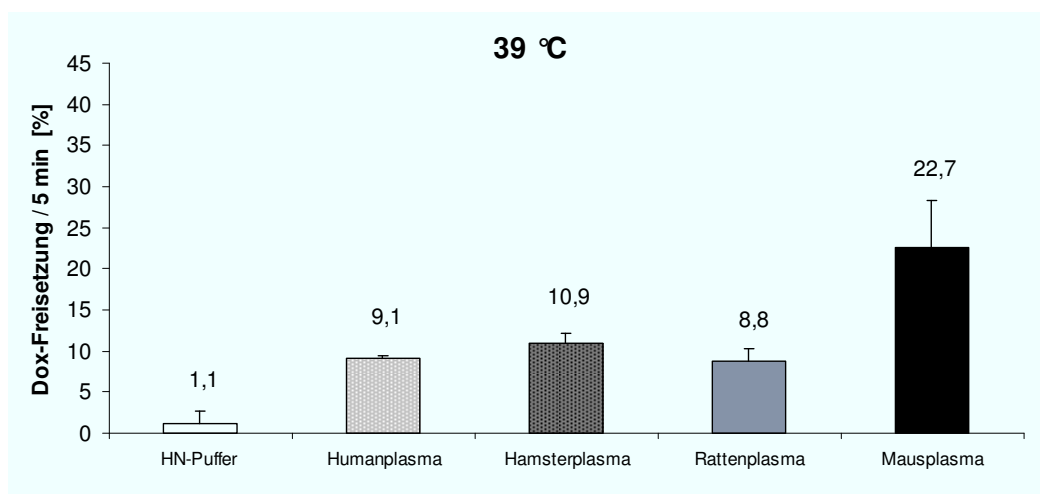


Abbildung 26 Dox-Freisetzung aus DPPC:DSPC:DPPG₂ 70:20:10 (m/m); Vergleich in HN-Puffer und Plasmen verschiedener Spezies nach 5 min Inkubation bei 39 °C

5.2.2 Vergleich von P-Lyso-PC (Dox) und S-Lyso-PC (Dox)

DPPC:Lyso-PC:PEG₂₀₀₀ 90:10:4 (m/m) ist die erste und bisher einzige TSL-Formulierung, welche in klinischen Studien getestet wird. Diese TSL-Formulierung hat den Vorteil einer sehr schnellen Freisetzungsrates bei Temperaturen um 40 °C, ist aber problematisch bezüglich ihrer Plasmastabilität. In der Literatur wird als Membranbestandteil sowohl P-Lyso-PC, als auch S-Lyso-PC basierend auf Palmitoylsäure bzw. Stearoylsäure beschrieben (68, 69). Die Fettsäurekette von

Stearoyleure (C_{18}) besitzt zwei Kohlenstoffatome mehr als Palmitoyleure (C_{16}). Um zu bewerten in wie weit eine längere Fettsäurekette im Lyso-PC, welches zu ca. 10 % Bestandteil der Liposomenmembran ist, Einfluss auf die Stabilität der TSL ausübt, wurde von beiden Formulierungen die temperaturabhängige Dox-Freisetzung und Öffnungskinetik gemessen.

5.2.2.1 Herstellung und Charakterisierung

Bei der Herstellung und Charakterisierung der Liposomen ergaben sich bezüglich Einschlusseffizienz, Größenverteilung und Zetapotential keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Formulierungen. Die T_m der S-Lyso-PC (41,7 °C) war gegenüber der P-Lyso-PC (40,5) Formulierung um mehr als ein Grad Celsius höher.

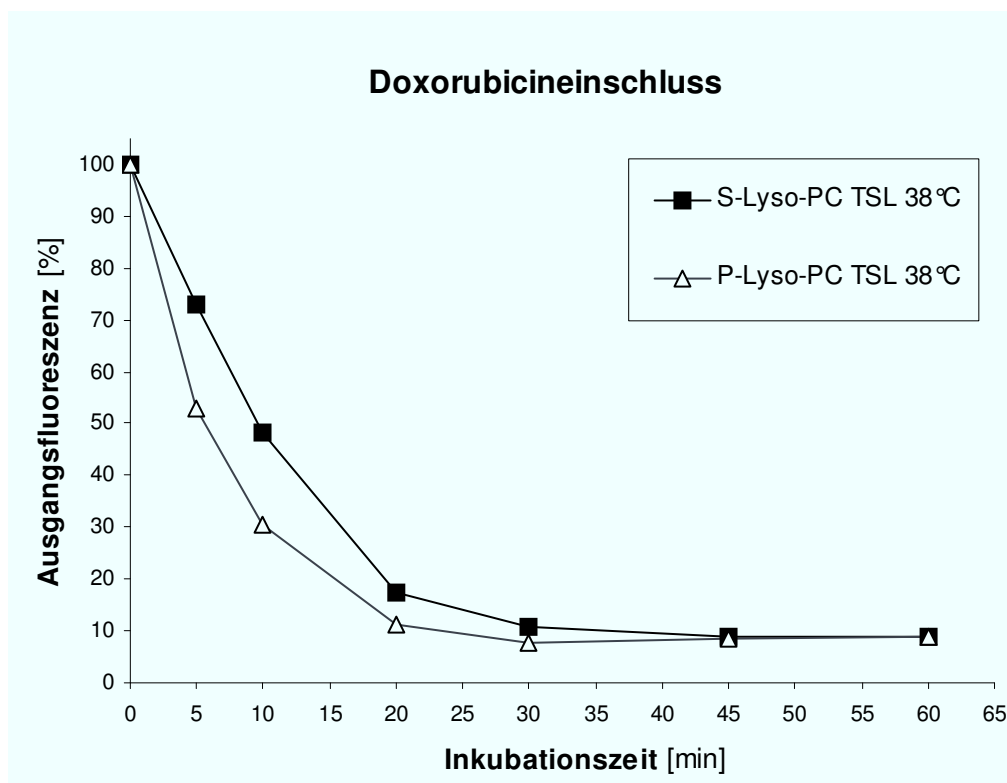


Abbildung 27 Einschlussskinetik von S- und P-Lyso-PC TSL (Dox) bei 38 °C

	Größe [nm]	PDI	ζ-Potential	T_m	Drug:lipid
P-Lyso-PC TSL (Dox)	109	0,12	-1,4	40,3	0,16
S-Lyso-PC TSL (Dox)	99	0,06	-3,1	41,7	0,13

Tabelle 30 Ergebnisse der Charakterisierung der Lyso-PC TSL (Dox)

5.2.2.2 Öffnungskinetik in HN-Puffer

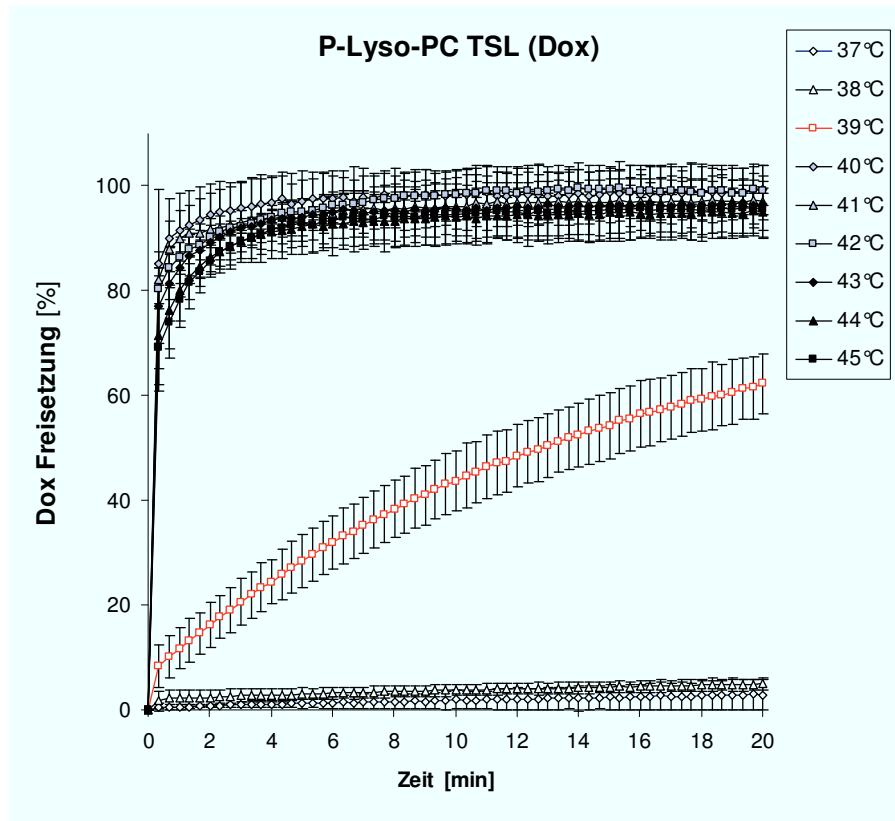


Abbildung 28 Dox-Freisetzung aus P-Lyso-PC TSL (Dox) ; nach Inkubation in HN-Puffer bei Temperaturen zwischen 37 °C und 45 °C

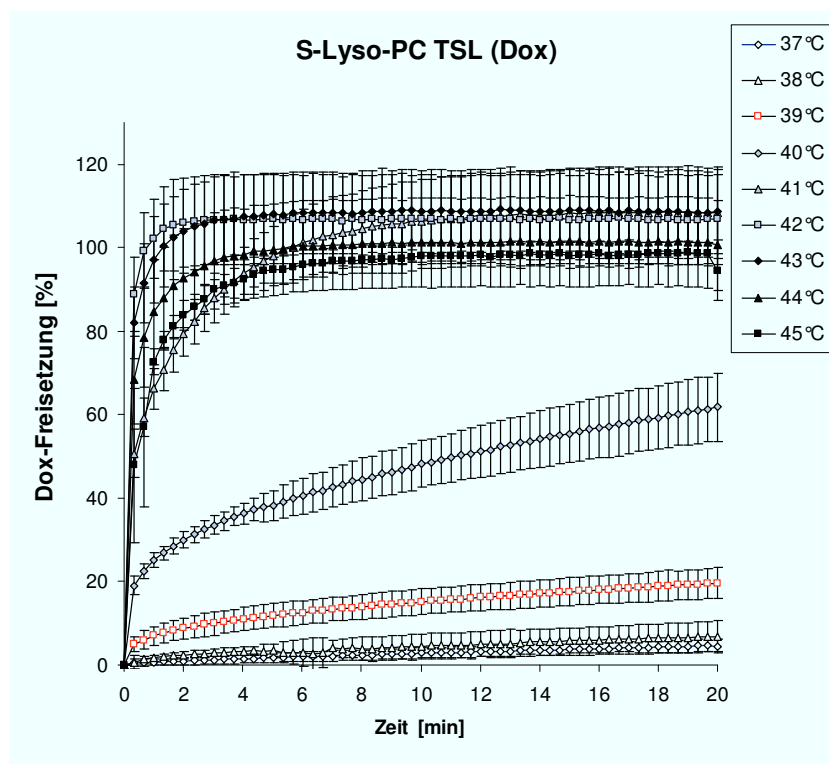


Abbildung 29 Dox-Freisetzung aus S-Lyso-PC TSL (Dox) ; nach Inkubation in HN-Puffer bei Temperaturen zwischen 37 °C und 45 °C

Bei 37 °C und 38 °C sind die Formulierungen in HN-Puffer stabil – es wird innerhalb von 20 min aus beiden TSL unter 2 % des enkapsulierten Doxorubicins freigesetzt. Bei 39 °C divergieren die Freisetzungsraten beider Formulierungen. Nach 10 min Inkubation wurde aus P-Lyso-PC TSL > 40 %, aus S-Lyso-PC TSL lediglich 15 % Doxorubicin freigesetzt. Bei 40 – 45 °C erfolgt bei P-Lyso-PC TSL ein „burst release“, bei dem innerhalb von Sekunden 100 % Doxorubicinfreisetzung erreicht wird. Die Öffnungskinetik der S-Lyso-PC TSL bei 40 °C entspricht etwa der von P-Lyso-PC TSL bei 39 °C. Erst bei Temperaturen über 41 °C kommt es zum so genannten burst release.

Auch die Geschwindigkeitskonstanten unterscheiden sich bei 39 und 40 °C. Bei 39 °C ist die Geschwindigkeitskonstante der P-Lyso-PC TSL doppelt, bei 40 °C 6,5-fach so hoch wie bei den S-Lyso-PC TSL.

T [°C]	P-Lyso-PC TSL (Dox) [10 ⁻⁴ s ⁻¹]	S-Lyso-PC TSL (Dox) [10 ⁻⁴ s ⁻¹]
37	0,3	0,5
38	0,5	1,6
39	8,8	4,0
40	91,7	14,1
41	69,9	85,8

Tabelle 31 Berechnete Öffnungskonstanten von P- und S-Lyso-PC TSL (Dox); gemessen bei Temperaturen zwischen 37 °C und in 42 °C in HN-Puffer

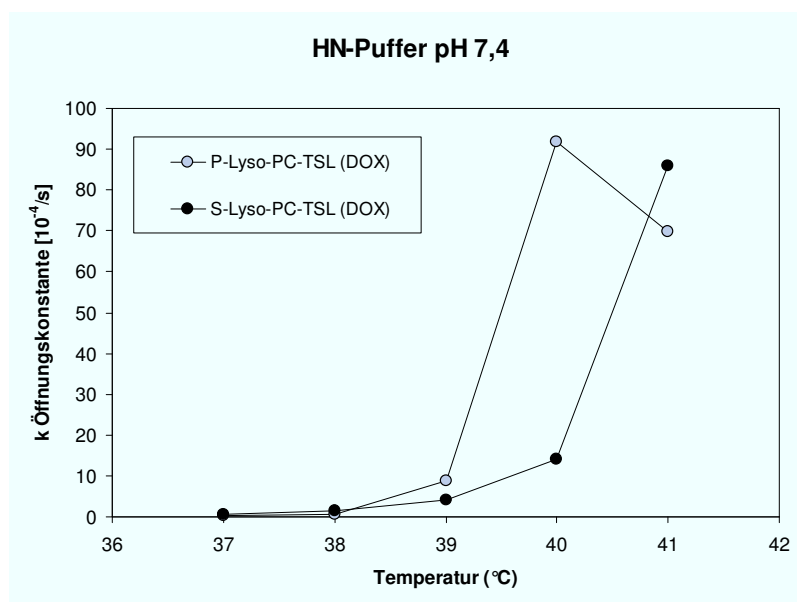


Abbildung 30 Vergleich der Öffnungskonstanten von P- und S-Lyso-PC TSL (Dox)

5.2.2.3 Temperaturabhängige Dox-Freisetzung in HN-Puffer und FCS

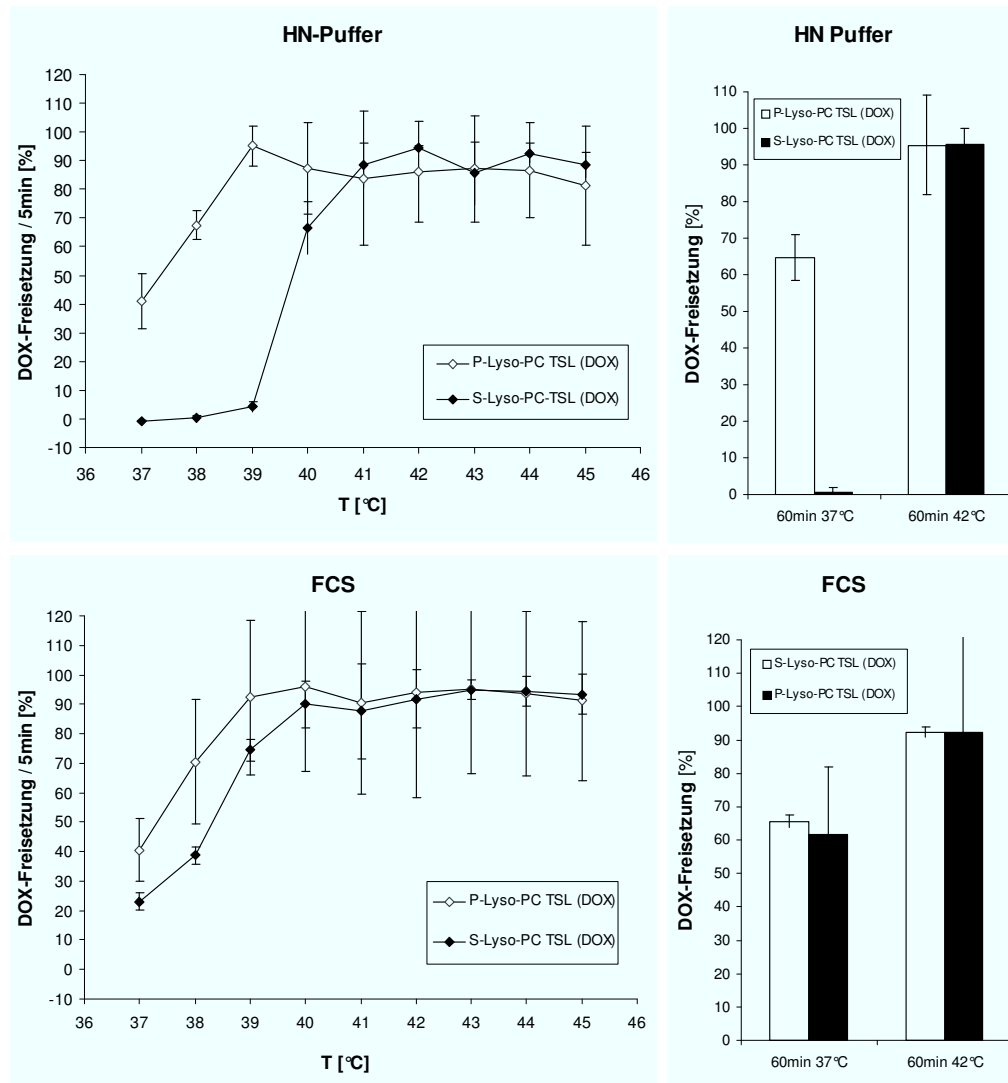


Abbildung 31 Vergleich der temperaturabhängigen Dox-Freisetzung von P- und S-Lyso-PC TSL (Dox) ; gemessen in HN-Puffer und FCS

Die Formulierungen unterscheiden sich insbesondere in ihren Freisetzungsraten nach 5 min Inkubation in Puffer. Bis zu 39 °C ist die Freisetzung aus S-Lyso-PC nur marginal während aus P-Lyso-PC TSL bereits 95 % Dox freigesetzt werden. Bei 40 °C wird bereits 70 % (S-Lyso-PC TSL) bzw. 90 % (P-Lyso-PC TSL) Dox freigesetzt und bei Temperaturen über 40 °C bei beiden Formulierungen 100 %. P-Lyso-PC TSL haben ihre maximale Freisetzung bereits bei 39 °C. Die Inkubation über 60 min bei 37 °C der P-Lyso-PC TSL führt zu etwa 65 % Doxorubicinfreisetzung. Unter gleichen Bedingungen wird aus S-Lyso-PC TSL nur 2 % Doxorubicin freigesetzt.

Serumkomponenten relativieren diesen Unterschied und die Kurven gleichen sich an. Die maximale Freisetzung in FCS ist bei beiden Formulierungen bei ≥ 40 °C. Nach 60 min Inkubation in FCS bei 42 °C wird aus beiden Formulierungen etwa 65 % Doxorubicin

freigesetzt.

5.2.3 Einfluss von Verdünnung auf Liposomenstabilität

Für ein effizientes *drug targeting* ist die Stabilität der Liposomen eine wichtige Voraussetzung. Plasma- und Serumkomponenten führen zu einer entscheidenden Herabsetzung der Liposomenstabilität (70-72). Zudem werden die Liposomen durch Injektion in den Blutkreislauf einer starken Verdünnung unterworfen. Um der Frage nachzugehen, ob allein eine Verdünnung der Liposomenlösung schon zu einem Stabilitätsverlust führt wurde das Wirkstoff-Lipid Verhältnis verschiedener Formulierungen vor und nach einer mehrstündigen Dialyse in physiologischer Kochsalzlösung untersucht. Bleiben die Liposomen trotz Verdünnung im Dialyseschlauch stabil, verändert sich das Verhältnis von Wirkstoffkonzentration zum Lipidgehalt nicht. Wird der Wirkstoff Dox aufgrund einer Instabilität der Liposomenmembran aus den Liposomen freigesetzt, diffundiert dieser über die Membran des Dialyseschlauches, so dass das Wirkstoff-Lipid Verhältnis sinkt.

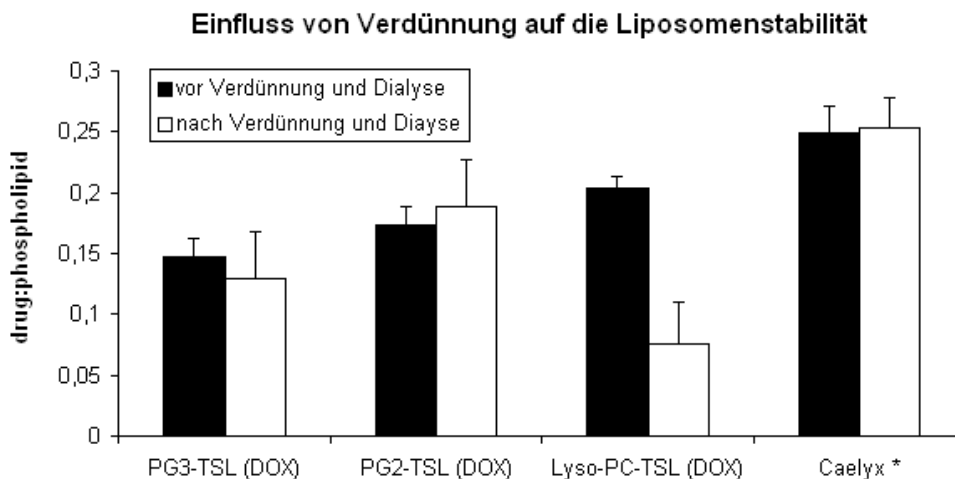


Abbildung 32 Wirkstoff-Lipid Verhältnis ;vor (schwarze Balken) und nach (weiße Balken) Verdünnung und Dialyse der entsprechenden Liposomenlösungen

Das drug:phospholipid der Stealth-Liposomen (Caelyx[®]) blieb vor der Dialyse ($0,25 \pm 0,02$) und nach der Dialyse ($0,25 \pm 0,03$) unverändert (Faktor $1,02 \pm 0,05$). Bei den PG₂-TSL (Dox) stieg das drug:phospholipid von $0,17 \pm 0,02$ auf $0,19 \pm 0,03$ an (Faktor $1,09 \pm 0,18$). Ein leichter Abfall des drug:phospholipid von $0,15 \pm 0,02$ auf $0,13 \pm 0,04$ wurde bei den PG₃-TSL (Dox) nach der Dialyse gemessen (Faktor $0,87 \pm 0,18$). P-Lyso-PC TSL (Dox) hatten vor der Dialyse ein drug:phospholipid von $0,2 \pm 0,01$, nach der Dialyse $0,08 \pm 0,03$ – ein Abfall um fast 60 % (Faktor $0,37 \pm 0,18$).

Da der Lipidgehalt über eine Phosphatbestimmung erfolgt, werden mit dieser Methode

nur Phospholipide erfasst. Damit wird für Caelyx[®], welches mit Cholesterol auch einen Nicht-Phospholipidanteil in der Liposomenmembran enthält im eigentlichen Sinne das drug:phospholipid bestimmt. Da es bei dem Versuchsergebnis um eine Veränderung des Verhältnisses von Wirkstoff zu Lipidgehalt geht, wird die Auswertung hierdurch nicht beeinträchtigt. Das eigentliche Wirkstoff-Lipid Verhältnis von Caelyx[®] wäre jedoch niedriger als angegeben.

5.2.4 Zytotoxizitätstest Zellkultur

Die Dosiswirkungskurven aller TSL (Dox) Formulierungen gleichen sehr viel stärker der Dosis-Wirkungskurve von FDox als der von der NTSL Formulierung Caelyx[®]. Dies gilt sowohl für eine Inkubation bei 37 °C, als auch bei 42 °C. Der Verlauf der Dosiswirkungskurven der TSL (Dox) und FDox ist, in der logarithmischen Skala dargestellt, sigmoidal. Somit zeigte sich eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die Inkubation der Zellen mit Caelyx[®] führte dagegen zu einem nicht sigmoidalen Kurvenverlauf. Geringe Konzentrationen bis etwa 10 µM Dox resultierten kaum in einem Vitalitätsverlust der Zellen (Plateauphase). Bei steigenden Konzentrationen > 10 µM kam es zu einem starken Abfall der Vitalität im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die IC₅₀ von Caelyx[®] waren von der Inkubationsdauer (15 oder 60 min) nicht beeinflusst. Jedoch zeigte sich ein deutlicher HT-Effekt. Bei 37 °C beträgt die IC₅₀ 130 µM, bei 42 °C ist diese etwa 3-fach erniedrigt (42-47 µM). Die Dosis-Wirkungskurven der verschiedenen TSL (Dox) Formulierungen unterschieden sich nach Inkubation bei 42 °C weder untereinander noch von FDox. HT hatte jedoch bei allen Formulierungen und bei FDox einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Bei 37 °C liegt die IC₅₀ zwischen 1 und 5 µM, bei 42 °C ist diese für alle TSL (Dox) und FDox ≤ 0,9 µM.

Unterschiede in der Zytotoxizität verschiedener TSL (Dox) waren ausschließlich nach Inkubation bei 37 °C für 15 min zu sehen. Die IC₅₀ der PG₂-TSL ist am höchsten (5 µmol) - 5-fach höher als die Lyso-PC TSL und FDox-Werte (1 µM). PG₃-TSL hatten doppelt so hohe IC₅₀-Werte (1,9 µmol) wie Lyso-PC TSL. Die Dosis-Wirkungskurven von P-Lyso-PC TSL (Dox), S-Lyso-PC TSL (Dox) unterschieden sich bei 37 °C kaum von der von FDox.

Nach 60 min Inkubation war sowohl die Zytotoxizität, gemessen an der IC₅₀, im Vergleich zur 15 min Inkubation für Caelyx[®] unverändert, bei allen anderen Formulierungen leicht gesteigert (bei 37 °C als auch bei 42 °C). Nach 60 min Inkubation bei 42 °C unterschieden sich die TSL-Formulierungen mit Ausnahme von Caelyx[®] in ihrer Zytotoxizität nur marginal von FDox.

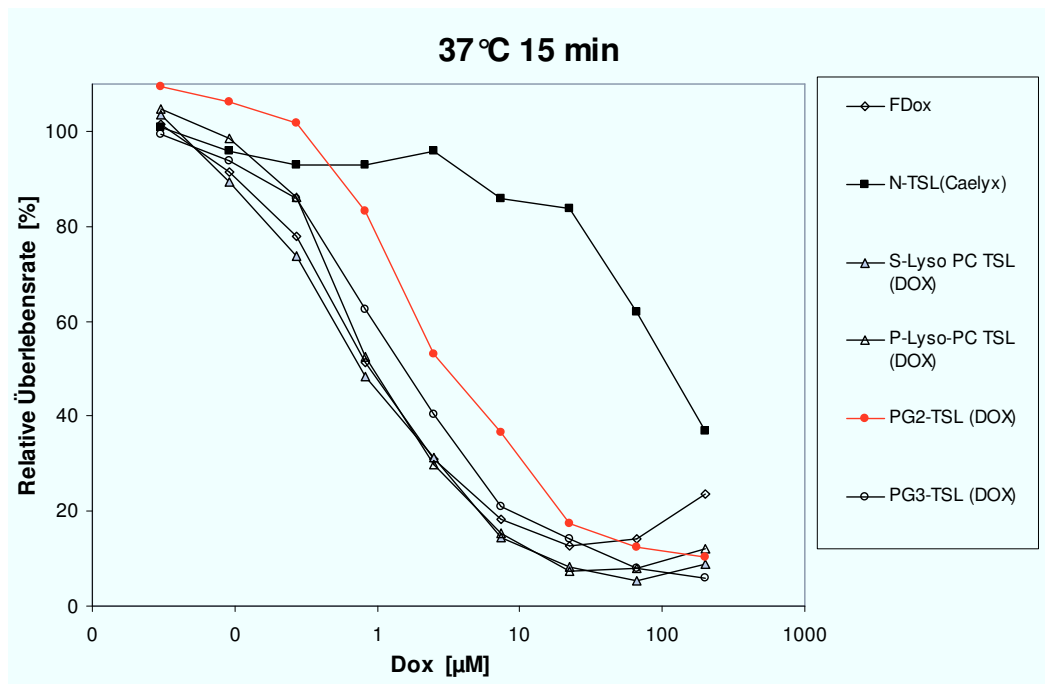


Abbildung 33 Dosis-Wirkungskurve nach 15 min Inkubation bei 37 °C

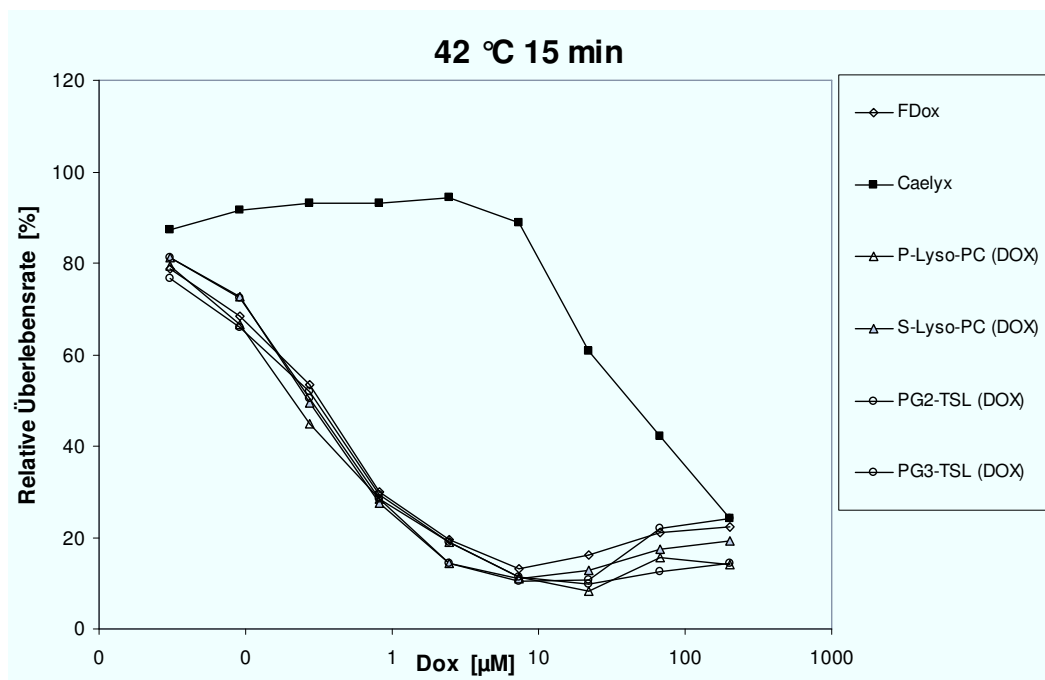


Abbildung 34 Dosis-Wirkungskurve nach 15 min Inkubation bei 42 °C

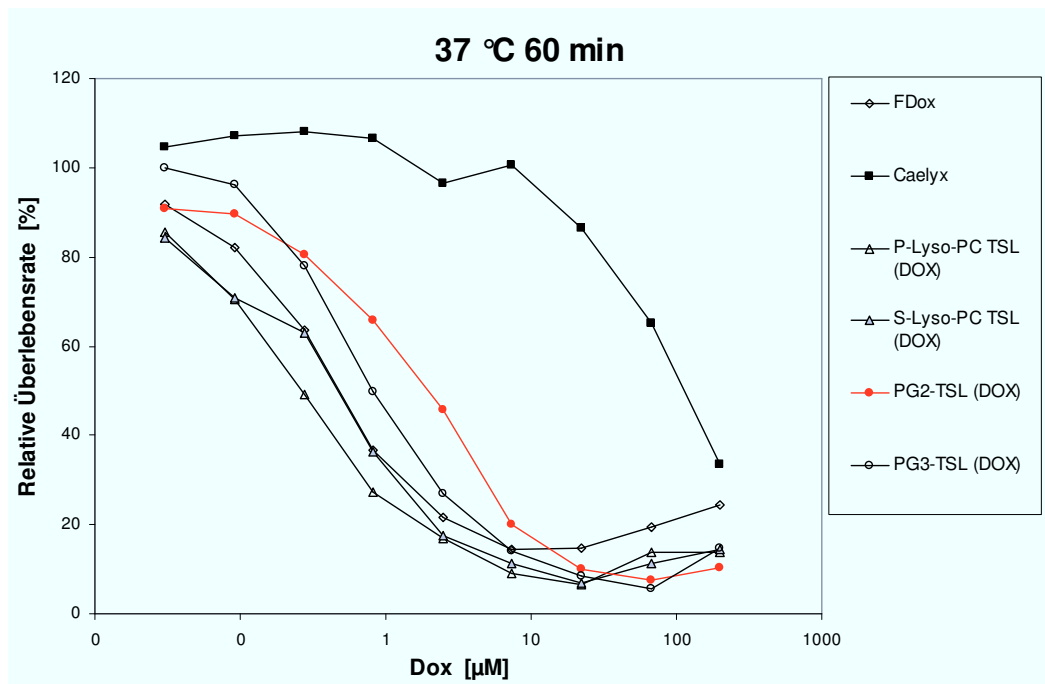


Abbildung 35 Dosis-Wirkungskurve nach 60 min Inkubation bei 37 °C

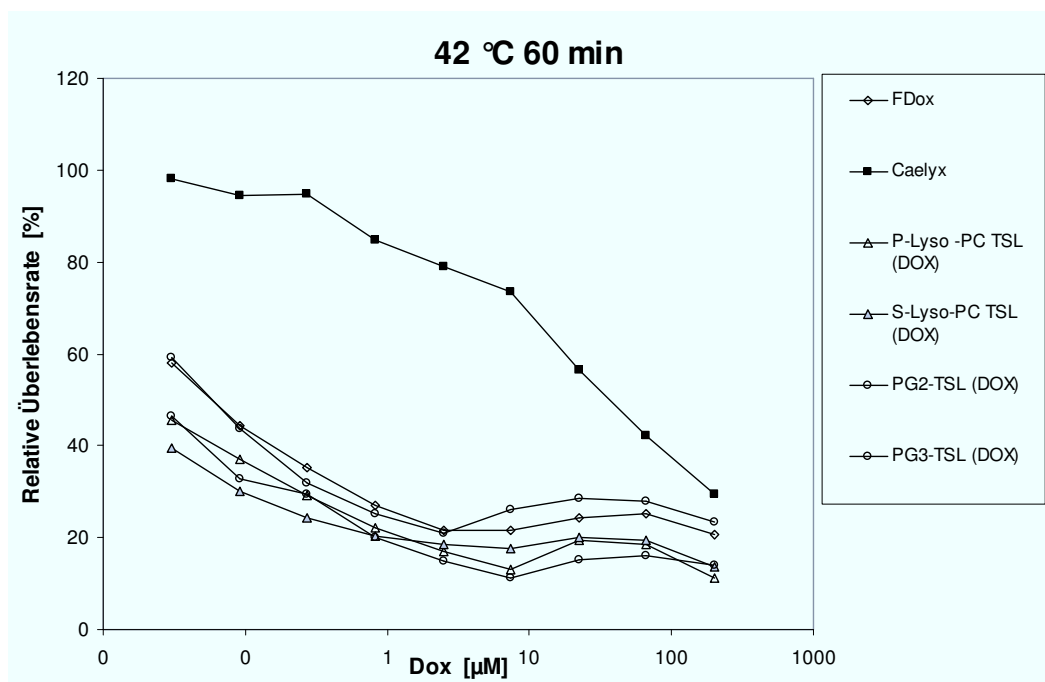


Abbildung 36 Dosis-Wirkungskurve nach 60 min Inkubation bei 42 °C

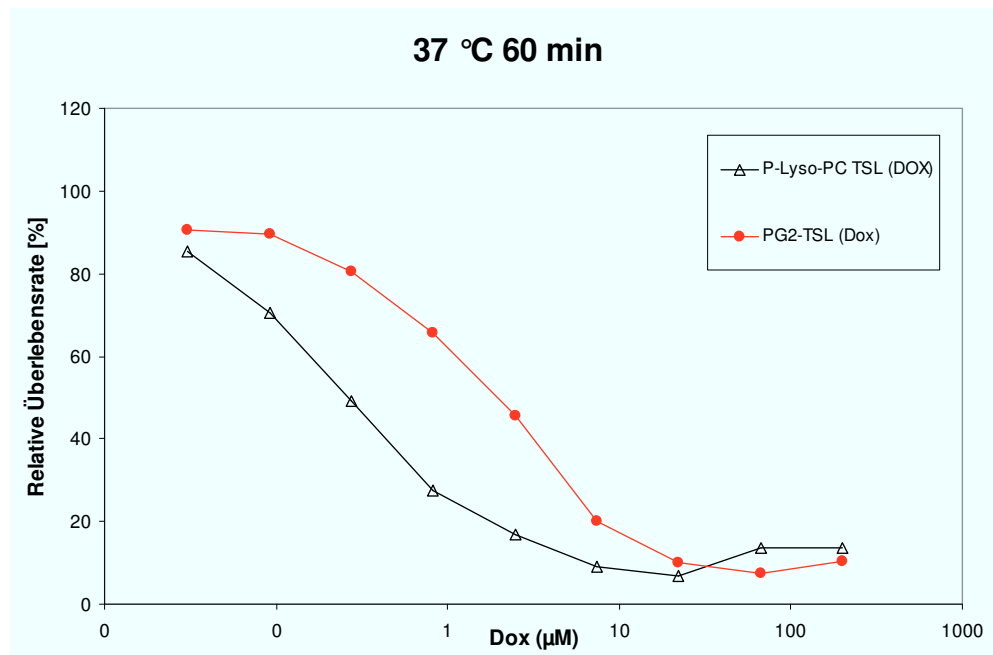


Abbildung 37 Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von P-Lyso-PC TSL (Dox) und PG₂-TSL (Dox); nach 60 min Inkubation bei 37 °C

	FDox	S-Lyso-PC TSL (Dox)	PG ₂ -Lyso-PC TSL(Dox)
15 min	51,4	48,4	83,2
60 min	36,8	36,4	65,7

Tabelle 32 Vergleich der relativen Überlebensrate [%]; nach 15 oder 60 min Inkubation mit 0,8 μM Dox bei 37 °C

		NTSL		TSL (Dox)			
Zeit [min]	T [°C]	FDox	Caelyx [®]	P-Lyso-PC	S-Lyso-PC	PG ₂	PG ₃
15	37	1,2	130,5	1	1,1	5	1,9
15	42	0,5	47	0,3	0,6	0,4	0,9
60	37	0,4	130,8	0,3	0,3	2,5	0,12
60	42	0,1	42	0,03	0,01	0,04	0,03

Tabelle 33 IC₅₀-Werte [μM]; nach Inkubation von BN175-Fibrosarkomzellen mit FDox, Caelyx[®] oder verschiedenen TSL (Dox)

5.3 Versuche in vivo

5.3.1 Akute und subakute Toxizität der TSL

Die Überprüfung der akuten und subakuten Toxizität nach systemischer Applikation der verwendeten TSL-Formulierungen (5 mg/kg Doxorubicin; Wirkstoff-Lipid Verhältnis 0,12-0,2) ergab keine Auffälligkeiten. Die Körperhaltung der Tiere war physiologisch und das Verhalten arttypisch. Krankheitssymptome traten nicht auf. Die Sektion ergab keine makroskopischen Organveränderungen, wie Organschwellungen, Abweichungen in Farbe und Konsistenz, Hämorrhagien oder Nekrosen.

Eine Charge der PG₃-TSL (Dox) führte nach systemischer Applikation über die V.penis bei zwei Ratten innerhalb von 10 min zum Tod. Diese Charge war jedoch ungewöhnlich viskös gegenüber anderen Chargen der gleichen Formulierungen. Die vorherige Charakterisierung ergab jedoch keine weiteren Auffälligkeiten gegenüber anderen Chargen der gleichen Formulierung. Die Tiere verstarben vermutlich an Herz-Kreislaufversagen. Die Sektion zeigte hochgradig hyperämisierte Lungen.

5.3.2 Tumorhistologie

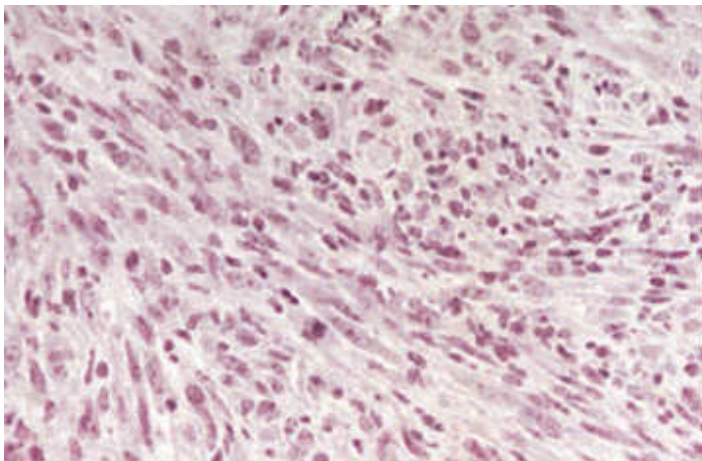


Abbildung 38 *Histologisches Präparat BFS-1 Tumor; He-Färbung (73); histologisch zeigt der Tumor eine gute Gefäßversorgung und ein hochproliferatives Wachstum, gekennzeichnet durch zahlreiche Mitosen, faszikulärem Muster sowie fokal infiltrativem Charakter ohne Nekrosenbildung.*

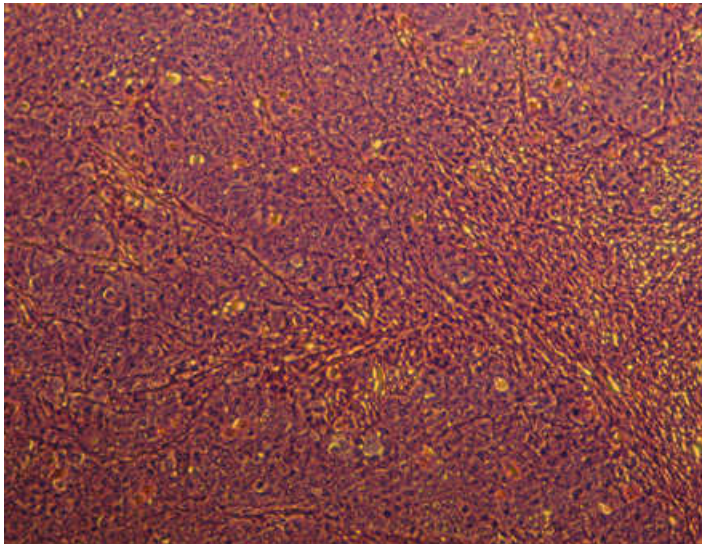


Abbildung 39 Histologisches Präparat FaDu-Tumor; He-Färbung ; die HE-Färbung des FaDu Tumors zeigte hochproliferative und niedrig differenzierte Zellen; keine nekrotischen Bereiche; mit Bindegewebssträngen durchsetzt.

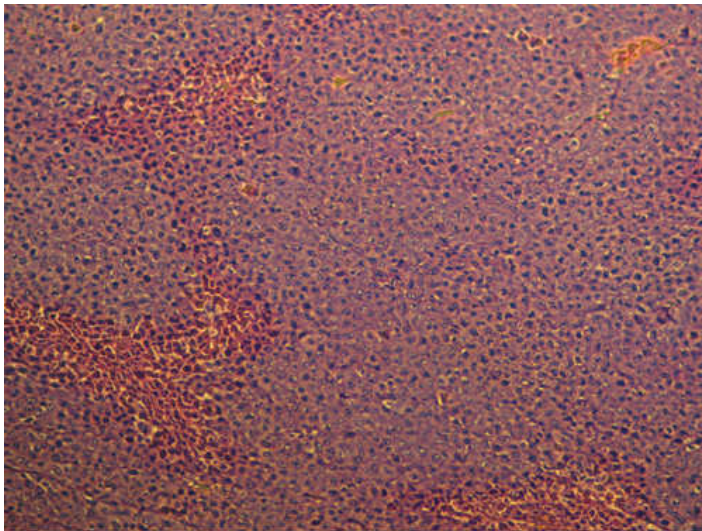


Abbildung 40 Histologisches Präparat BN175 -Tumor; He-Färbung ; der Tumor besteht aus niedrig differenzierten, monomorphen, hochproliferativen Zellen im flachen Zellverband; hyperchromatische Zellkerne; starke Vaskularisierung

5.3.3 Maus

5.3.3.1 Pharmakokinetik in der Maus

5.3.3.1.1 Plasma

Der Verlauf der Plasmakonzentrationskurven der TSL (Dox)-Formulierungen liegen zwischen der NTSL Formulierung Caelyx[®] und FDox. Nach Injektion von Caelyx[®] fällt die Anfangskonzentration von 156 μM innerhalb von 24 h auf 38 μM Dox im Plasma und bleibt anschließend in den nächsten 48 h konstant (nach 72 h 36,7 μM). Nach Injektion aller TSL (Dox) fällt die Dox-Konzentration innerhalb der ersten 24 h auf < 1 μM . Nach Injektion von FDox ist dieses schon nach 10 min der Fall.

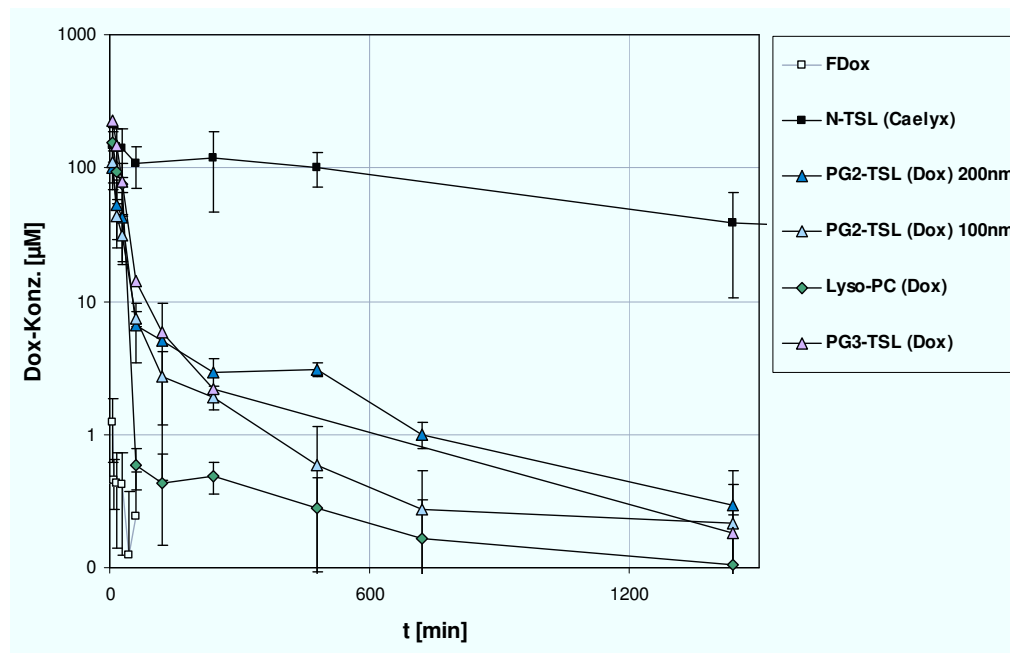


Abbildung 41 Dox-Plasmakonzentrationskurve bis 24 h nach Applikation ; Dosis: 5 mg /kg Dox; C57BL/6 Mäuse; n = 3

Die verschiedenen TSL-Formulierungen unterschieden sich in den Anfangskonzentrationen und den Dox-Konzentrationen bis zu 30 min nach Injektion voneinander. Die Anfangskonzentrationen (5 min nach Injektion) der TSL-Formulierungen waren sogar höher (PG₃-TSL (Dox) 225 µM; 100 nm PG₂-TSL (Dox) 224 µM) oder vergleichbar (200 nm PG₂-TSL (Dox) 100 µM; P-Lyso-PC TSL 132 µM) der von Caelyx[®] (149 µM). 5 min nach Applikation von PG₁-TSL (40 µM) war die Doxorubicin Plasmakonzentration jedoch signifikant geringer als bei Caelyx[®]. Die Dox-Konzentration sank bei Caelyx[®] jedoch in den ersten 60 min nur sehr langsam (auf 121 µM) während es innerhalb der ersten 60 min zu einem starken Abfall der Dox-Konzentration nach Applikation der TSL (Dox) im Plasma kam. Hieraus resultiert auch die 28 - 55-fach höhere AUC von Caelyx[®] (3702 h*µM) gegenüber allen TSL (Tabelle 34).

30 min nach Injektion von Caelyx[®] war die Dox-Konzentration fast doppelt (142 µM) so hoch wie nach Injektion von PG₃-TSL (78 µM) und 3-4-mal so hoch wie nach Injektion der PG₂-TSL (43 – 59,6 µM). PG₁-TSL und Lyso-PC TSL hatten nach 30 min die niedrigsten Plasma Dox-Konzentrationen von 16,3 bzw. 19,3 µM. Tabelle 34 die initiale Halbwertszeit $T_{1/2\alpha}$, $T_{1/2\beta}$ und die entsprechenden AUC's der Formulierungen. 60 min nach Applikation sind die Dox Plasmakonzentrationen bei 100 nm PG₂- (14 µM) oder PG₃-TSL (Dox) (28 µM) weniger stark abgefallen wie bei PG₁-TSL (Dox), 200 nm PG₂-TSL (Dox) und P-Lyso-PC TSL (6-7 µM).

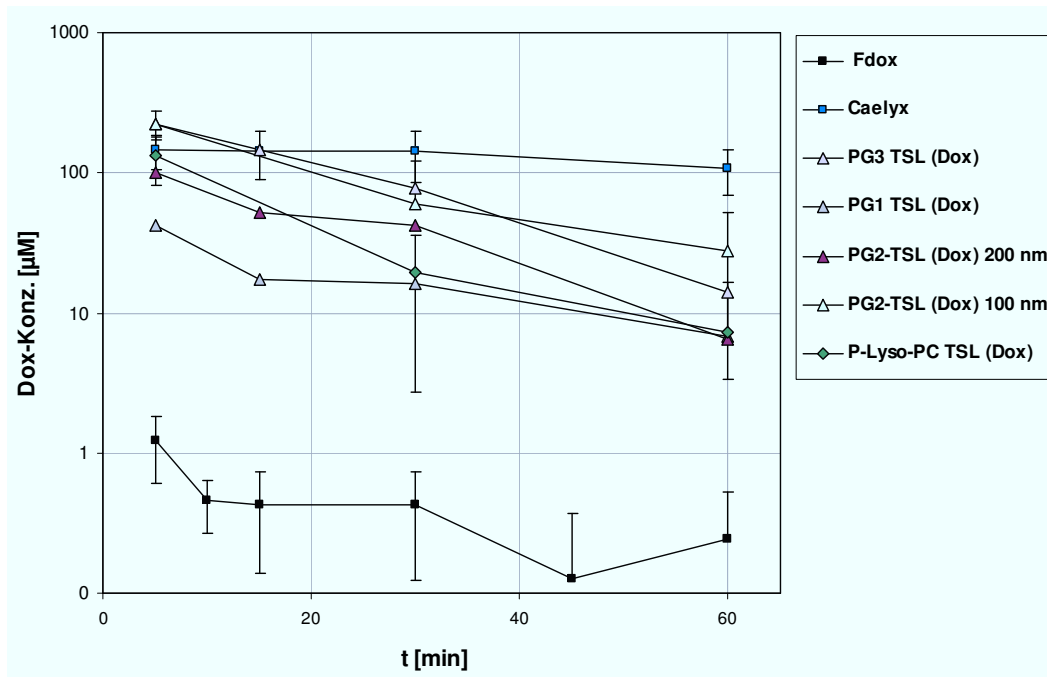


Abbildung 42 Dox-Plasmakonzentrationskurve bis 1 h nach Applikation; Dosis: 5 mg /kg Dox; C57BL/6 Mäuse; n = 3

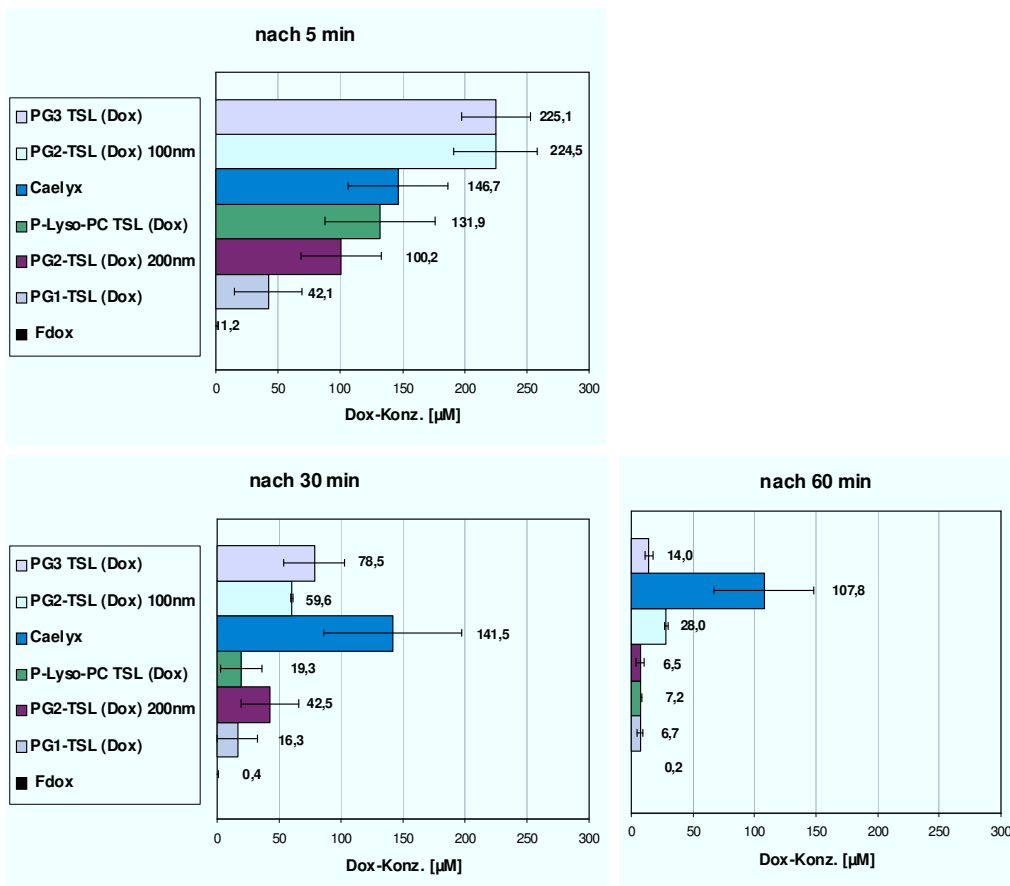


Abbildung 43 Vergleich der Dox-Konzentration im Plasma ; A 5 min, B 30 min und C 60 min nach Applikation; Dosis: 5 mg /kg; n = 3

Formulierung	$T_{1/2\alpha}$ (h)	$T_{1/2\beta}$ (h)	AUC (h* μ M)	C_0 (μ M)
PG ₁ -TSL (Dox)	0,03	0,82	31,4	236,7
PG ₂ -TSL (Dox) 100 nm	0,21	3,87	90,4	224,5
PG ₂ -TSL (Dox) 200 nm	0,23	4,85	86,8	127,3
PG ₃ -TSL (Dox)	0,23	4,37	131,6	271,1
Lyso-PC TSL	0,17	6,93	67,7	250,5
Caelyx [®]	0,24	11,58	3702	156,0
FDox	0,01	-	3,7	216,0

Tabelle 34 Halbwertszeit $T_{1/2\alpha}$ (h) + $T_{1/2\beta}$ (h), AUC (h* μ M) und C_0 (μ M) ; 5 mg/kg Dox in C57BL/6Maus; n=3

5.3.3.1.2 Organe

Herz

Während alle TSL (Dox) 0,5 h nach Applikation die höchsten Dox-Konzentrationen im Herz aufwiesen war dies nach Applikation von Caelyx[®] erst nach 8 h (der $9,2 \pm 0,3$ ng/mg) der Fall.

Die Applikation verschiedener TSL (Dox) führte nach 0,5 h zu keinen signifikanten Unterschieden in den Dox-Konzentrationen im Herz (zwischen 6,7 und 9,1 ng/mg Dox). Eine Ausnahme ist PG₃-TSL (Dox) ($4,2 \pm 0,5$ ng/mg Dox), welches zu vergleichbaren Dox-Konzentrationen wie Caelyx[®] ($5,0 \pm 0,6$ ng/mg) führte. Nach Applikation von FDox war nach 0,5 h die höchste Dox-Konzentration im Herz ($10,8 \pm 3,0$ ng/mg). Die Dox-Konzentration im Herz fiel bei allen TSL (Dox) nach 4 h auf etwa 5 ng/mg [$4,4 \pm 1,3$ ng/mg (PG₃-TSL); $5,6 \pm 0,5$ PG₁-TSL; $5,8 \pm 0,9$ ng/mg (PG₂-TSL 100 nm); $5,0 \pm 1,2$ ng/mg (PG₂-TSL 200 nm) $6,0 \pm 1,3$ ng/mg (Lyso-PC TSL)].

Auch 24 h nach Applikation sank die Dox-Konzentration im Herz weiter und war bei allen TSL (Dox) mit 1,2 – 2,0 ng/mg Dox im vergleichbaren Bereich, der sich auch von Caelyx[®] $1,3 \pm 0,5$ ng/mg nicht unterschied.

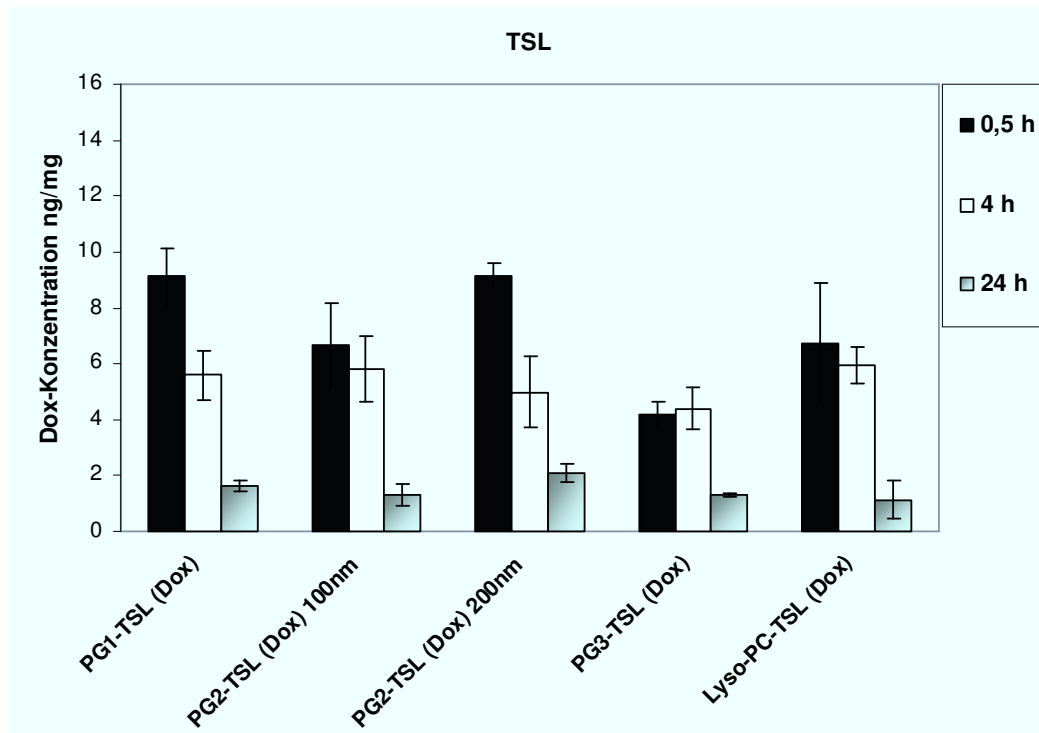


Abbildung 44 Dox-Konzentrationen im Herz ; Dosis: 5 mg/kg Dox; n = 3

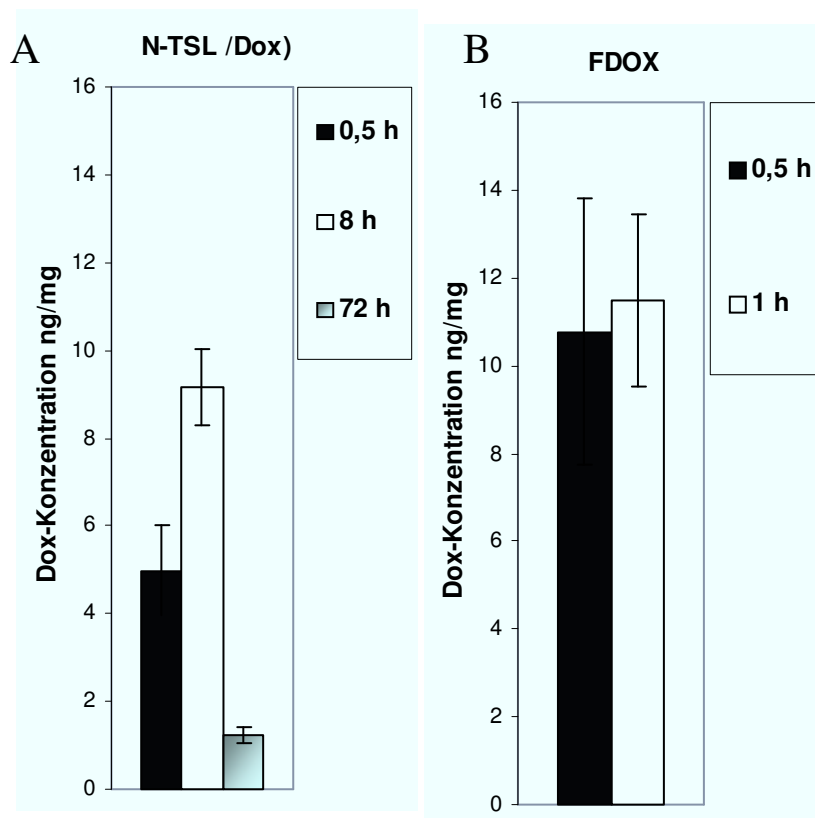


Abbildung 45 Dox-Konzentrationen im Herz nach Applikation von Caelyx[®] (A) oder FDOx (B); Dosis: 5 mg/kg Dox; n = 3

Leber

Die höchsten Dox-Konzentrationen in der Leber wurden 4 h nach Applikation der TSL (Dox) gemessen und sind etwa vergleichbar mit Dox-Konzentrationen 0,5 h nach Applikation. PG₃-TSL (Dox) führten zu den höchsten Dox-Konzentrationen (53,0 ± 9,9 ng/mg nach 0,5 h und 60,8 ± 4,8 ng/mg nach 4 h). Nach Applikation anderer PG-TSL wurden niedrigere Dox-Konzentrationen gemessen, die sich untereinander jedoch nicht signifikant voneinander unterschieden. (PG₁-TSL 20,2 ± 9,2 ng/mg nach 0,5 h und 24,1 ± 4,9 ng/mg nach 4 h; PG₂-TSL 100nm 24,8 ± 4,0 ng/mg nach 0,5 h und 34,5 ± 6,9 ng/mg nach 4 h). Lyso-PC TSL führten von allen TSL-Formulierungen dagegen zu den niedrigsten Dox-Konzentrationen in der Leber (14,4 ± 2,3 ng/mg nach 0,5 h und 21,3 ± 2,4 ng/mg nach 4h) und sind mit den Werten von FDox vergleichbar (13,7 ± 7,6 ng/mg nach 0,5 h und 18,7 ± 8,1 ng/mg nach 1h). 24 h nach Applikation von PG-TSL war die Dox-Konzentrationen in der Leber mit 7,0 – 8,9 ng/mg höher als nach Applikation von FDox (2,3 ± 0,9 ng/mg) oder Lyso-PC TSL (Dox) (2,8 ± 0,3 ng/mg).

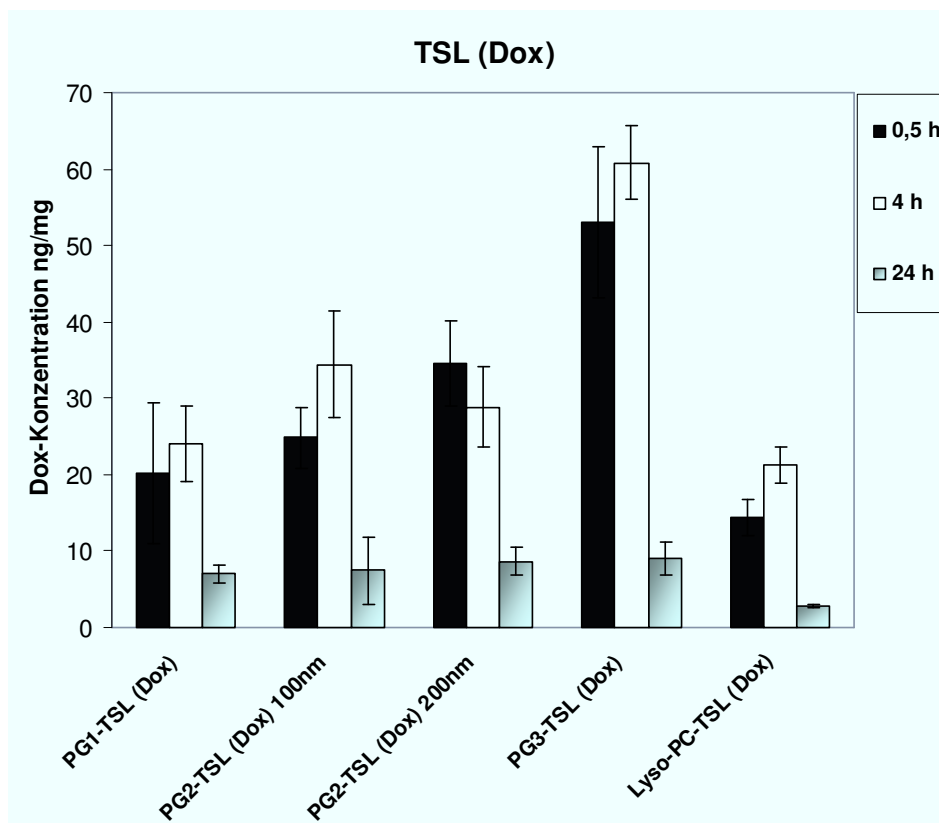


Abbildung 46 Dox-Konzentrationen in der Leber nach Applikation von verschiedenen TSL (Dox); Dosis: 5 mg/kg Dox; n = 3

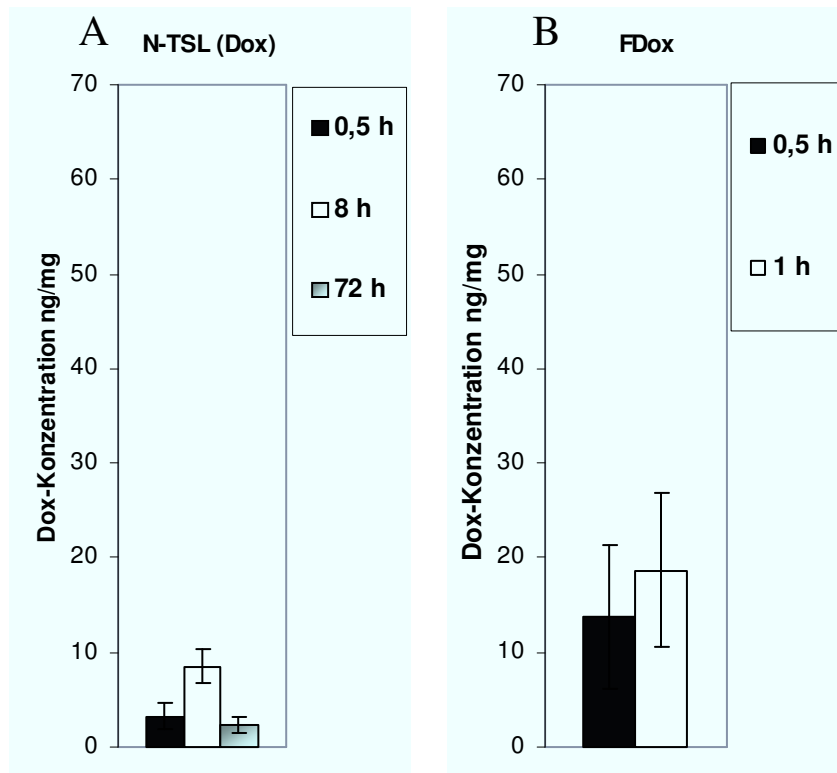


Abbildung 47 Dox-Konzentrationen in der Leber nach Applikation von Caelyx[®] (A) oder FDox (B) ; Dosis: 5 mg/kg Dox; n = 3

Milz

Wie in der Leber sanken die Dox-Konzentrationen 4 h nach Applikation gegenüber den Dox-Konzentrationen 0,5 h nach Applikation nicht. PG₁- und PG₂-TSL (Dox) führten zu den höchsten Dox-Konzentrationen in der Milz (PG₁-TSL 24,7 ± 7,9 ng/mg nach 0,5 h und 10,1 ± 1,1 ng/mg nach 4h; PG₂-TSL 28,7 ± 4,0 ng/mg nach 0,5 h und 29,6 ± 7,2 ng/mg nach 4 h). Ausnahme ist PG₃-TSL, nach dessen Applikation nach 0,5 h die Dox-Konzentrationen niedriger waren, als nach Applikation der anderen PG-TSL (18,9 ± 3,0 ng/mg nach 0,5 h und 15,7 ± 2,4 ng/mg nach 4 h) und vergleichbar sind mit Lyso-PC TSL (18,8 ± 3,6 ng/mg nach 0,5 h und 14,8 ± 7,4 ng/mg nach 4 h). FDox war 0,5 h nach Applikation nur zu 8,8 ± 3,5 ng/mg nachweisbar. Nach Applikation von Caelyx[®] wurden über einen Zeitraum von 72 h Dox-Konzentrationen gemessen, die < 20 ng/mg blieben.

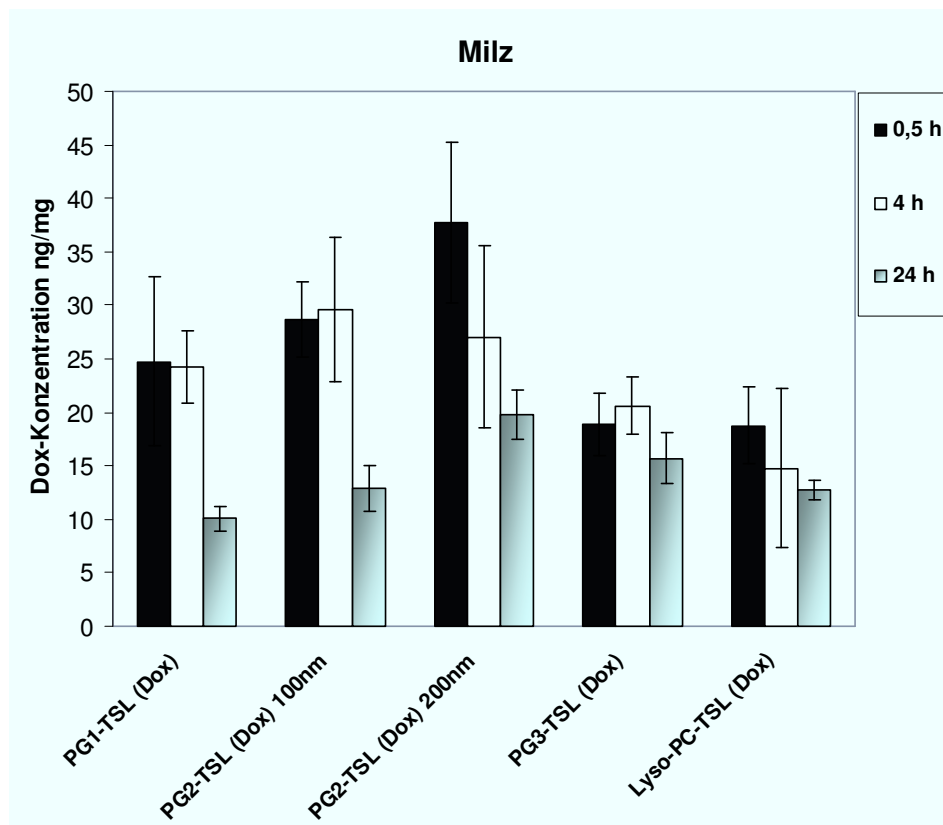


Abbildung 48 Dox-Konzentrationen in der Milz, nach Applikation von verschiedenen TSL (Dox); Dosis: 5 mg/kg Dox; $n = 3$

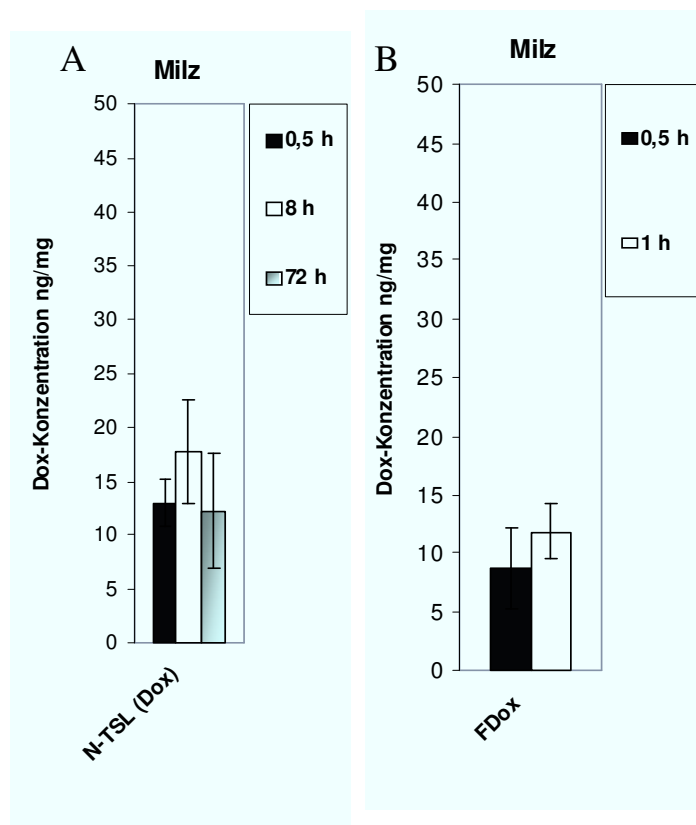


Abbildung 49 Dox-Konzentrationen in der Milz; nach Applikation von Caelyx[®] (A) oder FDox (B); Dosis: 5 mg/kg Dox; $n = 3$

5.3.3.2 Doxorubicinanreicherung und Organverteilung nach HT

Tumoren

Alle TSL- Formulierungen führten zu einer Anreicherung von Dox im hyperthermierten im Vergleich zum nicht hyperthermierten Tumorgewebe des gleichen Tieres. Die Anreicherung war für alle PG-TSL (Dox) etwa 5-fach, während P-Lyso-PC TSL (Dox) zu einer 13-fachen Anreicherung führte. Caelyx[®] führte zu einer 1,4-fachen Anreicherung und FDox zu einer 2-fachen Anreicherung von Dox im hyperthermierten Gewebe.

Nach Applikation von P-Lyso-PC TSL (Dox) wurden im hyperthermierten Tumor Dox-Konzentrationen von $32,0 \pm 7,0$ ng/mg Dox erreicht, nach Applikation von PG-TSL (Dox) war dies etwa die Hälfte (13,0 – 14,5 ng/mg Dox). In allen nicht hyperthermierten Tumoren wurden niedrige Dox-Konzentrationen zwischen 1,5 und 3,0 ng/mg Dox gemessen.

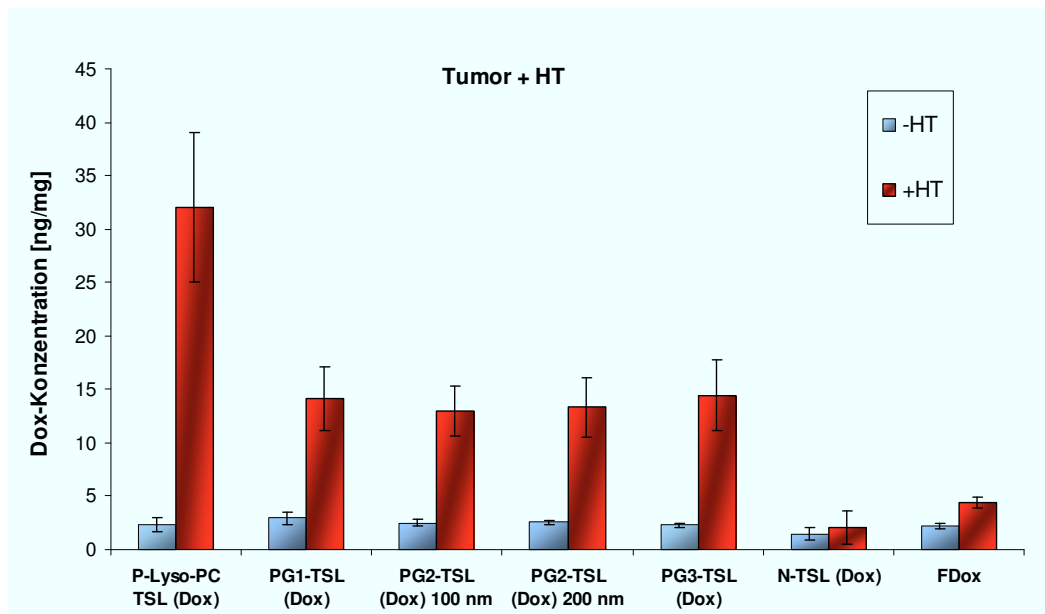


Abbildung 50 Dox-Konzentrationen im hyperthermierten und nicht hyperthermierten Tumor ; nach Applikation von FDox, Caelyx[®] und verschiedenen TSL (Dox) + 1 h HT; Dosis 5 mg/kg Dox; n = 3

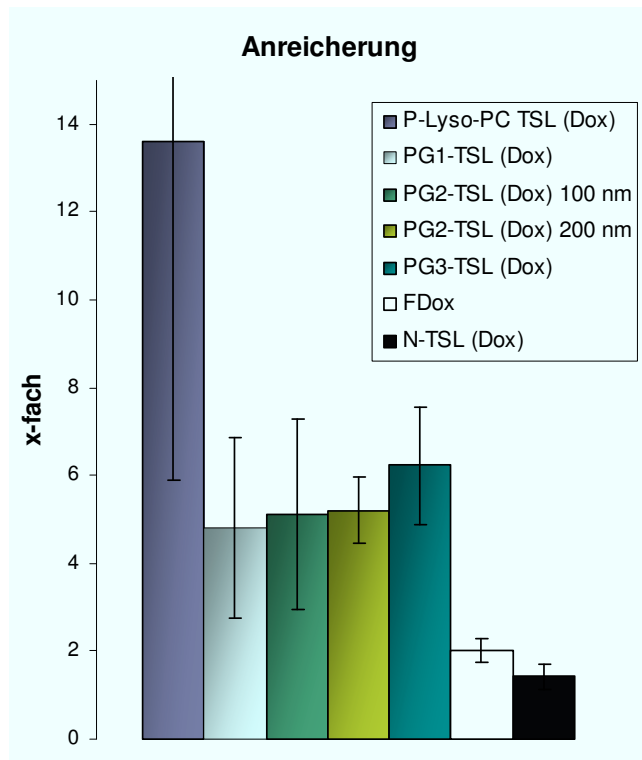


Abbildung 51 Anreicherungsfaktor von Dox im hyperthermierten (1h) im Vergleich zum nicht hyperthermierten Tumorgewebe; Dosis 5 mg/kg Dox; n = 3

Herz, Leber, Milz

Im Herz war nur die Dox-Konzentration nach Applikation von Caelyx[®] ($2,0 \pm 0,3$ ng/mg) signifikant geringer als nach Applikation von FDox ($10,8 \pm 0,6$ ng/mg). Alle TSL (Dox) führten zu Dox-Konzentrationen im Herz, die vergleichbar mit der von FDox waren. In Milz und Leber wurde eine erhöhte Akkumulierung von Dox nach Applikation von PG-TSL (Dox) im Vergleich zu FDox, Caelyx[®] und P-Lyso-PC TSL (Dox) gemessen. In der Leber wurden die höchsten Dox-Konzentrationen gemessen. Alle PG-TSL führten 1 h nach Applikation zu Dox-Konzentrationen, die > 30 ng/mg lagen (PG₁-TSL $30,1 \pm 6,0$ ng/mg, PG₂-TSL 100 nm $34,68 \pm 14,6$ ng/mg, PG₃-TSL $37,16 \pm 11,48$ ng/mg und PG₂-TSL 200 nm $40,5 \pm 5,2$ ng/mg). Im Vergleich dazu waren die Dox-Konzentrationen nach Applikation von FDox ($17,8 \pm 8,7$ ng/mg), P-Lyso-PC TSL (Dox) ($15,2 \pm 9,1$ ng/mg) nur etwa halb so hoch. Die Applikation von Caelyx[®] führte zu den niedrigsten Dox-Konzentrationen in der Leber ($6,5 \pm 2,2$ ng/mg). Nach Applikation von P-Lyso-PC TSL ($17,0 \pm 2,4$ ng/mg) und FDox ($15,3 \pm 2,7$ ng/mg) wurden in der Milz Dox-Konzentrationen gemessen, die mit denen in der Leber vergleichbar sind. PG-TSL (Dox) führten mit Ausnahme von PG₃-TSL ($17,8 \pm 5,0$ ng/mg) zu höheren Dox-Konzentrationen als FDox und P-Lyso-PC TSL, die jedoch niedriger waren als in der Leber (PG₁-TSL $24,1 \pm 5,3$ ng/mg, PG₂-TSL 100 nm $26,0 \pm 12,7$ ng/mg, und PG₂-TSL

200 nm $23,8 \pm 3,1$ ng/mg). Außerdem führte die Applikation von Caelyx® zu vergleichbaren Dox-Konzentrationen ($16,2 \pm 3,2$ ng/mg) in der Milz wie FDox und P-Lyso-PC TSL.

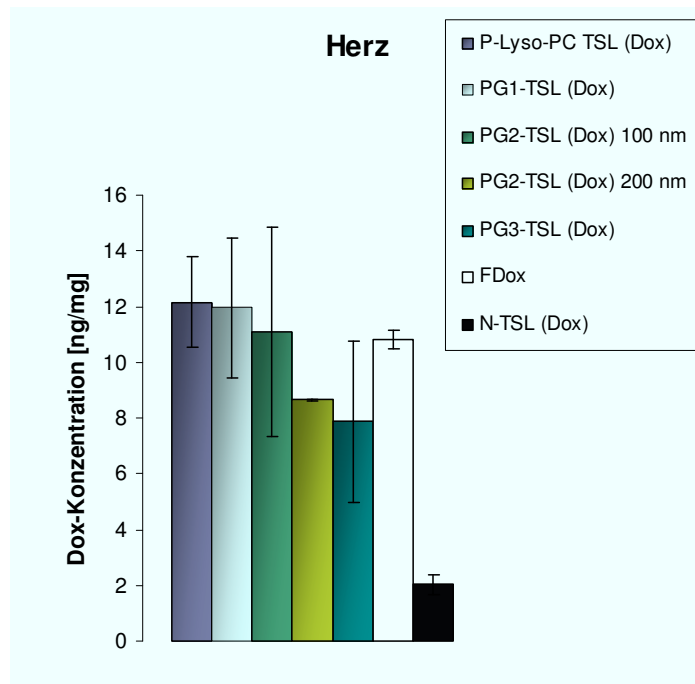


Abbildung 52 Dox-Konzentrationen im Herz nach Applikation von verschiedenen TSL (Dox) und Behandlung mit HT (1h); Dosis: 5mg/kg Dox; n = 3

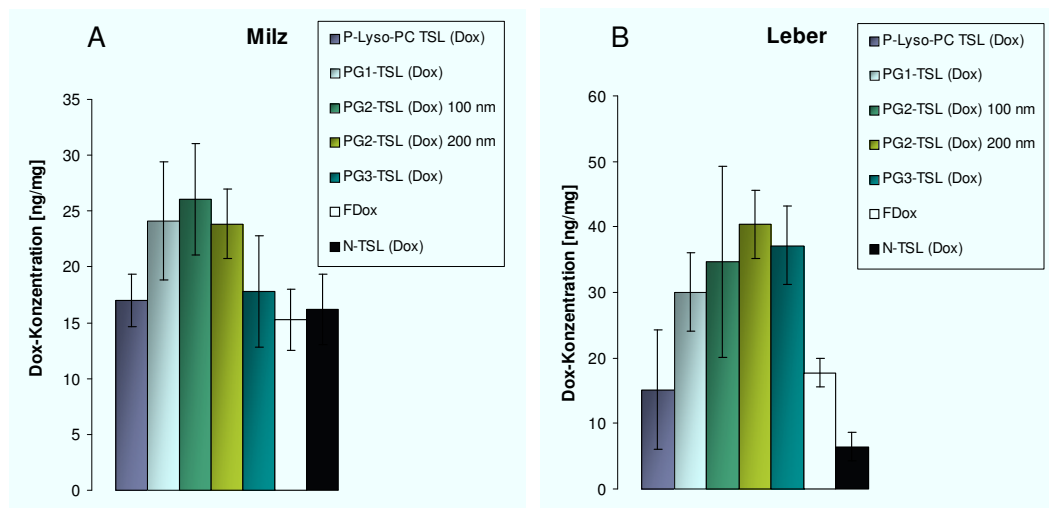
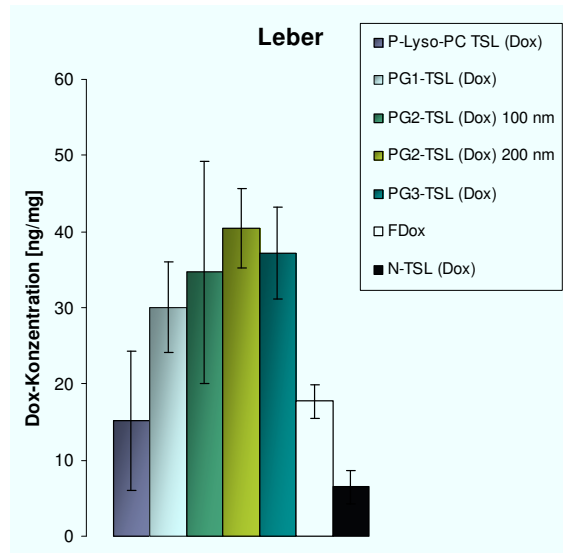


Abbildung 53 Dox-Konzentrationen in Milz (A) und Leber (B); nach Applikation verschiedener TSL (Dox) und Behandlung mit HT (1h); Dosis: 5mg/kg Dox; n = 3



5.3.3.3 Therapeutische Studie im syngenem Tumormodell

Da die PK-Studie keinen Unterschied in den Halbwertszeiten von 100 oder 200 nm TSL (Dox) gezeigt hatte, wurde in der therapeutischen Studie auf eine Unterscheidung verzichtet und nur PG₂-TSL (Dox) mit einer Größe von 100 nm verwendet. Die einmalige Applikation von FDox zeigte im BFS-1 Tumor keinen therapeutischen Effekt. Ebenso führte die Behandlung mit PG₁-TSL (Dox) zu keiner signifikanten Wachstumsverzögerung der Tumoren. Alle anderen TSL (Dox) Formulierungen erzielten dagegen eine Wachstumsverzögerung. Während nach Behandlung mit FDox die Mäuse durchschnittlich am Tag 11 nach Behandlung euthanasiert werden mussten, war dies nach Behandlung mit PG₂-TSL (Dox) erst nach Tag 18 und nach PG₃-TSL (Dox) Tag 21. (1 Tumorregressionen). Lyso-PC TSL zeigten mit 4 Tumorregressionen die höchste therapeutische Effizienz und die deutlichste Tumorwachstumsverzögerung (Euthanasie durchschnittlich an Tag 25). Nach der Therapie nahmen die Mäuse in den ersten 2-3 Tagen um durchschnittlich 1-2 g ab. Anschließend legten die Tiere wieder an Gewicht zu. Fünf von 10 Tieren, die mit Lyso-PC TSL (Dox) behandelt worden waren, zeigten ab Tag 3-4 ödematisierte und gerötete Gliedmaßen. Ein Tier musste aufgrund einsetzender Gewebenekrosen trotz Wachstumsverzögerung bereits an Tag 12 euthanasiert werden. Bei den anderen Tieren kam es in den folgenden Tagen zur Anschwellung.



Abbildung 54 Linke Hintergliedmaße: 3 Tage nach Behandlung mit Lyso-PC TSL (Dox); die mit HT behandelte Hintergliedmaße ist ödematisiert und gerötet; rechts: Hintergliedmaße einer unbehandelte Maus zum Vergleich

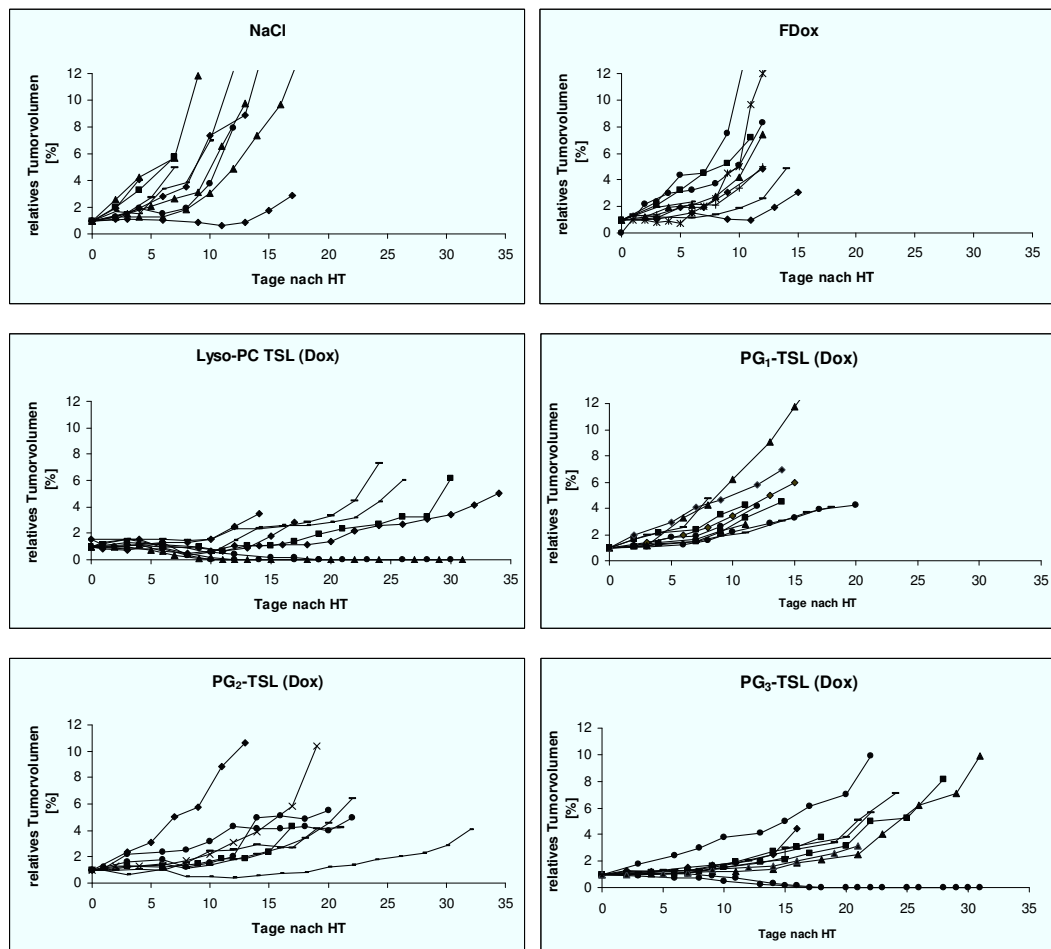


Abbildung 55 Tumorwachstumsstudie syngener *BFS-1* Tumor ; s.c. in der C57BL/6 Maus; Tag 0 = Tag der Behandlung in Kombination mit regionaler HT für 60 min; Dosis: 5 mg/kg, n = 10 pro Formulierung

5.3.3.4 Therapeutische Studie im xenogenen Tumormodell

Insgesamt war die therapeutische Effizienz von Dox beim xenogenen FaDu-Tumor in der Maus höher als im syngenen Tumormodell. Alle TSL (Dox) führten zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung gegenüber FDox. Tiere in der Kontrollgruppe (NaCl +HT) wurden durchschnittlich an Tag 11 nach Behandlung euthanasiert. Die Behandlung mit P-Lyso-PC TSL (Dox) in Kombination mit regionaler HT des Tumors führte zu vier Tumorregressionen und bei 5 Tieren zu einer Wachstumsverzögerung bis Tag 25. PG₂- und PG₃-TSL (Dox) führten beide zu jeweils 3 Regressionen, je ein Tumor sprach nicht auf die Behandlung an. Bei vier der Tumoren kam es zu einer Wachstumsverzögerung.

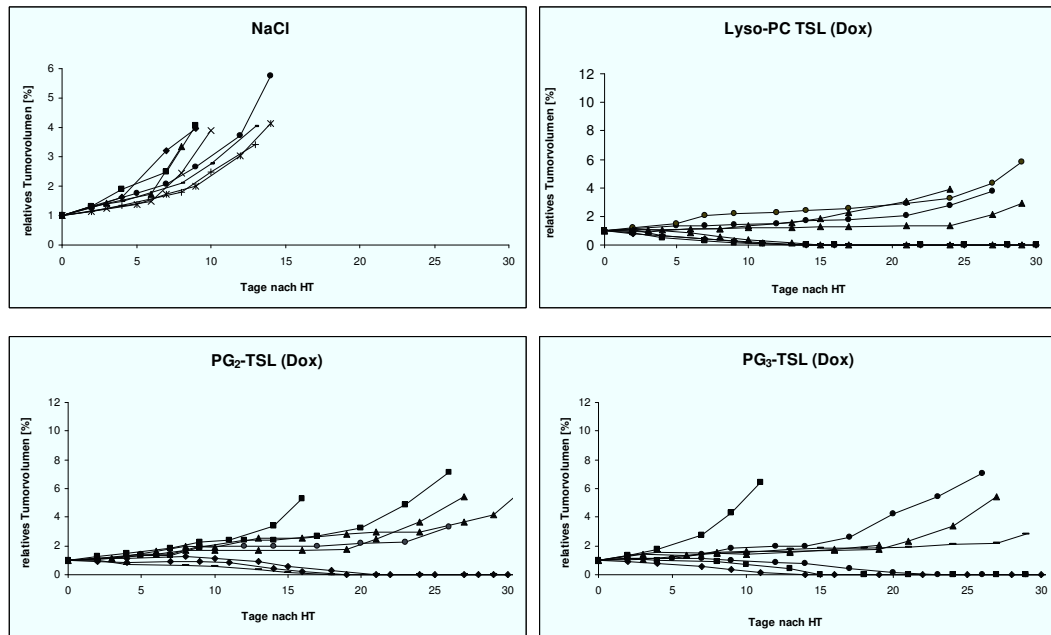


Abbildung 56 Tumorwachstumsstudie xenogener FaDu Tumor ; s.c. in der NMRI nu/nu Maus; Tag 0 = Tag der Behandlung in Kombination mit regionaler HT für 60 min; Dosis: 5 mg/kg; n = 8 pro Formulierung

5.3.4 Ratte

5.3.4.1 Pharmakokinetik in der Ratte

Die PK der TSL (Dox) und Caelyx[®] in der Ratte wurde unter lokaler HT (Wasserbad 42 °C) und dazu im Vergleich ohne HT (Wasserbad 38 °C) durchgeführt. Der Anteil der erwärmten Körpermasse (Gliedmaße) betrug durchschnittlich etwa 4,5 % des Gesamtgewichts (Abbildung 57).

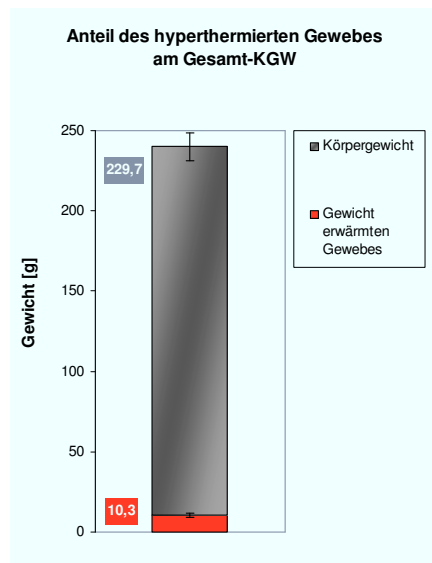


Abbildung 57 Pharmakokinetik Ratte; Anteil des hyperthermierten Gewebes am Gesamtgewicht des Versuchstieres; n = 3 pro Formulierung; Dosis: 5mg/kg Dox

	NTSL (Caelyx [®])	PG ₂ -TSL (Dox)	PG ₃ -TSL (Dox)	P-Lyso-PC TSL (Dox)
38°C	7851	8821	9297	487
42°C	-	5455	7110	365

Tabelle 35 $AUC_{0-60min}$ (ng*min/μl); n = 3

	NTSL (Caelyx [®])	PG ₂ -TSL (Dox)	PG ₃ -TSL (Dox)	P-Lyso-PC TSL (Dox)
38°C	343,8	118,3	110,9	4,5
42°C	-	28,7	41,8	4

Tabelle 36 $T_{1/2}$ (min) nach linearer Regression

38 °C Wasserbad

Die Dox Plasmakonzentration nach Applikation von Caelyx[®] blieb über einen Zeitraum von 60 min konstant. 2 min nach Applikation war die Dox-Konzentration im Plasma 138 ng/ μl, nach 5 min 143 ng/ μl, nach 30 min 139 ng/ μl und nach 60 min 130 ng/ μl. Die HWZ von Caelyx[®] betrug nach linearer Regression 343,8 min, die $AUC_{0-60min}$ 7851 ng*min/μl. Nach Applikation von TSL (Dox) kam es bei allen Formulierungen innerhalb von 60 min zu einem Abfall der Dox-Konzentration im Plasma. Die Anfangskonzentration (2 min nach Applikation) von PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox) war jedoch mit 171 und 177 ng/ μl höher als die der NTSL (Dox). Wie bei Caelyx[®] stieg diese zunächst nach 5 min an (195 bzw. 182 ng/ μl). Die Dox-Konzentration im Plasma fiel anschließend linear ab und betrug nach 60 min noch 137 (PG₂-TSL (Dox)) bzw. 143 ng/ μl (PG₃-TSL (Dox)). Die $AUC_{0-60min}$ der PG-TSL (Dox) war mit 8821 ng*min/μl (PG₂-TSL (Dox)) bzw. 9298 ng*min/μl (PG₃-TSL (Dox)) höher als die $AUC_{0-60min}$ von Caelyx[®]. 2 min nach Applikation von Lyso-PC TSL (Dox) betrug die Dox-Konzentration im Plasma 92 ng/ μl und fiel bereits nach 5 min auf 37 ng/ μl, nach 10 min auf 10 ng/ μl. Bereits nach 30 min blieb die Dox-Konzentration < 1 ng/ μl. Die $AUC_{0-60min}$ war mit 487 ng*min/μl von allen TSL (Dox) am niedrigsten.

42 °C Wasserbad

Wurde eine Hintergliedmaße im Wasserbad (42 °C) hyperthermiert veränderte sich die PK von Dox nach Applikation der TSL (Dox). Die Anfangskonzentration war bei beiden

PG-TSL (Dox) vergleichbar mit der entsprechenden Anfangskonzentration bei 38 °C Wasserbadtemperatur. Die Dox-Konzentration im Plasma nahm jedoch kontinuierlich bis auf 21 ng/ μl (PG₂-TSL (Dox)) bzw. 57 ng/ μl (PG₃-TSL (Dox)) nach 60 min HT ab. Die HWZ $T_{1/2}$ reduzierte sich von 118,3 min auf 28,7 min (PG₂-TSL (Dox)) bzw. von 110,9 min auf 41,8 min (PG₃-TSL (Dox)). Die Dox-Konzentration 2 min nach Applikation von P-Lyso-PC TSL (Dox) + regionaler HT bei 42 °C war gegenüber der Dox-Konzentration bei einer Wasserbadtemperatur von 38° etwa um die Hälfte (50 ng/ μl) reduziert. Bereits 10 min nach Applikation waren nur noch 5 ng/ μl Dox im Plasma nachweisbar, nach 60 min 2,3 ng/ μl . Die HWZ reduzierte sich von 4,5 min auf 4 min, die $\text{AUC}_{0-60\text{min}}$ von 487 auf 365 ng*min/ μl bei Behandlung mit regionaler HT.

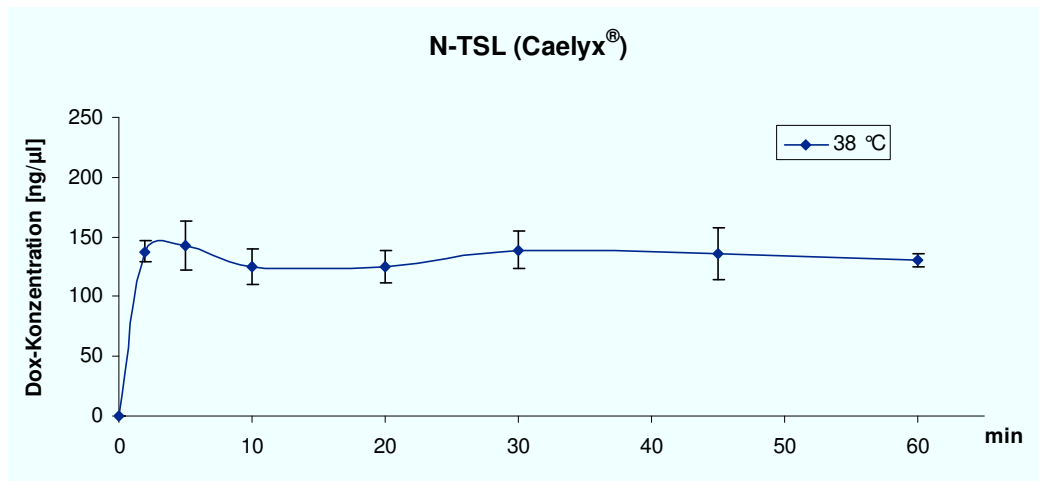


Abbildung 58 PK Caelyx®; bei 38 °C; Dosis: 5mg/kg; n = 3

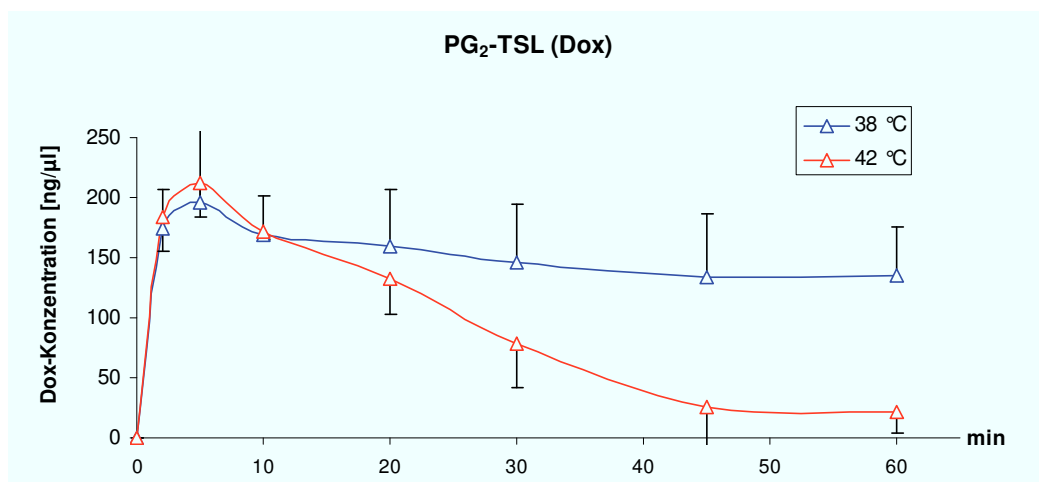


Abbildung 59 PK PG₂-TSL (Dox); bei 38 °C (blau) und 42 °C (rot); Dosis: 5mg/kg; n=3

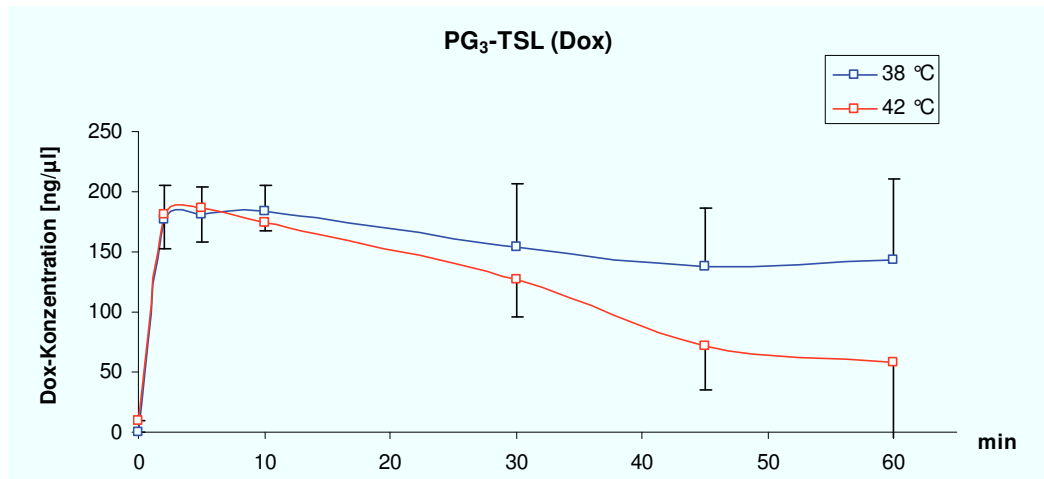


Abbildung 60 PK PG₃-TSL (Dox); bei 38 °C (blau) und 42 °C (rot); Dosis: 5mg/kg; n=3

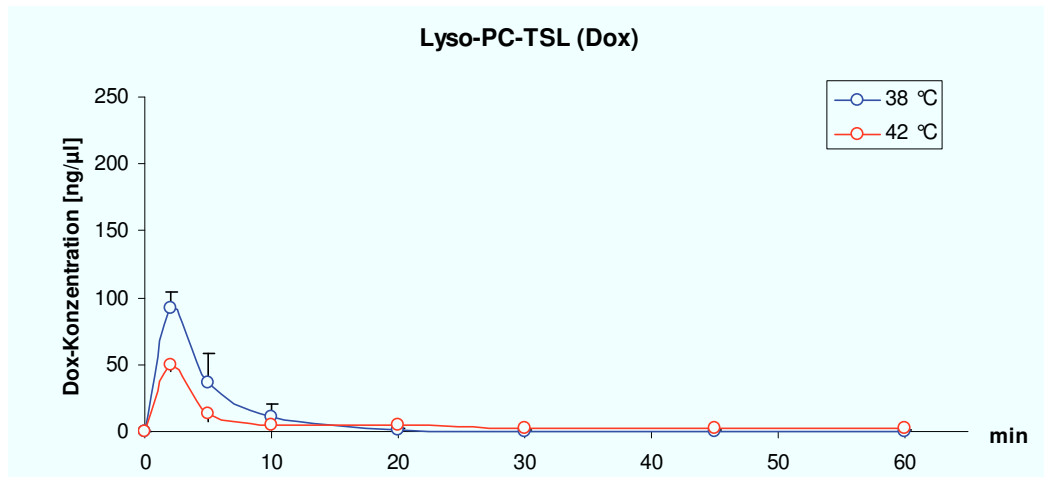


Abbildung 61 PK Lyso-PC TSL (Dox); bei 38 °C (blau) und 42 °C (rot); Dosis: 5mg/kg; n=3

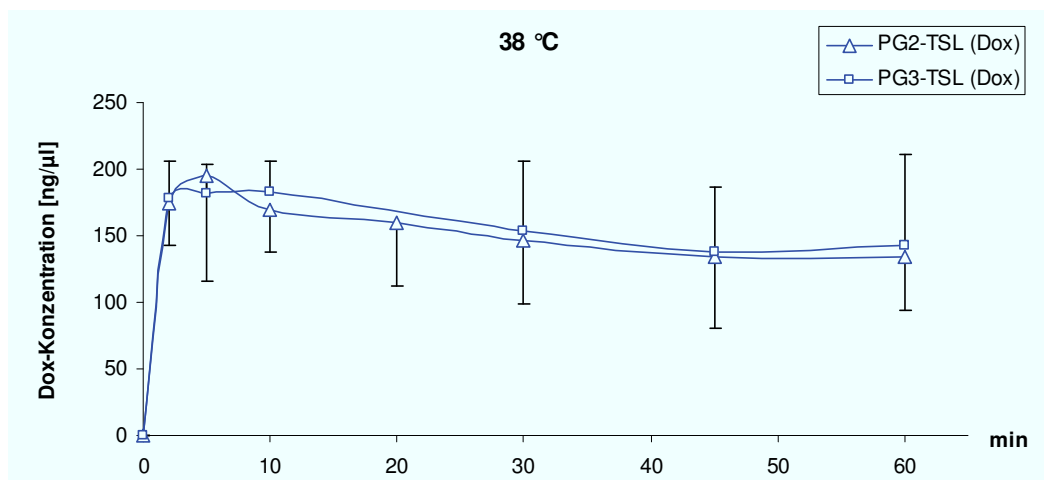


Abbildung 62 Vergleich PK PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) bei 38 °C

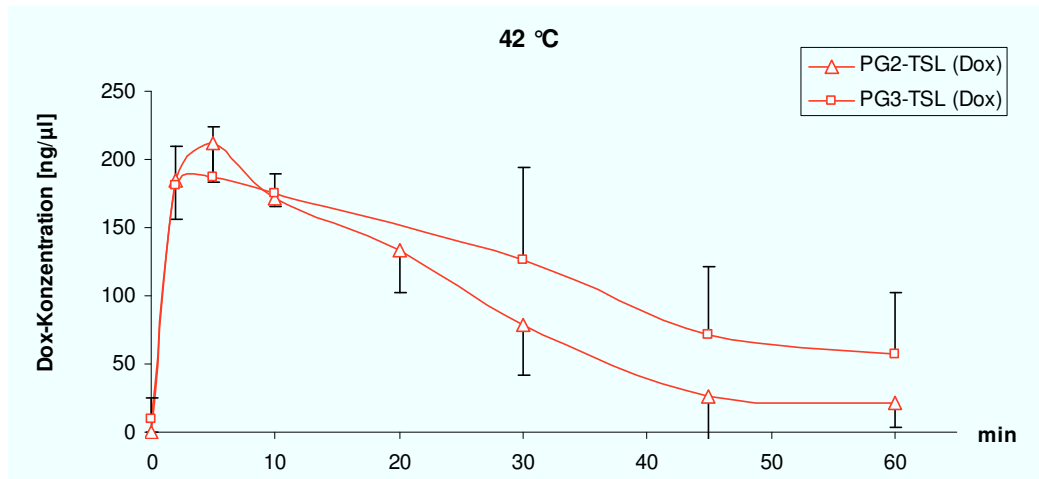


Abbildung 63 Vergleich PK PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) bei 42 °C

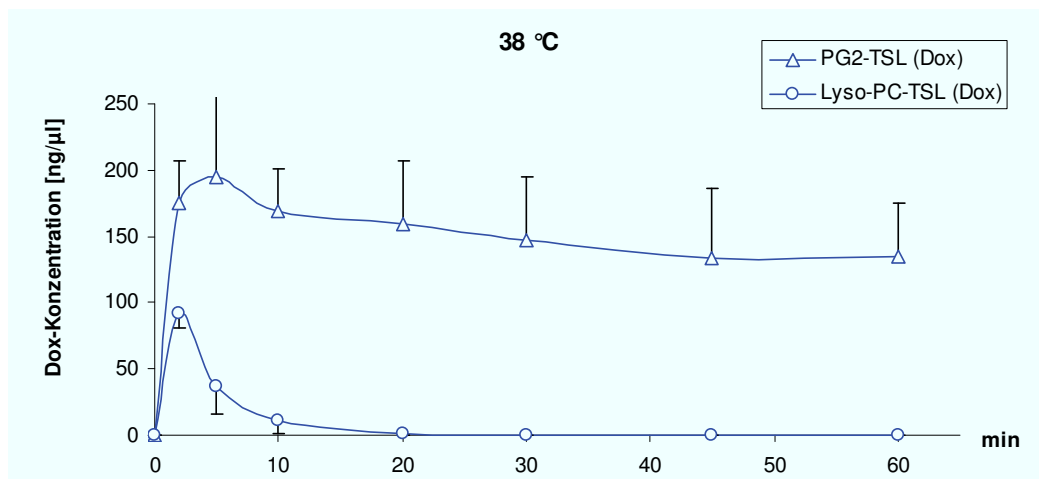


Abbildung 64 Vergleich PK PG₂-TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) bei 38 °C

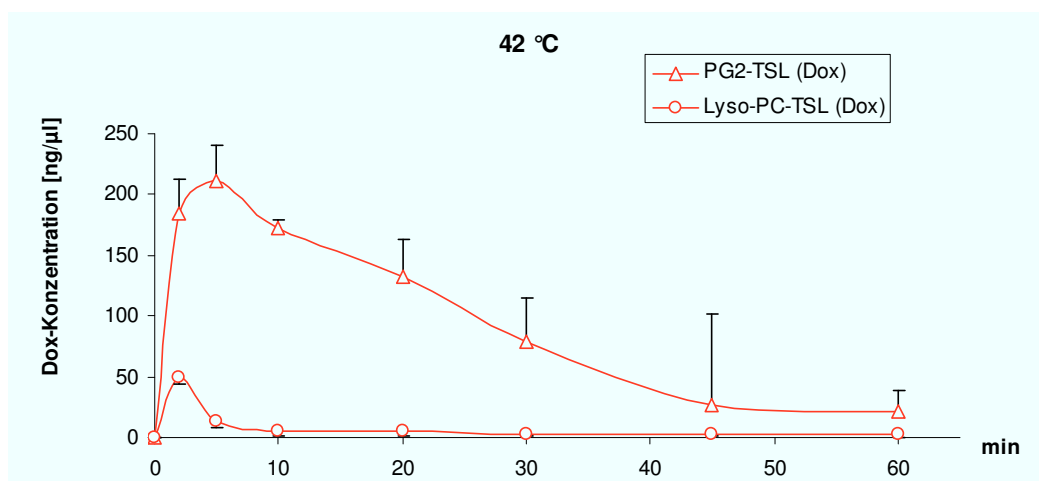


Abbildung 65 Vergleich PK PG₂-TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) bei 42 °C

5.3.4.2 Doxorubicinanreicherung und Organverteilung nach HT

Tumoren

In allen hyperthermierten Tumoren wurden höhere Dox-Konzentrationen gemessen als in den nicht hyperthermierten Tumoren gleicher Tiere. Eine Ausnahme sind Tumoren der Tiere, die mit Caelyx[®] behandelt und direkt im Anschluss an die Behandlung entnommen wurden. In diesem Fall waren die Dox-Konzentrationen im hyperthermierten Tumor mit $3,63 \pm 1,69$ ng/mg gering und vergleichbar zu dazugehörigen nicht hyperthermierten Tumoren ($2,93 \pm 0,33$ ng/mg). Wurden die Tiere erst 24 h nach Caelyx[®] + HT-Behandlung zur Gewebeentnahme euthanasiert wurden die insgesamt höchsten Dox-Konzentrationen in hyperthermierten Tumoren ($41,14 \pm 11,05$ ng/mg) gemessen. Auch in den nicht hyperthermierten Tumoren dieser Tiere waren sehr hohe Dox-Konzentrationen ($30,17 \pm 7,44$ ng/mg), so dass sich nur eine 1,4-fache Anreicherung von Dox im hyperthermierten im Vergleich zum nicht hyperthermierten Gewebe ergibt. Unter den TSL erzielten die PG-TSL höhere Dox-Konzentrationen in hyperthermierten Tumorgeweben (PG₂-TSL $33,29 \pm 15,64$ bzw. PG₃-TSL $25,28 \pm 4,21$ ng/mg) als Lyso-PC TSL ($9,93 \pm 1,6$ ng/mg Dox). Da die Dox-Konzentrationen nicht hyperthermierter Tumoren aller TSL behandelten Tiere niedrig waren (PG₂-TSL $2,15 \pm 0,44$ PG₃-TSL, $1,53 \pm 0,24$ Lyso-PC TSL, $2,38 \pm 1,82$ ng/mg) war die Dox Anreicherung durch PG₂-TSL mit Faktor 15,5, und PG₃-TSL 16,5 ebenfalls höher als bei Lyso-PC TSL (Dox) mit Faktor 4,2. Wurden die Tiere mit FDox behandelt, waren die Dox-Konzentrationen in hyperthermierten Tumoren ($8,00 \pm 1,63$ ng/mg) etwa doppelt (Faktor 2,3) so hoch wie in nicht hyperthermierten Tumoren ($3,51 \pm 0,45$ ng/mg).

Im Vergleich mit TSL waren die Dox-Konzentrationen im Tumorgewebe, welches mit HT behandelt wurde damit signifikant geringer.

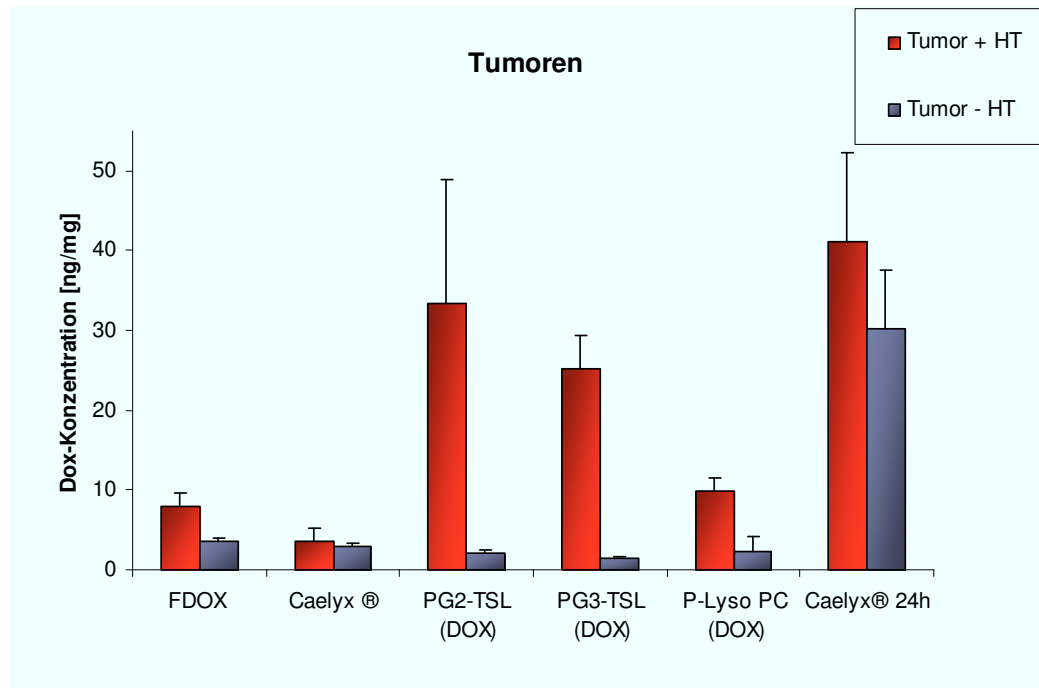


Abbildung 66 Anreicherung von Dox im hyperthermierten Tumorgewebe (rote Säulen) im Vergleich zu nicht hyperthermierten Tumorgewebe (blaue Säulen) 60 min nach Applikation; n = 3; Dosis: 5 mg/ kg Dox

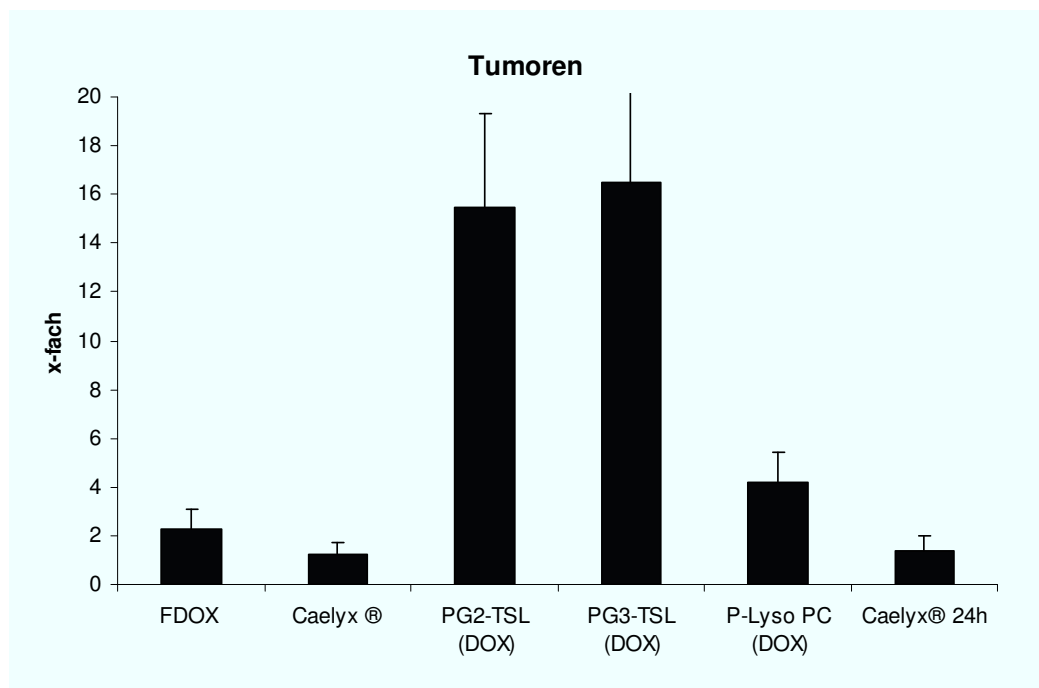


Abbildung 67 Anreicherungsfaktor ; Dox-Konzentration des hyperthermierten im Gegensatz zum nicht hyperthermierten Tumorgewebe des gleichen Tieres

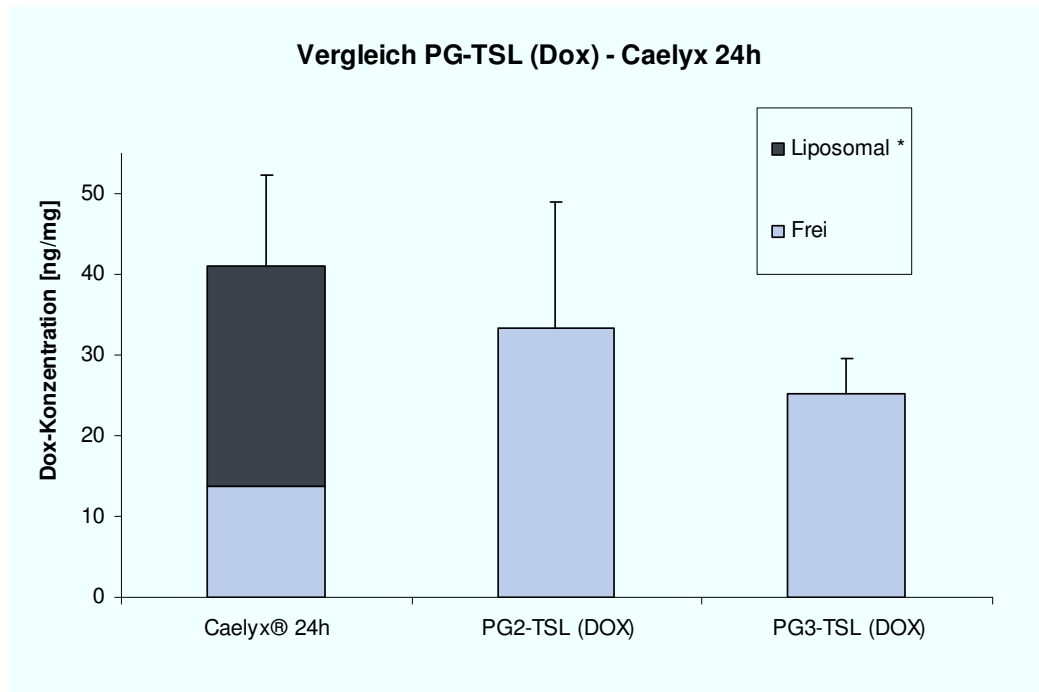


Abbildung 68 Theoretischer Anteil FDox (grau) und liposomales Dox (schwarz) am Gesamt-Dox im Tumorgewebe ; nach(74): nach 24h = 1/3 des Gesamt-Dox liegt bioverfügbar vor, 2/3 sind liposomal

Organe

Die höchsten Dox-Konzentrationen wurden in Milz ($39,03 \pm 3,51$ ng/mg), Leber ($30,45 \pm 5,74$ ng/mg) sowie Herz ($15,43 \pm 1,01$ ng/mg) gemessen, sehr viel niedrigere dagegen in der Muskulatur ($1,93 \pm 0,21$ ng/mg). Die Gewebeverteilung von Dox nach Lyso-PC TSL (Dox) Behandlung ist der von FDox vergleichbar.

Nach Behandlung mit PG-TSL verändert sich dagegen die PK des Wirkstoffs. In Milz (PG₂-TSL $30,78 \pm 2,34$; PG₃-TSL $26,14 \pm 3,72$), Leber (PG₂-TSL $18,43 \pm 4,12$; PG₃-TSL $19,06 \pm 4,63$) und Herz (PG₂-TSL $9,78 \pm 1,26$; PG₃-TSL $9,51 \pm 1,82$) wurden geringere Dox Konzentrationen gemessen als nach Behandlung mit FDox. Zwischen PG₂-TSL und PG₃-TSL sind keine signifikanten Unterschiede in der Organverteilung zu sehen.

Nach Behandlung mit Caelyx® weisen alle Organe eine geringere Dox-Konzentration auf als nach Behandlung mit FDox oder den TSL-Formulierungen. In der Milz werden die höchsten Dox-Konzentrationen ($17,52 \pm 2,14$ ng/mg) gemessen, in allen anderen Organen sind die Konzentrationen unter 5 ng/mg. Werden die Dox-Konzentrationen der Organe erst 24h nach Behandlungsende ermittelt ergibt sich in der Milz eine 4-fache Steigerung der Dox-Konzentration auf 71 ng/mg. Ebenfalls gestiegen (3-fach) ist die Dox-Konzentration in der Leber von $2,54 \pm 1,33$ ng/mg auf $7,01 \pm 0,42$ ng/mg. In Muskulatur und Herz sind die Dox-Konzentrationen dagegen nicht signifikant verändert.

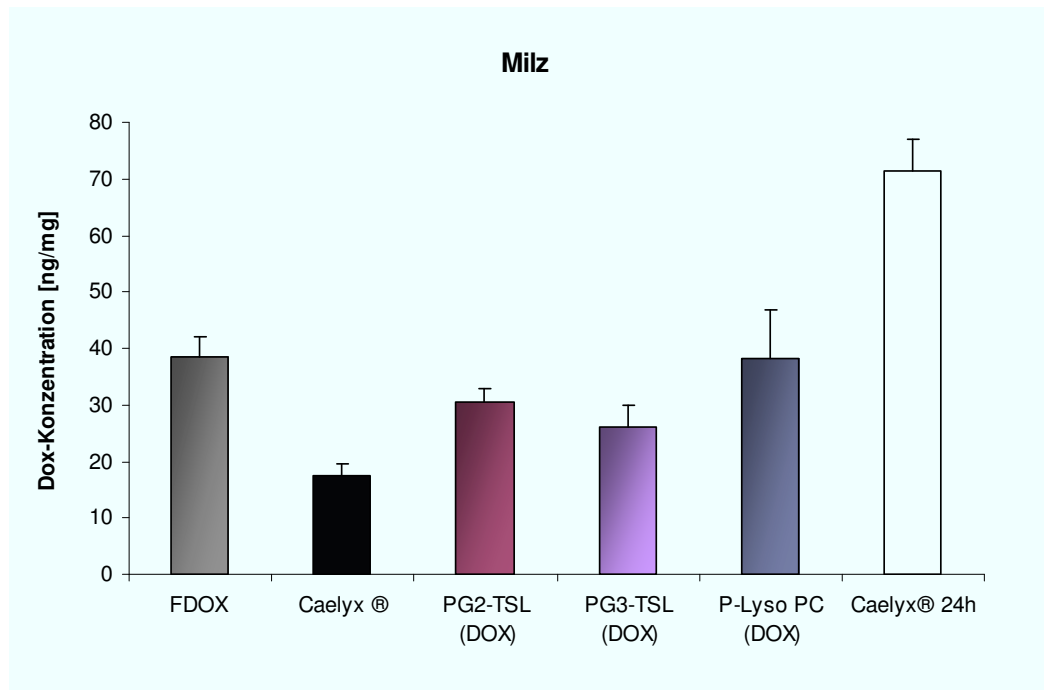


Abbildung 69 Dox-Konzentrationen in der Milz nach 60 min HT; HT mittels Wasserbad 42 °C; Dosis: 5 mg/kg Dox; n= 3

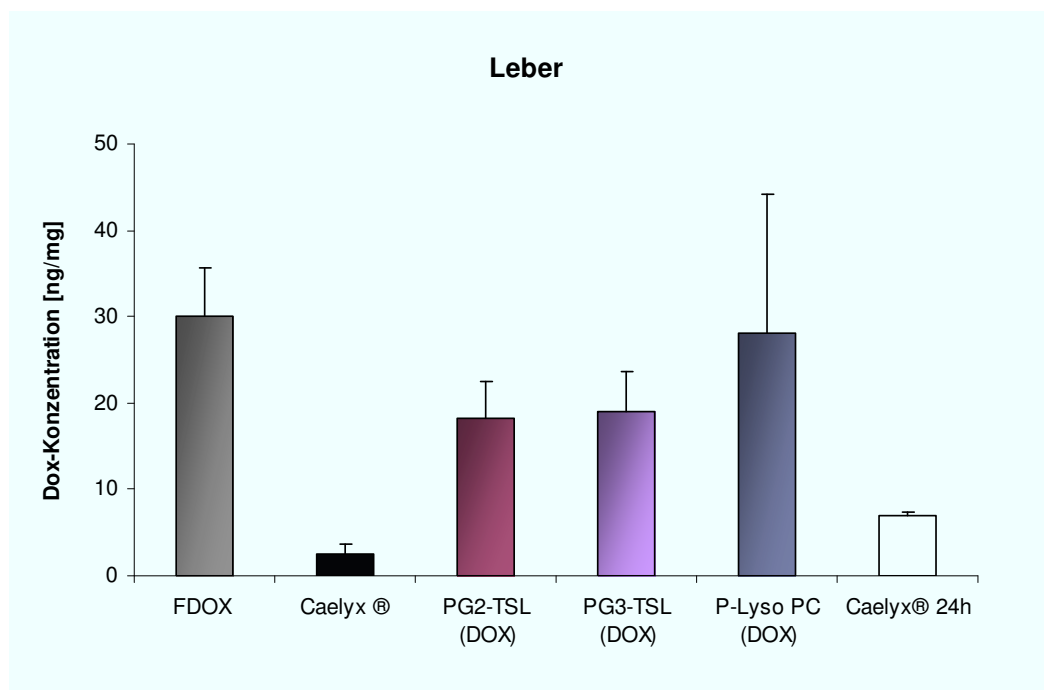


Abbildung 70 Dox-Konzentrationen in der Leber nach 60 min HT; Wasserbad 42°C; Dosis: 5 mg/kg Dox; n= 3

Muskulatur

1 h und 24 h nach Applikation von Caelyx® sind die Dox-Konzentrationen sowohl in der hyperthermierten als auch in der nicht hyperthermierten Muskulatur niedrig (< 2 ng /mg).

Dox-Konzentrationen der nicht hyperthermierten Gliedmaßenmuskulatur waren nach Applikation verschiedener TSL (Dox) und FDox vergleichbar ($< 2,5$ ng /mg) und ebenfalls niedrig. In der hyperthermierte Gliedmaße wurde nach Behandlung mit FDox, wie im Tumor, die ca. doppelte so hohe Dox-Konzentration ($3,9 \pm 0,5$ ng/mg) wie im nicht hyperthermierten Gewebe ($1,9 \pm 0,2$ ng/mg) gemessen. In der hyperthermierten Muskulatur von Tieren, die mit einer der TSL (Dox)-Formulierungen behandelt wurden, waren die Dox-Konzentrationen 7-9-fach zur entsprechenden nicht hyperthermierten Muskulatur erhöht (hohe Standartabweichungen).

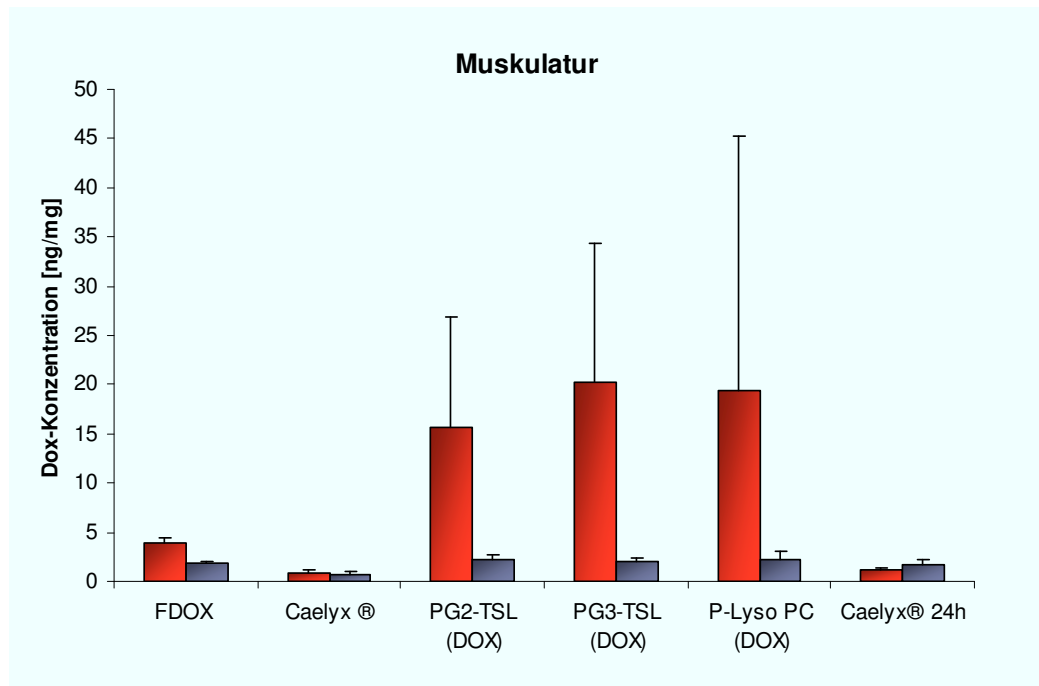


Abbildung 71 Dox-Konzentrationen in der Gliedmaßenmuskulatur; blau: nicht hyperthermierte Gliedmaße; rot hyperthermierte Gliedmaße; nach 60 min HT (Wasserbad 42 °C); Dosis: 5 mg/kg Dox; n= 3

Herz

FDox und Lyso-PC TSL (Dox) führten zu den höchsten Dox-Konzentrationen im Herz. Nach Behandlung mit PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox) ergab sich eine durchschnittliche Senkung der Dox-Konzentration im Herzen um 37 % bzw. 38 % gegenüber FDOx. Die Behandlung mit Caelyx® führte sowohl sofort als auch nach 24 Stunden zu den niedrigsten Dox-Konzentrationen im Herz (Senkung von 72 bzw. 75 % gegenüber FDOx).

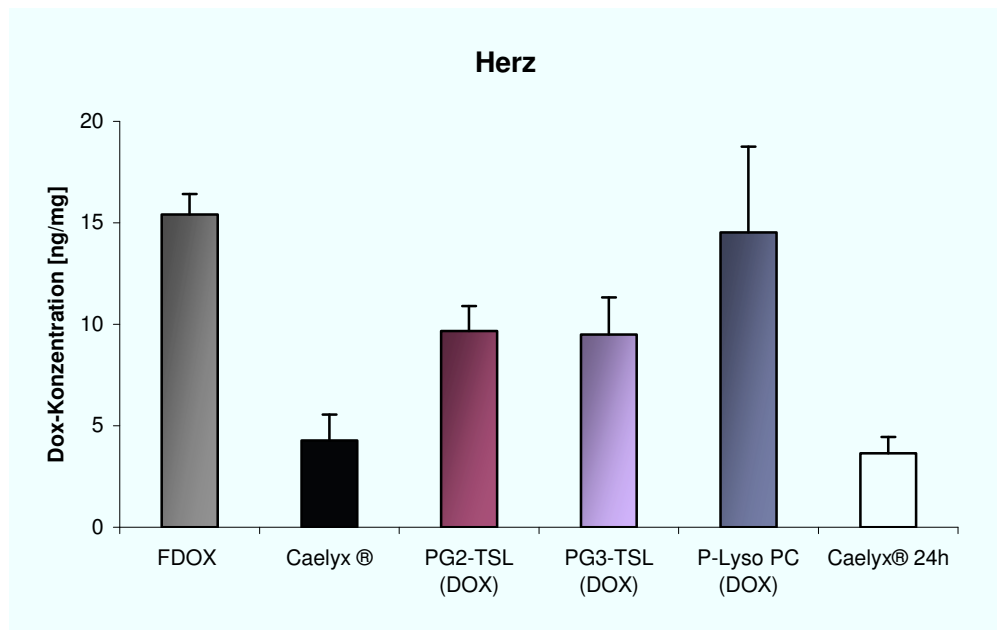


Abbildung 72 Dox-Konzentrationen im Herz nach 60 min HT ; HT mit Wasserbad 42 °C); Dosis: 5 mg/kg Dox; n= 3

Plasma

Eine Stunde nach Applikation von FDox war nur noch $0,35 \pm 0,05 \mu\text{g}$ Dox/ml Plasma nachweisbar. Die lang zirkulierende, nicht thermosensitive Formulierung Caelyx® führte, zum gleichen Zeitpunkt gemessen, zu $153 \pm 24 \mu\text{g}$ Dox / ml Plasma, welches nach 24 h auf $106 \pm 8,1 \mu\text{g}$ Dox/ ml Plasma abfiel. Alle TSL Formulierungen lagen zwischen den Werten von FDox und Caelyx®. Bei PG₂- und PG₃-TSL verblieben nach 1 h HT noch etwa $20 \pm 6,9 \mu\text{g}$ Dox pro ml Plasma, bei Lyso-PC TSL (Dox) noch mal etwas weniger als die Hälfte hiervon. Die C₀ (Anfangs-Dox-Konzentration) betrug (abgeschätzt für eine 230 g Ratte; Blutvolumen 6,4 % des KGW; HTK 46 %; Dosis: 5 mg/kg) etwa $170 \mu\text{g}$ Dox/ ml Plasma. Nach 1 h HT des Tumors waren nur noch 12 % (PG₂- und PG₃-TSL (Dox)) bzw. 5 % (Lyso-PC TSL (Dox)) des Gesamt-Dox im Blut nachweisbar. Von den nicht thermosensitiven Liposomen (Caelyx®) zirkulierten 1 h nach Applikation noch 90 % im Plasma, 24 h nach Applikation sind es 62 %.

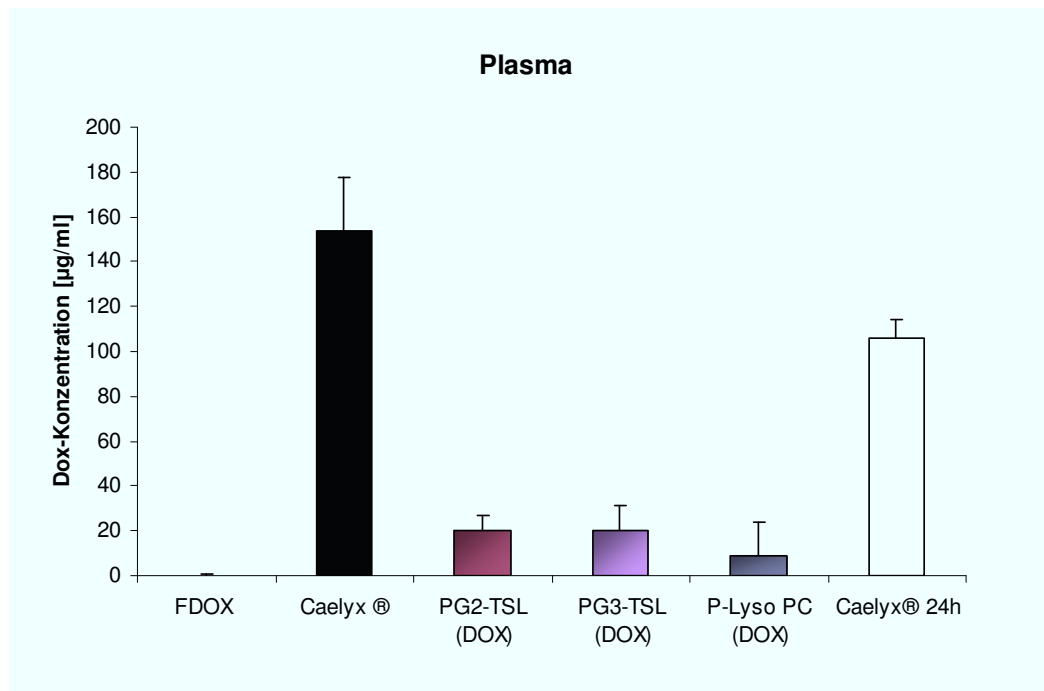
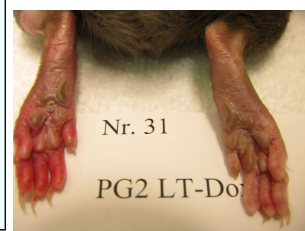
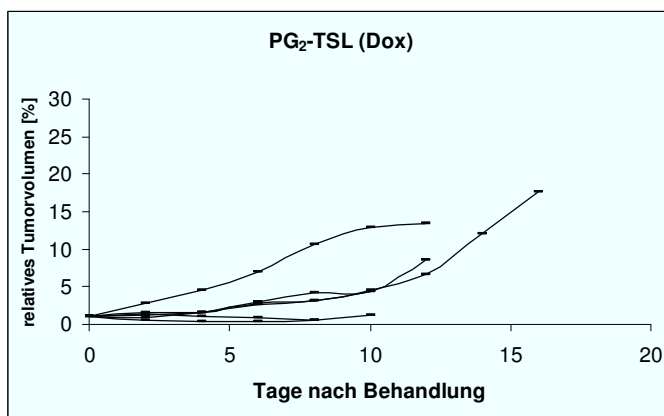
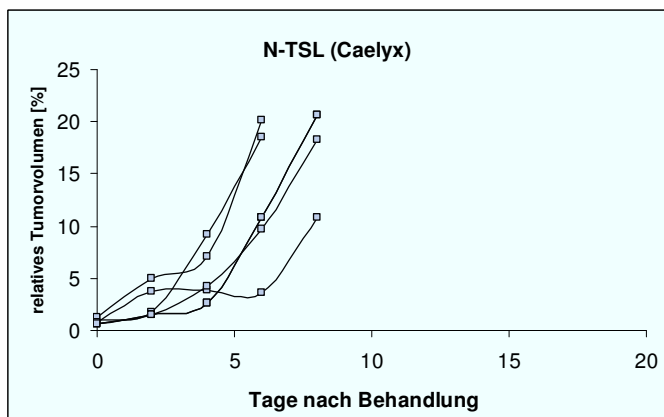
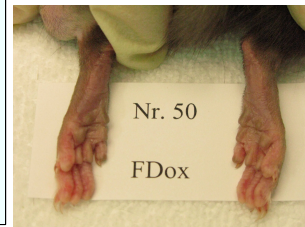
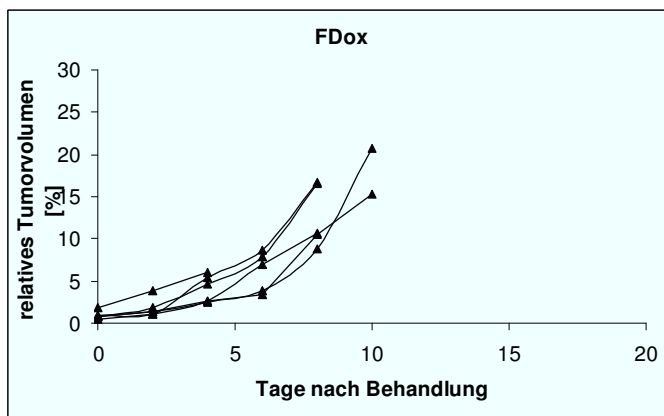
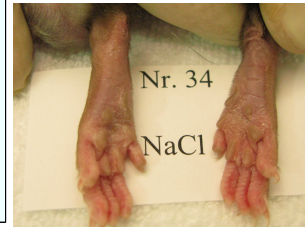
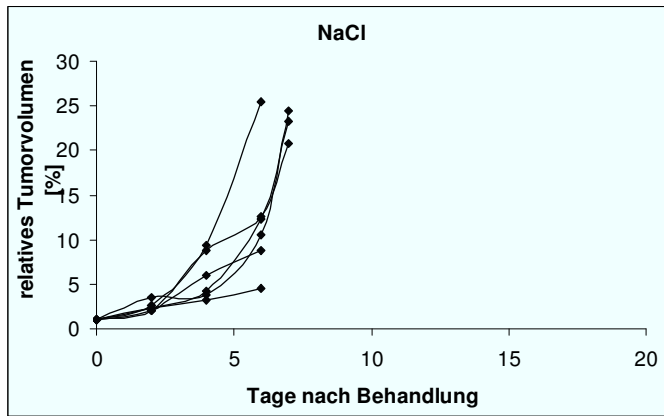


Abbildung 73 Dox-Plasmakonzentration nach 1 h bzw. 24 h (Caelyx®) nach HT-Behandlung ; n=3 pro Gruppe; HT mit Wasserbad (42°);

5.3.5 Therapeutische Studie Hyperthermie Wasserbad

In jeder Gruppe wurden je 6 Tiere mit 5 mg/kg Dox + HT (Wasserbad 42 °C) behandelt. Nach 2-3 Tagen zeigte sich an der gesamten hyperthermierten Gliedmaße der Ratten, die mit TSL (Dox) behandelten worden waren eine starke Rötung. Das Gewebe war ödematisiert und wurde nach weiteren 2-3 Tagen nekrotisch. Die stärksten Reaktionen waren bei PG₂- und PG₃-TSL (Dox) behandelten Tieren zu beobachten, so dass diese frühzeitig euthanasiert werden mussten. Die Gewebenekrosen waren schwächer bei Ratten, die mit Lyso-PC TSL (Dox) therapiert worden waren. Ratten, die Caelyx®, FDox oder ausschließlich mit HT behandelt worden waren hatten keine Hautirritationen oder andere NW an den erwärmten Gliedmaßen.

Therapien ausschließlich mit HT, sowie FDox und Caelyx® mit HT kombiniert hatten kaum Einfluss auf das Tumorwachstum. Das Tumorwachstum bei TSL (Dox) behandelten Tieren war verzögert. Eine Bewertung war aufgrund der frühzeitigen Euthanasie jedoch nicht möglich



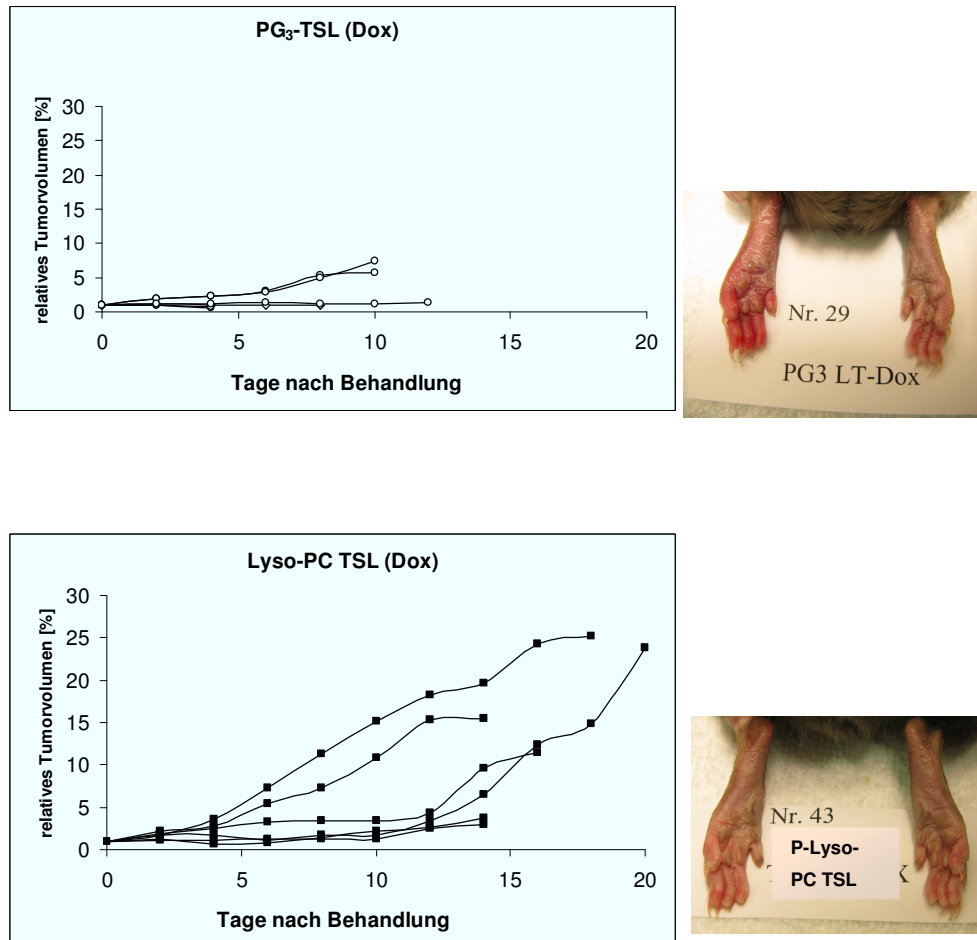


Abbildung 74 Tumorwachstumsstudie BN175-Fibrosarkom ; Behandlung mit 5mg/kg Dox i.v. + 1h HT mit Wasserbad (42°); n=6 pro Gruppe; Fotos: Beispiele für hyperthermierte (links) und nicht hyperthermierte (rechts) Gliedmaßen 3 Tage nach Behandlung

Therapeutische Studie Hyperthermie Lampe

Da eine regionale HT der gesamten Gliedmaße mittels Wasserbad zu einer massiven Freisetzung von Dox und hiermit verbunden starken Gewebenekrosen gesunden Gewebes führte, wurde als lokale HT ausschließlich des Tumorgewebes eine Kaltlichtquelle gewählt. Die Dosis wurde auf 2 mg/kg reduziert.

In den Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass der Abstand von der Lampe zum Tumor > 8 cm sein muss, um Verbrennungen der Haut zu vermeiden. Die intratumorale Temperatur musste über die gesamte Zeit der HT beobachtet und sofort durch Verringerung/Erhöhung der Lichtintensität korrigiert werden, sobald diese von 41 °C abwich. Auf diese Weise ließ sich intratumoral eine konstante Temperatur erhalten.

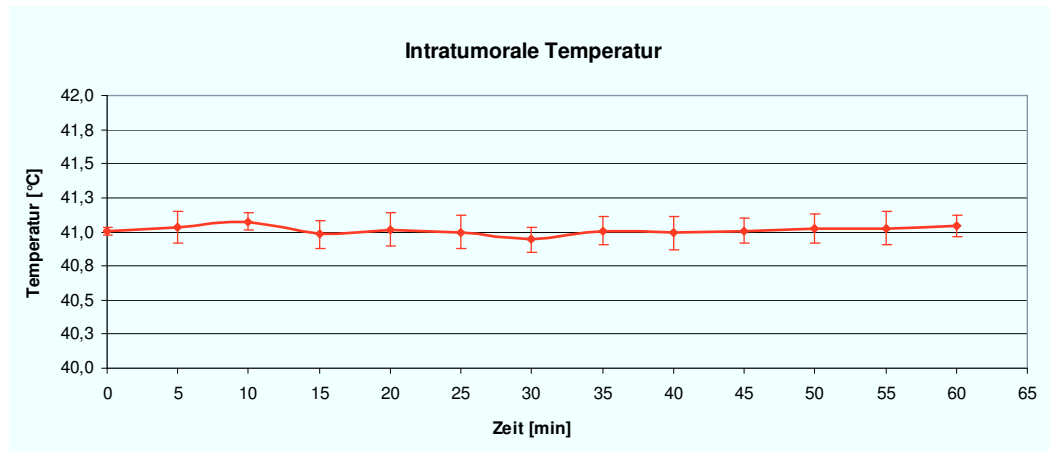


Abbildung 75 Intratumorale Temperatur während lokaler HT mittels Kaltlichtquelle

Sowohl Tiere, die mit 2 mg/kg Dox als auch mit 5 mg/kg Dox behandelt wurden zeigten keine Veränderungen an der behandelten Gliedmaße. Leichte, reversible Hautrötungen am hyperthermierten Tumor waren nach 2-3 Tagen abgeheilt. Es wurden drei Tumorregressionen der mit PG₃-TSL (Dox) (Dosis: 2 mg/kg Dox) behandelten Tiere beobachtet. Bei zwei weiteren Ratten kam es zur Wachstumsverzögerung. Diese Tiere mussten nach 20 Tagen euthanasiert werden, ein Tier bereits nach 10 Tagen. Die mit Lyso-PC (Dox) behandelten Tiere mussten aufgrund der Tumorgrößen nach 8-9 Tagen euthanasiert werden. Bei einem Tier kam es zu einer Wachstumsverzögerung (Euthanasie 18 Tage nach HT- Behandlung).

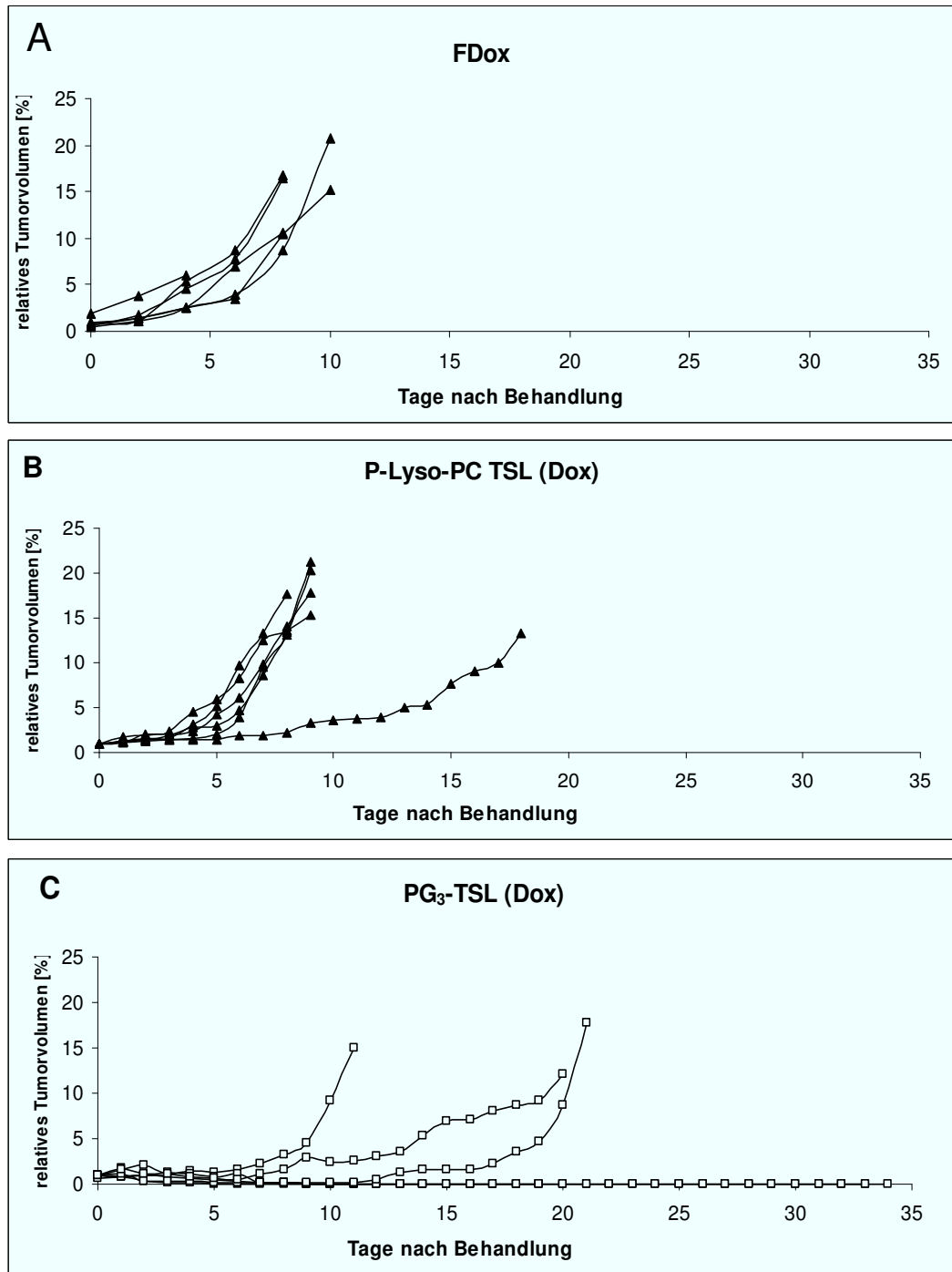


Abbildung 76 Tumorwachstumsstudie ; Dosis: 2mg/kg; HT mit Lampe (41 °C); n = 6;
A NaCl B P-Lyso-PC TSL (Dox) C PG₃-TSL (Dox)

6 DISKUSSION

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit sollten Aufschluss darüber geben, in wie weit sich im Tiermodell die PK, die Anreicherung und die therapeutische Effizienz von PG₁, PG₂ und PG₃ basierten TSL (Dox) der Formulierung DPPC:DSPC:DPPG_n 50:20:30 (m/m); (n = 1,2,3) voneinander unterscheiden. Darüber hinaus sollte ein Vergleich zu FDox, Caelyx[®] und Lyso-PC basierten TSL (Dox) der Formulierung DPPC:P-Lyso-PC-DSPE-PEG₂₀₀₀ 90:10:4 (m/m) gezogen werden. Die *in-vivo*-Daten sollten von *in-vitro* - Versuchen zur Stabilität und Freisetzungseigenschaft der TSL unterstützt werden. Im Gegensatz zu Lyso-PC basierten TSL (Dox), die bereits in mehreren *in-vitro*- (27) und *in-vivo*-Studien (75, 76) charakterisiert wurden, liegen über TSL basierend auf synthetischen DPPG_n Lipiden bisher nur wenige Veröffentlichungen (77) vor.

6.1 Speziesabhängige Dox-Freisetzung *in vitro*

Plasmabestandteile können die Freisetzung verschiedener liposomaler Formulierungen beeinflussen (25). Da die initiale HWZ der TSL (Dox) mit 12,6 min (PG₂-TSL (Dox)) und 13,8 min (PG₃-TSL (Dox)) in der Maus überraschenderweise sehr kurz war (5.3.3.1.1) wurde *in vitro* die temperaturabhängige Dox Freisetzung in Puffer und Plasmen verschiedener Spezies gemessen (Abbildung 22). Die Ergebnisse bestätigen sowohl den Einfluss von Plasma auf die Dox-Freisetzung von PG-TSL (Dox), als auch einen Spezieseffekt. Der Plasmaeffekt wird besonders deutlich bei der etwas stabileren 10 mol % PG₂-TSL (Dox) Formulierung. In HN-Puffer ist diese über den gemessenen Temperaturbereich von 37-45 °C stabil. Die Inkubation in Plasma oder FCS führt jedoch zu einer Freisetzung des eingeschlossenen Dox, die ihr Maximum bei 42 °C erreicht. Bei höheren Temperaturen kommt es zu einer Herabsetzung der Freisetzungsrates um 3-10 % pro Grad Temperaturerhöhung. Die Dox-Freisetzung ist bei der Annäherung an die T_m maximal, da hier aufgrund der höchsten Unordnung in den Acylketten und einer molaren Volumensteigerung in der Liposomenmembran die höchste Membranpermeabilität für Dox besteht (78). Bei Temperaturen oberhalb der T_m sind die Acylketten wiederum alle in *trans-gauche* Position und es bestehen weniger Membrandefekte, als während der T_m. Die Freisetzungsrates sinkt daher oberhalb der T_m wieder ab. Auch die Freisetzung aus 30 mol % PG₂-TSL (Dox) wird durch Inkubation in FCS beeinflusst (Abbildung 22; Abbildung 23). Plasmabestandteile, die einen Einfluss auf die Freisetzung aus den TSL ausüben könnten, sind zum einen Plasmaproteine (Albumine, α-, β- und γ-Globuline) zum anderen Lipide (Cholesterin, Phospholipide, Triglyceride, freie Fettsäuren, Bilirubin). In der Literatur wird viel über den Einfluss der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran und deren Zetapotential auf die Interaktion mit Serumproteinen

beschrieben. So zeigen Hernandez-Caselles et al. (79), dass an negativ geladene Liposomen insbesondere Proteine mit einem Molekulargewicht von 250-480 KD elektrostatisch binden, dies jedoch auch stark von der Ladung einzelner Lipide der Liposomenmembran abhängt. Je höher die Dichte der negativen Ladungen auf der Liposomenmembran ist, desto mehr Serumproteine binden an die Membran. Diese Interaktion anionischer Phospholipide PG-basierter Liposomen mit Serumkomponenten wurde auch in anderen Studien gezeigt (80). Da DPPC und DSPC neutral geladene Lipide sind und DPPG₂ eine negative Ladung aufweist haben 30 mol % PG₂-TSL (Dox) (-19 mV bei verwendeter Charge) ein negativeres Zetapotential als 10 mol % PG₂-TSL (Dox) (-7,2 mV bei verwendeter Charge). Damit ist für die 30 mol % PG₂-TSL (Dox) aufgrund der höheren Dichte negativ geladener Lipide eine höhere Anzahl an gebundenen Proteinen zu vermuten. Dies könnte eine Erklärung für die höhere Freisetzung der 30 mol % im Vergleich zu den 10 mol % PG₂-TSL (Dox) sein, die sich besonders bei der Inkubation in HN-Puffer zeigt.

Serumproteine können als Bestandteil des Komplementsystems eine Opsonierung der Liposomenmembran bewirken und über eine Aktivierung des Komplementsystems eine Wirkstofffreisetzung induzieren. Es wurde gezeigt, dass abhängig von der Liposomenformulierung der Zusatz von C3-Antikörpern die Wirkstofffreisetzung in Rinderserum verhindern kann, nicht jedoch in Humanserum (25). Ebenso wurde gezeigt, dass der Zusatz eines Chelators (EDTA) die Wirkstofffreisetzung in FCS aber nicht in Humanserum herabsetzt. EDTA bindet die zur Aktivierung des Komplementsystems notwendigen Magnesium- und Calciumionen. Dennoch hatte auch Humanserum einen destabilisierenden Effekt auf die Liposomenmembran, der jedoch nicht erklärt werden konnte.

Serumproteine können aber nicht nur auf der Liposomenoberfläche gebunden werden, sondern auch in die Membran integriert werden (81). Hosokawa et al. zeigten eine temperaturabhängige Bindung von bovinem Serumalbumin an DPPC:DPPG 7:3 m/m – TSL mit einem Maximum bei der T_m der Liposomenmembran. Die T_m erstreckte sich nach Inkubation in bovinem Serumalbumin über einen breiteren Temperaturbereich, was ein Zeichen für hydrophobe Insertion des Albumins in die Doppelmembran ist. Durch Penetration der Plasmaproteine in die Doppelmembran, ändert sich die Packung und Struktur der Phospholipide, und damit die Freisetzungsrates während der T_m . Zudem wurde gezeigt, dass Albumin, sowohl aus humanem als auch aus Rinderplasma die Fusion von SUV's induziert (82). Bei diesem Vorgang kann es ebenfalls zu Freisetzung von Wirkstoff kommen. Über bovines Serumalbumin hinaus wurden weitere zehn Plasmaproteine nachgewiesen, welche an der Liposomenmembran gebunden waren. Für diese wird ebenfalls ein Einfluss auf die Freisetzung des Wirkstoffs vermutet, der jedoch

nicht weiter untersucht wurde.

Über Plasmaproteine hinaus können Lipide zu einer Veränderung der Wirkstofffreisetzung beitragen. Shabbits (83) beschreibt einen neuen, präziseren *in-vitro*-Test zur Voraussage der *in-vivo*-Wirkstofffreisetzung, da herkömmliche Tests, wie Dialyseverfahren den großen Bestand an Lipidmembranen (in Blutzellen und Gewebe) nicht berücksichtigen. Diese beeinflussen nach systemischer Applikation der Liposomen jedoch signifikant die Wirkstofffreisetzung. Im neuen Test nach Shabbits werden MLV eingesetzt, um den Bestand an Lipidmembranen *in vivo* nachzuahmen, so dass hierdurch eine bessere Aussage über die Wirkstofffreisetzung *in vivo* gemacht werden kann.

Eine große Rolle spielen auch Apolipoproteine (84). Apolipoprotein A-I und Apolipoprotein E aus Rattenserum formen z.B. diskoidale Komplexe, welche zu einer erhöhten Freisetzung beitragen können. Durch Interaktion mit der Liposomenmembran werden Lipide aus dieser gelöst und an die Apolipoproteine gebunden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass bestimmte Peptide in der Lage sind Flip-Flops (Seitenwechsel) der Phospholipide in der Liposomenmembran zu induzieren (85). Hierdurch kommt es zu einem veränderten Krümmungsradius der Liposomenmembran, der einen Einfluss auf die Stabilität hat.

Sowohl bei 10 als auch bei 30 mol % PG₂-TSL (Dox) wurden unterschiedliche Freisetzungsraten gemessen, wenn diese in Plasma verschiedener Spezies inkubiert wurden (Abbildung 23; Abbildung 26). So begann im Mausplasma die Freisetzung gegenüber allen anderen Plasmen und FCS bei etwa einem Grad niedriger, bei gleichem Kurvenverlauf. Insbesondere bei Temperaturen der maximalen Freisetzung ergeben sich daher große Unterschiede. Während aus den 10 mol % PG₂-TSL (Dox) bei 39 °C bzw. den 30 mol % PG₂-TSL (Dox) bei 38 °C in allen gemessenen Plasmen 9-11 % Dox freigesetzt wird sind es in Mausplasma schon 22-23 %. Noch größer ist der Unterschied für die 30 mol % PG₂-TSL (Dox) bei 39 °C. In Mausplasma beträgt die Freisetzung mit 90 % etwa das Dreifache der Freisetzung in anderen Plasmen. Shibata et al. (86) haben einen ähnlichen Spezieseffekt für Mausplasma beschrieben. Sie haben gezeigt, dass die Freisetzungsrates einer Stealth liposomalen Formulierung nach drei Stunden Inkubation in Mausserum 5-fach so hoch wie in Rinder-, Ratten-, oder Humanserum war. Dies wird von den Autoren auf die höhere Ammoniumionenkonzentration (100-fach im Vergleich zu Humanserum) in kommerziellem Mausserum zurückgeführt. Freies Ammoniak kann über die Liposomenmembran diffundieren und so den intraliposomalen pH-Wert erhöhen. Aufgrund des Kollapses des pH Gradienten diffundiert nicht ionisches Dox vermehrt aus dem Liposom über die Membran. Da die PG-TSL (Dox) für diese Versuche über einen Citratgradienten geladen wurden wäre dieser Effekt ebenfalls eine Erklärung für den

beobachteten Spezieseffekt. Eine weitere Ursache könnte eine Überpräsentation von Serumkomponenten wie Albumin oder speziesspezifischen Komponenten im Mausplasma sein. Durch Integration in die Membran könnten diese während der T_m Packungsdefekte verursachen oder entstandene Poren ähnlich der PEG-Lipide stabilisieren. Durch diese Strukturänderungen in der Liposomenmembran wäre eine erhöhte Wirkstofffreisetzung wahrscheinlich. Auch wenn dargestellt werden konnte, dass Plasmakomponenten die Freisetzung aus PG-TSL beeinflussen und ein Spezieseffekt besteht, bleiben wichtige Fragen offen. So ist unklar welche Plasmakomponente im Mausserum die Freisetzung im Temperaturbereich von 38-40 °C erhöht. Außerdem könnte der Effekt nicht nur auf einen, sondern mehrere Bestandteile zurückzuführen sein. Es ist auch nicht auszuschließen, dass es sich um einen speziesspezifischen Bestandteil handelt, der ausschließlich im Mausserum vorkommt. Alternativ sind Konzentrationsunterschiede bestimmter Plasmakomponenten in Betracht zu ziehen.

Um die Serumkomponenten aus dem Mausplasma zu bestimmen, welche die Wirkstofffreisetzung beeinflussen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Eine Möglichkeit wäre die Liposomensuspension mit Plasmen verschiedener Spezies zu inkubieren und anschließend über SDS-PAGE die Proteine aufzutrennen, die an die Liposomenmembran haften. Nach Bestimmung der Komponenten über Massenspektrometrie, könnte die Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen bei Inkubation mit den ermittelten Serumproteinen gemessen werden.

6.2 Vergleich P-Lyso-PC und S-Lyso-PC TSL (Dox) in vitro

Selbst eine geringfügige Variation in der Zusammensetzung der Liposomenmembran kann die Liposomeneigenschaften stark beeinflussen (87). Dies bietet die Möglichkeit vielversprechende Formulierungen weiter zu entwickeln und zu optimieren. P-Lyso-PC TSL (Dox) setzen den Wirkstoff bei milder HT sehr schnell frei aber haben den Nachteil, dass es auch schon im Plasma bei Körpertemperatur zu unspezifischer Freisetzung kommt (88). Die Ergebnisse zeigen, dass der Austausch des P-Lyso-PC Anteils mit S-Lyso-PC, zu einer stabileren Formulierung bei niedrigeren Temperaturen, mit vergleichbarer Freisetzungsgeschwindigkeit führt (P-Lyso-PC TSL (Dox): $91,7 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ bei 40 °C und S-Lyso-PC TSL (Dox): $85,8 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ bei 41 °C). Die temperaturabhängige Dox-Freisetzung in HN-Puffer bestätigt dieses Ergebnis. Während nach 5 min Inkubation von P-Lyso-PC TSL bei 39 °C in HN-Puffer schon 95 % Dox freigesetzt wurde, war die Dox-Freisetzung aus S-Lyso-PC TSL nur marginal. Es bleibt zu betonen, dass diese Unterschiede in HN-Puffer bei Messungen in Serum relativiert wurden und sich die Kurven angleichen (Abbildung 31). Da die Länge von Acylketten der Phospholipide Einfluss auf den Packungsparameter einer Membran haben (89), könnte dies auch die unterschiedlichen

Freisetzungen der beiden Formulierungen erklären. Ist der Packungsparameter erniedrigt und sind die Phospholipide in der Membran weniger dicht gelagert ergeben sich bei Erreichen der T_m mehr Freiräume und die Permeabilität der Membran für den Wirkstoff steigt. In der Formulierung wurde außerdem DSPE-PEG₂₀₀₀ verwendet. Die Moleküle von DSPE und S-Lyso-PC sind durch die gleiche Länge ihrer Fettsäureketten in ihrer Struktur ähnlich, während P-Lyso-PC mit Palmitoyl als Bestandteil eine um zwei Kohlenstoffatome kürzere Fettsäurekette besitzt als DSPE mit Stearoyl. Eine Erklärung für eine erhöhte Packungsdichte durch S-Lyso-PC in der Liposomenmembran könnte daher auch die zu DSPE ähnliche Molekülstruktur sein.

Die beiden Formulierungen unterschieden sich zudem in ihrer T_m (P-Lyso-PC TSL (Dox) 40,3 °C; S-Lyso-PC TSL (Dox) 41,7 °C), welche aus den unterschiedlichen Umwandlungstemperaturen von P-Lyso-PC (3 °C) und S-Lyso-PC (26 °C) resultieren. Da die Wirkstofffreisetzung entscheidend von der T_m beeinflusst wird deutet dies auf eine höhere Freisetzung bei niedrigeren Temperaturen für P-Lyso-PC TSL (Dox) im Vergleich zu S-Lyso-PC TSL (Dox) hin und konnte durch die Versuche bestätigt werden. Messungen in Serum sowie im Zytotoxizitätstest zeigten wiederum keine signifikanten Unterschiede. Der Einfluss von Serumkomponenten wurde bereits für PG-basierte Liposomen diskutiert (6.1). Die in diesen Versuchen verwendeten Lyso-PC basierten TSL sind PEG-yliert, so dass elektrostatische und hydrophobe Interaktionen mit Serumkomponenten über sterische Abschirmung der Liposomenmembran weitestgehend unterbunden werden (90). Dennoch geht ein signifikanter Anteil des enkapsulierten Dox verloren, sobald diese TSL Formulierung *in vivo* in den Blutkreislauf appliziert wird (88). Nach einem Modell von Banno et al. (69) könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass Lysolipide die Tendenz haben, während der T_m aus der Liposomenmembran zu dissoziieren. Hier spielt ebenfalls der große Pool an Lipidmembranen im biologischen Milieu (vaskuläre Endothelzellen, Erythrozyten) eine große Rolle, welcher den aus der Liposomenmembran ausscheidenden Lysolipidanteil als Akzeptor annehmen kann. Zudem könnten freie Fettsäuren oder Cholesterol in die Liposomenmembran integriert werden und die Wirkstofffreisetzung beeinflussen. Die Permeabilität der Membran kann auch durch Flip-Flops des Lysolipids von der äußeren in die innere Membran, welche durch Serumkomponenten induziert wurden, verändert werden. Diese Effekte durch Serumkomponenten auf die Wirkstofffreisetzung, könnten die Unterschiede zwischen P- und S-Lyso-PC basierten TSL (Dox), welche nach Inkubation in HN-Puffer gemessen werden konnten, wiederum relativieren.

6.3 Einfluss von Verdünnung auf die Liposomenstabilität

Liposomale Chemotherapeutika werden bei klinischer Anwendung intravenös appliziert,

was zu einer starken Verdünnung innerhalb der Blutzirkulation führt. Der Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Verdünnung der Liposomenlösung das Wirkstoff-Lipid Verhältnis beeinflusst und möglicherweise zu einem nachteiligen Wirkstoffverlust über die Liposomenmembran führt.

Das Wirkstoff-Lipid Verhältnis der Stealth Liposomen (Caelyx[®]), welche durch das Cholesterol in der Liposomenmembran eine hohe Stabilität besitzen, bleibt wie erwartet vor und nach der Verdünnung unverändert. Cholesterol als Bestandteil einer Liposomenmembran hat starken Einfluss auf dessen Fluidität und damit auch auf dessen Permeabilität. Im flüssigkristallinen Zustand festigt sich durch Interaktionen des planaren Rings von Cholesterol, einer hydrophoben Seitenkette am C17 und der 3 β -OH Gruppe mit den Phosphorsäureresten der Phospholipide der geordnete Zustand der lipophilen Fettsäureketten (91). Hierdurch wird die Mobilität der Fettsäureketten eingeschränkt und die Membran bleibt rigide, so dass auch eine Diffusion eingeschlossener, hydrophiler Arzneimittel aus dem Liposomeninneren weitestgehend verhindert wird. Das Experiment zeigt, dass eine starke Verdünnung dieser Liposomenlösung keinen Einfluss auf die Permeabilität der Liposomenmembran hat. Es kommt zu keiner Diffusion des Doxorubicin aus dem Liposomeninneren – das Wirkstoff-Lipid Verhältnis verändert sich nicht.

Ebenso verändert sich in diesem Versuch das Wirkstoff-Lipid Verhältnis der PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) vor und nach der Dialyse kaum. Damit bleibt der Einschluss des Wirkstoffs Doxorubicin gewährleistet. Dies spricht für einen Vorteil in der klinischen Anwendung der PG-TSL (Dox) gegenüber den P-Lyso-PC TSL (Dox), bei denen allein eine Verdünnung zu einem deutlichen (60 %igen) Wirkstoffverlust führt. Beide Formulierungen haben kein Cholesterol in der Liposomenmembran, welches die Membranpermeabilität senken kann. Mit 10 % P-Lyso-PC ist jedoch ein Phospholipid in der ThermoDox Formulierung vorhanden, welches dazu tendiert, andersartige Strukturen als Liposomen zu formen (Micellen; mizellare Discs). Wenn Lysolipide in der Liposomenmembran inhomogen verteilt sind, kann an diesen Stellen die Permeabilität über die einkettigen Phospholipide gesteigert und die Wirkstofffreisetzung erhöht sein (28). Die erhöhte unspezifische Freisetzung von Dox aus Lyso-PC TSL (Dox) kann zu NW wie Myelosuppression und Kardiotoxizität führen, die auch nach Applikation von FDox auftreten und durch liposomale Formulierungen gesenkt oder verhindert werden können (88, 92).

PG-basierte Liposomen enthalten keinen Lysolipidanteil, so dass eine erhöhte Membranpermeabilität weniger wahrscheinlich ist, was aufgrund des unveränderten Wirkstoff-Lipid Verhältnisses bestätigt werden konnte. Klinisch ist für diese

Formulierungen auch eine Reduktion der NW von FDox zu vermuten.

6.4 Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität der TSL (Dox) im Vergleich zu Caelyx[®] und FDox auf BN175 Fibrosarkomzellen wurde mit dem WST-Test untersucht. Dabei wurde der Einfluss der Thermosensitivität (Inkubation bei 37 °C oder 42 °C) und der Einfluss der Inkubationsdauer (15 min oder 60 min) berücksichtigt. Ziel war es zu prüfen, ob PG-TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) nach einer Inkubation bei 37 °C im Zellkulturmedium stabil sind und somit eine geringe Zytotoxizität (ähnlich Caelyx[®]) aufweisen. Die Inkubation bei 42 °C sollte zeigen, dass die Zytotoxizität der TSL (Dox) durch die Dox-Freisetzung mit der Zytotoxizität von FDox vergleichbar ist, während die nicht thermosensitive Formulierung Caelyx[®] aufgrund marginaler Wirkstofffreisetzung nur geringen Einfluss auf die relative Wachstumsrate der Zellen besitzt. Die Dosiswirkungskurven der verschiedenen TSL (Dox) glichen nach Inkubation bei 42 °C unabhängig von der Inkubationsdauer den Dosiswirkungskurven von FDox (Abbildung 33 - Abbildung 36). Da Dox in *in-vitro*-Tests bereits nach 15 min Inkubation bei 42 °C zu 100 % aus allen TSL-Formulierungen freigesetzt wird (Abbildung 21; Abbildung 28; Abbildung 29), entsprachen die Ergebnisse diesbezüglich den Erwartungen.

Dagegen stimmen die Ergebnisse nach Inkubation bei 37 °C nicht mit vorherigen Experimenten überein. Sowohl nach 15 als auch nach 60 min Inkubation bei 37 °C waren die Dosiswirkungskurven aller TSL (Dox) toxischer als Caelyx[®]. Vorherige Messungen der ÖK der TSL (Dox) bei denen die Wirkstofffreisetzung in FCS bei 37 °C über einen Zeitraum von bis zu 60 min gemessen wurde, deuteten jedoch auf Dosiswirkungskurven, die Caelyx[®] vergleichbar sind (Abbildung 77), hin. Caelyx[®] ist nicht thermosensitiv, so dass der Wirkstoff sowohl bei 37 °C als auch bei 42 °C eingeschlossen bleibt und nicht bioaktiv ist. Daher bleiben die Zellen trotz Inkubation mit Caelyx[®] vital.

Eine mögliche Erklärung für die hohe Zytotoxizität der TSL (Dox) bei 37 °C wäre, dass die Liposomen an den Zellen haften und durch den Waschvorgang nicht vollständig entfernt werden. Dox könnte somit in den folgenden 48 h bis zur Durchführung des WST-Tests aus den TSL freigesetzt werden. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, dass die Liposomen während der Inkubationszeit durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden könnten und Dox auch noch nach dem Waschen der Zellen intrazellulär freigesetzt wurde.

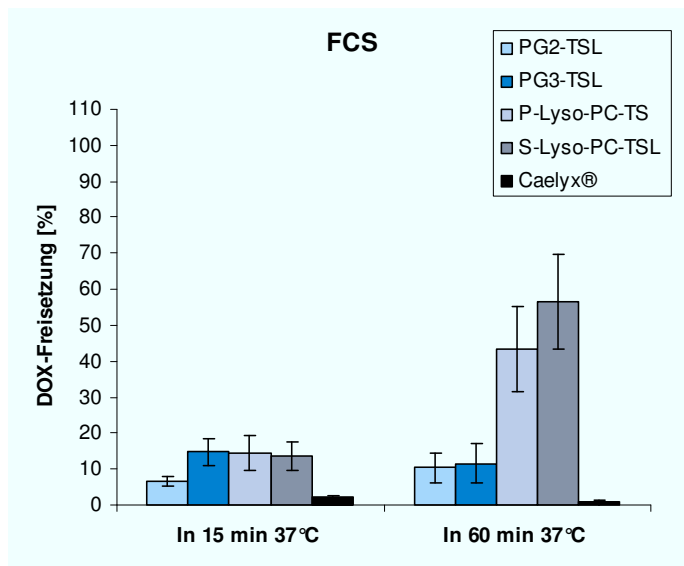


Abbildung 77 Dox-Freisetzung nach 15 min oder 60 min Inkubation in FCS ; (nicht publizierte Daten der AG Liposomen)

Auch wenn der Verlauf der Dosiswirkungskurven aller TSL (Dox) eher dem von FDox als von Caelyx[®] gleicht, ergeben sich zwischen den TSL Unterschiede. Während die Dosiswirkungskurven von S- und P-Lyso-PC TSL fast deckungsgleich mit der von FDox sind, zeigt sich nach Inkubation mit PG₂- und PG₃-TSL (Dox) geringere Toxizität. Dies spiegelt sich auch in den vergleichbaren IC₅₀ von FDox (1,2 µM nach 15 min; 0,3 µM nach 60 min bei 37 °C) und Lyso-PC (1,1 µM nach 15 min; 0,3 µM nach 60 min bei 37 °C) bzw. höheren IC₅₀-Werten von PG₂-TSL (5,0 µM nach 15 min 2,5 µM nach 60 min) wieder. Weniger deutlich ist der Unterschied bei PG₃-TSL (1,9 µM nach 15 min; 0,12 µM nach 60 min). Die geringere Zytotoxizität der PG₂-TSL bei 37 °C könnte für eine höhere Stabilität verglichen mit der Lyso-PC Formulierung sprechen. Hierfür würde auch die höhere Dox-Freisetzung der Lyso-PC TSL *in vitro* nach 60 min Inkubation in FCS sprechen (Abbildung 77). Es ist bekannt, dass Liposomen mit negativem ζ-Potential aufgrund elektrostatischer Effekte in einem geringeren Maß an Zellen haften und endozytiert werden als Liposomen mit neutralem oder positivem ζ-Potential (93, 94). Da die Liposomenoberfläche der Lyso-PC TSL (Dox) im Vergleich zu PG-TSL (Dox) nur ein schwach negatives ζ-Potential besitzt (Abbildung 18) könnte dies ebenfalls eine mögliche Erklärung für die höhere Toxizität der Lyso-PC TSL (Dox) bei 37 °C sein.

Aufschluss über den genauen Effekt könnten Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen geben, bei denen das Verhalten von fluoreszenzmarkierten TSL

(Endozytose; Anhaften an Tumorzellen nach dem Waschen) während des Versuchs untersucht wird.

6.5 Akute und Subakute Toxizität

Die Verträglichkeit der PG-TSL (Dox) wurde bei der Untersuchung der akuten und subakuten Toxizität *in vivo* bestätigt. Bei den behandelten Tieren kam es weder zu Gewichtsverlusten, noch konnten Organveränderungen festgestellt werden. Toxizitätsuntersuchungen über einen längeren Zeitraum (> 30 Tage) wurden jedoch nicht durchgeführt.

Die synthetischen Lipide DPPG₂ und DPPG₃ besitzen im Vergleich zum natürlichen DPPG nur ein bzw. zwei Moleküle Glycerin zusätzlich. Diese sind über eine bzw. zwei Etherbindung(en) an der Kopfgruppe des Phospholipids gebunden. Nach Abspaltung der Fettsäuren (Palmitoyle Säuren), welche dem Körper als Energiequelle zur Verfügung stehen, verbleibt ein Diglycerin (DPPG₂) bzw. Triglycerin (DPPG₃). Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol, als Lebensmittelzusatzstoff (E244) zugelassen und als Triglycerid oder Phosphoglycerid häufiger Bestandteil im Organismus, so dass auch von diesem Molekül von keiner Toxizität auszugehen war.

Eine Ausnahme von der sonst guten Verträglichkeit war das Versterben zweier Ratten innerhalb von 10 min nach Applikation von 5mg/kg PG₃-TSL (Dox) im Rahmen der PK-Experimente. Dieser Einzelfall und wurden auf die hohe Viskosität der verwendeten Charge zurückgeführt. Die Ursache der gegenüber anderen Chargen erhöhten Viskosität konnte nicht geklärt werden. Möglich ist eine Verunreinigung der Lipide bei der Präparation, die nicht durch die verwendeten Analysemethoden detektierbar war.

6.6 Pharmakokinetik Maus

Da eine lange Zirkulationszeit der TSL verbunden mit hohen Dox-Konzentrationen im Plasma die Voraussetzung zur Steigerung des therapeutischen Index im Vergleich zu FDox ist, wurde die Halbwertszeit und AUC der TSL (Dox) *in vivo* untersucht. Zudem sollte die Dox-Konzentration in Leber Milz und Leber nach systemischer Applikation Aufschluss über die Verteilung der TSL (Dox) geben.

Bei der Bewertung der PK von liposomalen Wirkstoffen ist grundsätzlich zwischen der Kinetik der Liposomen und des Wirkstoffs zu unterscheiden. Die Regel, dass ein systemisch applizierter Wirkstoff zu 100 % bioverfügbar ist, kann bei liposomalen Formulierungen nicht angewendet werden. Der Wirkstoff wird erst bioverfügbar, sobald er aus den Liposomen freigesetzt wird. Da die Liposomenmembran in der vorliegenden Arbeit nur als Wirkstoffträger dient, wurde die Auswertung aller pharmakokinetischen

Versuche auf die Wirkstoffkinetik beschränkt. Bei den eingesetzten Lipiden handelt es sich hauptsächlich um Lipide, die auch im Körper natürlich vorkommen (DPPC, DSPC, DPPG; P-Lyso-PC) und physiologisch metabolisiert werden. Somit ist die Kinetik der Liposomen nach Freisetzung des Wirkstoffs für die Dox-PK und die Effizienz der Therapie nicht mehr relevant.

Der Verlauf der Plasmakonzentrationskurven aller TSL (Dox) in der Maus ist biphasisch und durch eine schnelle erste Eliminationsphase (mit $T_{1/2\alpha}$) von Dox gekennzeichnet, der eine langsame zweite Eliminationsphase (mit $T_{1/2\beta}$) folgt. Die initiale HWZ nach Applikation der TSL (Dox) war in der Maus mit 0,21 h (PG₂-TSL (Dox) 100 nm), 0,17 h (P-Lyso-PC TSL (Dox)), 0,23 h (PG₂-TSL (Dox) 200 nm und PG₃-TSL (Dox)) unerwartet kurz. Daher ist zu vermuten, dass der Wirkstoff größtenteils unspezifisch freigesetzt wird, oder eine schnelle Verteilung der Liposomen im Körpergewebe stattfindet. Die initiale HWZ ($T_{1/2\alpha}$) von Caelyx[®] war mit 0,24 h vergleichbar mit den TSL (Dox). Die lange zweite HWZ ($T_{1/2\beta}$) von 11,6 h führt hingegen zu einer signifikant höheren AUC (3700 h* μ M) verglichen mit allen TSL-Formulierungen (31-132 h* μ M). Die AUC ist proportional der bioverfügbaren Menge des Wirkstoffs, so dass eine Akkumulierung der Liposomen über den EPR-Effekt, wie mehrfach gezeigt, mit dieser Formulierung möglich ist (95, 96).

Da in vorherigen *in-vitro*-Experimenten die Freisetzung von CF-beladenen PG₂-TSL nach 3 h Inkubation bei 37 °C in FCS nur < 5 % (1) betrug, hatte man zunächst längere HWZ für diese Formulierung erwartet. Ähnliche Ergebnisse waren auch für PG₃-TSL (Dox) gemessen worden (nicht veröffentlichte Daten der AG Liposomen). Auch *in vivo* wurden längere HWZ von PG₂-TSL (CF) gegenüber freiem CF und bisherigen TSL-Formulierungen ermittelt (77). Die Plasma-HWZ im Hamster betrug hier 9,6 h und in der Ratte 5 h. Neben der anderen Tierspezies ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die PK von CF- und Dox- beladenen Liposomen gleicher Formulierung unterscheiden können, da die Liposomenmembran für unterschiedliche Moleküle auch unterschiedliche Permeabilität aufweist (97). Zudem könnte die erhöhte Ammoniumsulfatkonzentration im Mausserum (98) durch NH₃-Influx den intraliposomalen pH-Werts erhöhen und damit die Freisetzung nichtionischen Dox induzieren. Der Zusammenbruch des intraliposomalen pH-Gradienten hätte auf die CF-Freisetzung dagegen keinen Einfluss. Zudem weichen Distribution, Elimination und Redistribution von freigesetztem Dox und CF voneinander ab.

Eine mögliche Erklärung für die kurzen HWZ bei der PK in der Maus könnte die physiologisch höhere Körpertemperatur der Tiere (Maus: 38 – 39,3 °C) und eine stressbedingte Erhöhung der Körpertemperatur während der Blutabnahme sein.

Zusätzlich können Plasmabestandteile die Freisetzung verschiedener liposomaler Formulierungen beeinflussen (25), so dass ein Zusammenhang mit bestimmten Komponenten im Mausplasma zu vermuten war. Die höhere Freisetzung bei niedrigeren Temperaturen in Mausplasma wurde in *in-vitro*-Experimenten für PG-TSL (Dox) untersucht und bestätigt (6.1).

Alle TSL (Dox) zeigen gegenüber FDox in der Maus eine verlängerte HWZ. 60 min nach Applikation waren im Plasma jedoch nur noch 5-6 % des applizierten Dox messbar, während dies bei Caelyx[®] noch 73 % waren. Um eine möglichst große Menge des systemisch applizierten Dox aus den TSL lokal freisetzen zu können und gleichzeitig eine unspezifische Freisetzung von Dox im Plasma zu verhindern sind lange Blutzirkulationszeiten der TSL unerlässlich. Der starke Verlust der insgesamt injizierten Dox Dosis, welcher bereits in den ersten 60 min nach Applikation deutlich wird (Abbildung 43A) könnte sich nachteilig auf die gewünschte Erhöhung des therapeutischen Index auswirken. Da in den ersten 60 min deutlich höhere Plasmaspiegel als von FDox erreicht werden, ist der Beginn der HT sofort nach oder während der Applikation der TSL (Dox) zu wählen. Der Wirkstoff würde intravasal in den Tumorgefäßen freigesetzt. Je länger die Zeitspanne zwischen Applikation und Behandlung mit HT wird, desto geringer sind die im Plasma zur lokalen Freisetzung verfügbaren Dox Mengen.

Die intravasale Freisetzung des Wirkstoffs führt zur Zerstörung der Tumorgefäße (76) und über eine Unterbindung der Nährstoffzufuhr zur Wachstumshemmung des Tumors. So würde sich die Behandlung auf den gesamten Tumor auswirken, während nach der Extravasation Liposomen überwiegend perivaskulär (99) akkumulieren und somit nur ein begrenztes Tumorareal (perivaskuläre Tumorzellen) zerstört wird. Bei einer antivaskulären Tumorthherapie ist jedoch zu bedenken, dass wiederholte Behandlungen problematisch wären, da auch der Transport der TSL durch die zerstörten Tumorgefäße unterbunden würde.

Bei Plasmakonzentrationskurven der TSL (Dox), die vergleichbar mit Caelyx[®] wären, könnte der EPR-Effekt genutzt werden und der Wirkstoff nach Extravasation der Liposomen im Tumorgewebe durch lokale HT freigesetzt werden (zeitversetzte HT-Behandlung). Von Vorteil wäre hierbei, dass eine Redistribution des Wirkstoffs in den Körperkreislauf minimiert würde. Jedoch ist auch zu bedenken, dass nur ein geringer Anteil des injizierten Dox im Tumorgewebe über die Zeit akkumuliert. In einem subkutanen Tumormodell in der Maus wurde nur 6 % der injizierten Dosis im Tumorgewebe nachgewiesen (100).

Unterschiede der PK der einzelnen TSL (Dox) in der Maus sind marginal und aufgrund

hoher Standardabweichungen nur mit Vorsicht zu beurteilen. Die Dox Plasmakonzentrationen und die AUC sind 5-60 min nach Applikation der 100 nm PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) tendenziell höher, als nach Applikation von PG₁-TSL (Dox), 200 nm PG₂-TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) (Abbildung 43 A, B). Die kürzere Zirkulationszeit der 200 nm PG₂-TSL (Dox) gegenüber der 100 nm PG₂-TSL (Dox) ist vermutlich auf eine erhöhte Erkennung und Elimination der größeren Partikel durch Zellen des RES zurückzuführen (101). Hierzu passen auch die höheren Dox-Konzentrationen in Leber und Milz 30 min nach Applikation der 200 nm PG₂-TSL (Dox) verglichen mit der 100 nm Formulierung (Abbildung 46; Abbildung 48). Somit hat die höhere Stabilität größerer TSL *in vitro* (102) für die *in-vivo*-Zirkulationszeit der TSL eine geringere Bedeutung, als ihre verstärkte Erkennung durch Immunzellen. Für Lyso-PC TSL (Dox) ist bekannt, dass die PK *in vivo* FDox gleicht (Hauck 2006), was für einen Verlust von Dox aufgrund von Instabilität der TSL im Plasma hinweist.

Die Doxorubicinverteilung ist im Hinblick auf Organschädigungen von besonderer Bedeutung. Die Kardiotoxizität von FDox konnte durch die lang zirkulierende, liposomale Formulierung Caelyx[®] signifikant verringert werden (103). Vergleicht man die Dox-Konzentrationen im Herz 30 min nach Applikation zeigt sich, dass nach Behandlung mit Caelyx[®] oder PG₃-TSL (Dox) nur halb so hohe Dox-Konzentrationen gemessen werden, wie nach Applikation von FDox. Die Dox-Konzentrationen nach Applikation aller anderen TSL (Dox) liegen, wie die Plasmakonzentrationskurven dies vermuten ließen, zwischen diesen Werten. Die niedrigeren Dox-Konzentrationen im Herz nach Applikation der PG₃-TSL (Dox) könnten mit deren erhöhter Anreicherung in der Leber zusammen hängen. Auch nach Behandlung mit den anderen PG-TSL (Dox) sind die Dox-Konzentrationen in der Leber höher, als nach Behandlung mit Caelyx[®], Lyso-PC (Dox) oder FDox. Gleiches gilt in etwa für die Milz. Eine Erklärung könnte die PEGylierung, der Caelyx[®]- und Lyso-PC-Formulierungen sein, welche eine Hydratisierung des Liposoms im Serum und damit die Abschirmung vor Zellen des Immunsystems gewährleistet. Die Liposomenmembran der verschiedenen PG-TSL (Dox) ist nicht mit PEG-Molekülen beschichtet und könnte wie andere Liposomen über Zellen des RES vermehrt phagozytiert und in die Immunorgane Leber und Milz transportiert werden. Die unterschiedliche Organverteilung von Dox nach Applikation der PG-TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) bei vergleichbaren Plasmazirkulationskurven weist auf unterschiedliche Gründe für die kurzen HWZ hin. Nach PG-TSL Behandlung ist Dox vermehrt in Leber und Milz nachweisbar, so dass eine bessere Erkennung der Liposomen durch das Immunsystem naheliegt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass PG-TSL (Dox) ein niedrigeres ζ -Potential besitzen, welche zu einer stärkeren Bindung von Plasmaproteinen an die Liposomenmembran führt (79). Da dies nach Behandlung mit

Lyso-PC TSL nicht der Fall ist erklärt sich die kurze HWZ eher durch eine intravasale Freisetzung des Wirkstoffs. Die entsprechenden *in-vitro*-Versuche zur Stabilität der verschiedenen TSL unterstützen diese Theorie.

6.7 Dox-Anreicherung im Tumor und Organverteilung nach Hyperthermie

Die 5-fache Anreicherung von Dox im hyperthermierten Tumorgewebe nach Applikation der PG-TSL (Dox) zeigt, dass diese auch *in vivo* innerhalb der Blutzirkulation die Thermosensitivität behalten, die Passagezeit durch die Tumorgefäße sowie die Freisetzungsgeschwindigkeit ausreichend sind, um Dox lokal freizusetzen. Die doppelten Dox-Konzentrationen im hyperthermierten Tumorgewebe nach Applikation von FDox ist durch die verstärkte Durchblutung und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zu erklären (104). PG₁-TSL (Dox) führen trotz niedrigerer AUC und kürzerer HWZ im Vergleich zu den anderen PG-TSL (Dox) zur gleichen Anreicherung. Nach Behandlung mit Lyso-PC TSL (Dox) wird die größte Anreicherung von Dox (13-fach) gemessen. Jedoch ist die hohe Standardabweichung bei dieser Formulierung zu beachten.

Wird Dox unter lokaler HT-Behandlung aus den TSL im Tumor freigesetzt kann dies einen entscheidenden Einfluss auf die Verteilung der systemisch injizierten Dosis im Körper haben. Bei lokaler Freisetzung mit Anreicherung sind niedrigere Dox-Konzentrationen in anderen Organen zu erwarten. Da bei der PK ohne HT die Dox-Konzentration in den Organen 0,5 und 4 h nach Applikation gemessen wurde und bei der Anreicherungsstudie direkt im Anschluss an die HT ist ein genauer Vergleich problematisch. Geht man von vergleichbaren Dox-Konzentrationen 0,5 h und 1 h nach Applikation aus, hat sich die Verteilung von Dox in Herz, Leber und Milz durch lokale Wirkstofffreisetzung nach 1 h HT im vorliegenden Experiment nicht signifikant geändert. Im Herz wurden nach Applikation der PG-TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) in Kombination mit 1 h regionaler HT des Tumorgewebes immer noch Dox-Konzentrationen von 8 -12 ng/mg gemessen. Somit wurde die Dox-Konzentration durch die lokale HT nicht reduziert. In Milz und Leber sind die Dox-Konzentrationen ebenso vergleichbar mit der PK ohne Behandlung mit regionaler HT.

6.8 Pharmakokinetik Ratte

Da die PK der TSL (Dox) in der Maus unerwartet kurze Plasmazirkulationszeiten zeigte und *in vitro* höhere Freisetzungsraten der PG-TSL (Dox) in Mausplasma gemessen wurden, wurde die PK in einer zweiten Tierspezies (Ratte) untersucht. Infolgedessen sollten die verschiedenen TSL-Formulierungen ohne den Einfluss des Spezieseffekts verglichen werden. Die Tiere wurden während der Blutabnahmen anästhesiert, so dass die Körpertemperatur während der Blutabnahmen mit einer rektalen Messsonde kontrolliert

(< 37,5 °C) werden konnte. Um die gleichen Bedingungen wie bei der Untersuchung der PK von Dox unter regionaler HT (Wasserbad 42 °C) zu gewährleisten, wurde während der Blutabnahmen eine Hintergliedmaße in 38 °C temperiertes Wasser getaucht.

Der Verlauf der Plasmakonzentrationskurven von Dox nach Applikation von PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox) ohne Hyperthermie ist im Gegensatz zu den Kurven gemessen in der Maus linear. In den ersten 60 min sind sie vergleichbar mit der Plasmakonzentrationskurve von Caelyx[®], jedoch mit höheren Anfangskonzentrationen und kürzeren HWZ. Daher ist zu vermuten, dass die PG-TSL (Dox) keine initiale schnelle Distributionsphase besitzen, wie diese für Caelyx[®] beschrieben wurde (105). Die höheren Anfangskonzentrationen der PG-TSL (Dox) führen auch zu höheren AUC_{0-60 min}-Werten im Vergleich zu Caelyx[®]. Damit stehen für diese Formulierungen höhere Mengen Dox zur lokalen Freisetzung mittels HT zur Verfügung. Die längeren HWZ der PG-TSL (Dox) in der Ratte im Vergleich zu den HWZ in der Maus bestätigen den Spezieseffekt auf die Dox-Freisetzung *in vitro* (siehe 6.2).

Die Plasmakonzentrationskurve von Lyso-PC TSL (Dox) ist nicht linear und fällt innerhalb der ersten 10 min nach Applikation auf annähernd 0 ng/ml Dox ab. Die Anfangskonzentration von Dox nach Applikation von P-Lyso-PC TSL (Dox) beträgt etwa 50 % der Anfangskonzentration nach Applikation von PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox). Somit ergibt sich für P-Lyso-PC TSL (Dox) sowohl eine geringere AUC_{0-60 min}, als auch eine sehr viel kürzere HWZ.

Die Behandlung mit regionaler HT und lokaler Freisetzung von Dox aus den TSL hatte einen deutlichen Einfluss auf die PK. Bei PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) ist die Abnahme der Dox-Konzentration im Plasma (steilere Kurve im Vergleich zur PK ohne HT) auf die lokale Freisetzung des Wirkstoffs zurückzuführen. Die Plasmakonzentrationskurven von PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox), bei der die PK ohne Anwendung von regionaler HT gemessen wurde, unterschieden sich nur marginal voneinander. Aufgrund hoher Standardabweichungen war die stärkere Abnahme von Dox im Plasma nach Applikation von PG₂-TSL (Dox) verglichen mit PG₃-TSL (Dox) in Kombination mit regionaler HT nicht signifikant. Die geringen Plasmadoxorubicinkonzentrationen nach 1 h HT zeigen, dass die Dauer der HT ausreicht um den Großteil des liposomalen Wirkstoffs lokal freizusetzen. Die HWZ und AUC_{0-60 min} der PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) reduzieren sich bei Messung der PK unter HT deutlich, so dass die Freisetzung des Wirkstoffs *in vivo* bestätigt wird. Nach Applikation von P-Lyso-PC in Kombination mit regionaler HT ist die Anfangskonzentration gegenüber der Anfangskonzentration, die ohne regionaler HT gemessen wurde, nochmals um die Hälfte erniedrigt, was auf eine schnelle Freisetzung des Wirkstoffs im

hyperthermierten Tumorgewebe schließen lässt. Nach 10 min ist jedoch bereits fast kein Dox mehr im Plasma messbar, so dass eine längere Behandlung mit HT zu keiner weiteren Wirkstofffreisetzung führen kann. Daher ist zu vermuten, dass die insgesamt freigesetzte Menge aus P-Lyso-PC TSL (Dox) deutlich geringer ist, als aus PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox). Daher wird für letztere Formulierungen auch eine bessere therapeutische Effizienz erwartet.

6.9 Dox-Anreicherung nach HT Ratte

Tumoren

Es wurde die Anreicherung von Dox nach Freisetzung aus PG₂-TSL (Dox), PG₃-TSL (Dox) und P-Lyso-PC TSL (Dox) in hyperthermiertem Tumorgewebe gezeigt. Die Behandlung mit PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox) führte zu einer deutlich höheren Anreicherung von Dox im hyperthermierten Gewebe (16-fach) als die Behandlung mit P-Lyso-PC (Dox) (3-fach). Somit spiegelten sich in diesem Versuch die höhere AUC_{∞0-60min}-Werte der PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) sowie die längeren HWZ, verglichen mit P-Lyso-PC TSL (Dox) wieder. Durch höhere Dox-Konzentrationen in den ersten 60 min nach Applikation der PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) in der Blutzirkulation stand auch in den Tumorgefäßen eine größere Menge Dox zur lokalen Freisetzung zur Verfügung. Die Dox-Anreicherung nach Applikation von FDox ist durch die gesteigerte Durchblutung des hyperthermierten Tumorgewebes sowie der erhöhten Permeabilität der Tumorgefäße zu erklären. Wie im BFS-1 syngenem Tumor in der Maus war die Dox-Konzentration im hyperthermierten Tumor doppelt so hoch wie im nicht hyperthermierten Tumor. Während nach Beendigung der HT die Dox-Konzentrationen im hyperthermierten und nicht hyperthermierten Tumorgewebe bei Caelyx[®]-Behandlung gering sind, zeigen sich in beiden Tumoren hohe Dox-Konzentrationen 24 h nach Beendigung der HT. Die Dox-Liposomen akkumulieren über den EPR-Effekt im Tumorgewebe. Die Dox-Konzentration nach Caelyx[®]-Behandlung ist 24 h nach Applikation vergleichbar mit der Dox-Konzentration nach PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox)-Behandlung 1 h nach HT. Es muss jedoch angenommen werden, dass nur ca. ein Drittel des angereicherten Dox im Tumor nach Caelyx[®]-Behandlung bioverfügbar ist. (74). Caelyx[®] hat jedoch den Vorteil, dass Dox auch in nicht hyperthermiertem Tumorgewebe akkumuliert. Metastasen können daher ebenso behandelt werden.

Herz, Leber, Milz

Nach Applikation von PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox) wurde in Leber, Milz und im Herz je ein Drittel weniger Dox gemessen als nach Applikation von FDox (Ausnahme: für PG₂-TSL (Dox) in der Milz 1/5 weniger Dox). Zwar akkumulieren Liposomen

verstärkt in den Immunorganen (106), was sich beispielsweise in der hohen Dox-Konzentration in der Milz 24 h nach Applikation von Caelyx[®] zeigt. Da Dox nach Applikation der TSL (Dox) jedoch lokal freigesetzt wurde, ist die Dox-Konzentration in Organen wie Leber, Milz und Herz niedriger als nach Behandlung mit FDox. Da die TSL nach Freisetzung des Wirkstoffs im Blutkreislauf verbleiben, akkumulieren vermutlich verstärkt leere Liposomen. Dies könne durch Nachweis der entsprechenden Lipide in Leber und Milz überprüft werden. Das Wirkstoff:Lipid Verhältnis müsste dementsprechend geringer als nach Behandlung mit TSL ohne HT sein.

Die geringere Dox-Konzentration im Herz ist wichtig zur Reduktion der Kardiotoxizität. Sowohl 1 h als auch 24 h nach Applikation führt Caelyx[®] von allen Formulierungen zu den niedrigsten Dox-Konzentrationen im Herz (75 % weniger Dox als nach Applikation von FDox). Werden die Tiere mit P-Lyso-PC TSL (Dox) behandelt, werden in Leber, Herz und Milz mit FDox vergleichbare Dox-Konzentrationen gemessen. Dies könnte mit der Instabilität von P-Lyso-PC TSL (Dox) verbunden mit einer unspezifischen Freisetzung des Wirkstoffs in der Blutzirkulation zusammenhängen.

Muskulatur

In der hyperthermierten Muskulatur der Hintergliedmaße wurde nach Behandlung mit Caelyx[®] keine, nach Behandlung mit FDox die 2-fache Dox-Konzentration im Vergleich zur nicht hyperthermierten Muskulatur gemessen. Wie im Tumorgewebe ist dies auf gesteigerte Durchblutung zurückzuführen. Alle TSL (Dox) führen in der hyperthermierten Muskulatur zu erhöhten Dox-Konzentrationen. Somit ist die Freisetzung des Wirkstoffs aus TSL unabhängig vom Gewebe. Die hohen Standardabweichungen resultieren wahrscheinlich daraus, dass z.T. Proben aus Gewebe stammen, die während der HT nicht vollständig vom Wasserbad (42 °C) umgeben waren. Zur Vergleichbarkeit waren die Proben alle aus dem gleichen Muskel (*Musculus gastrocnemius*) entnommen worden.

Plasma

Nach 1 h regionaler HT und Applikation von PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox) beträgt die Dox Plasmakonzentration ~12 %, bei P-Lyso-PC (Dox) ~5 % der Anfangskonzentration. Mit dem Versuch kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, welcher Anteil des Dox gezielt, und welcher Anteil unspezifisch freigesetzt wurde und zu der niedrigen Plasmakonzentration nach 1h HT führte. Die langen Halbwertszeiten sowie hohe Dox-Anreicherungen im hyperthermierten Tumor nach PG₂-TSL (Dox) oder PG₃-TSL (Dox) Applikation deuten bei diesen Formulierungen auf eine überwiegend gezielte Freisetzung durch HT hin. Da die Halbwertszeit von P-Lyso-PC

(Dox) kürzer und die Dox-Anreicherung im hyperthermierten Tumor geringer war ist ein nach Applikation dieser Formulierung ein höherer Anteil unspezifisch freigesetzten Dox zu vermuten. Zur Diskussion steht auch, in wie weit das Blutpassagevolumen im Tumorgewebe ausreicht, um alle Liposomen innerhalb der 60 min HT in die hyperthermierte Region zu transportieren. In diesem Versuch wurde eine regionale HT angewandt. Die Therapeutische Studie hat jedoch gezeigt, dass eine lokale HT notwendig ist, um gesundes Gewebe zu schonen. Somit würde sich der hyperthermierte Anteil an die Gesamtkörpermasse weiter reduzieren. Das Passagevolumen von Blut pro Zeit durch das Tumorgefäßsystem beträgt im humanen Rektumkarzinom 60 ml/100 g/min (107). Innerhalb von 60 min passieren damit 3,6 l durch einen 100 g Tumor. Bei einem Tumor mit 200 g Gewicht würde theoretisch das gesamte Blutvolumen einmal den Tumor passieren, so dass auch die gesamte Dox-Menge freigesetzt würde.

Außerdem ist unklar welcher Anteil des freigesetzten Wirkstoffs aus den Blutgefäßen des Tumors ins Tumorgewebe diffundiert und welcher Anteil im Blutgefäßsystem verbleibt und in den Körperkreislauf zurück transportiert wird. Hier spielen zum einen Tumolvolumen, -vaskularisation, und -entität eine Rolle zum anderen aber auch Faktoren wie die Wirkstoffkonzentration während der lokalen Freisetzung sowie die Freisetzungsgeschwindigkeit. So könnte bei einer massiven Freisetzung eine Absättigung des Tumorgewebes mit vermehrtem Ausschwemmen des Wirkstoffes folgen. Denkbar wäre aber auch eine therapeutisch günstige tiefere Diffusion des Wirkstoffes ins Tumorgewebe durch kontinuierliche Zufuhr neu freigesetzten Wirkstoffs. Eine weitere Variable ist die Umverteilung des einmal freigesetzten Wirkstoffes zurück ins Plasma. Da mit Dox ein Wirkstoff mit starker Gewebeaffinität in den Versuchen eingesetzt wurde, ist diese wahrscheinlich zu vernachlässigen.

6.10 Tumorwachstumsstudien Maus und Ratte

Die Effizienz verschiedener TSL (Dox) wurde in der Maus in einem syngenem (BFS-1 Tumor) und zur weiteren Beurteilung im xenogenen Tumormodell (FaDu-Tumor) untersucht. Die Ergebnisse korrelieren weitestgehend mit den Ergebnissen der Anreicherung von Dox im Tumorgewebe nach HT-Behandlung. Die Doxorubicinkonzentration im BFS-1 Tumor von Mäusen, die mit FDox behandelt worden waren, betrug 1 h nach HT- Behandlung im hyperthermierten Tumor < 5 ng/mg Dox. Die einmalige Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Tumorwachstum. Alle PG-TSL (Dox) Formulierungen führten zu Dox-Konzentrationen um 15 ng/mg im hyperthermierten Tumorgewebe und damit einer etwa 3-fachen Dox-Konzentration verglichen mit FDox. In der therapeutischen Studie zeigte sich dies durch Wachstumsverzögerungen nach Behandlung mit PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) +

HT. Obwohl nach Applikation von PG₁-TSL (Dox) nach 1 h HT vergleichbare Dox-Konzentrationen im Tumorgewebe gemessen wurden, war das Tumorwachstum nach Behandlung mit PG₁-TSL (Dox) nicht verzögert. Dagegen wird die geringere therapeutische Effizienz der PG₁-TSL (Dox) im Tumormodell durch die kürzere HWZ und niedrigere AUC verglichen mit PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) gestützt. Da nach Applikation von Lyso-PC die höchsten Dox-Konzentrationen von >30 ng/mg im hyperthermierten Tumorgewebe gemessen wurden ist die hohe Remissionsrate (4/10) sowie Wachstumsverzögerung nach Behandlung mit dieser Formulierung zu erklären. Die verbesserte antitumorale Effizienz wurde jedoch von NW (ödematisierte, gerötete Gliedmaßen) begleitet. Diese können auf erhöhte Dox-Konzentrationen in der gesamten hyperthermierten Gliedmaße zurückgeführt werden. Da die Dox-Konzentrationen in den Tumoren der PG-TSL (Dox) behandelten Tieren um etwa die Hälfte geringer waren, ist zu vermuten, dass dies auch im nicht tumoralen Gewebe der hyperthermierten Gliedmaße der Mäuse der Fall war. Daher traten die NW bei diesen Tieren nicht auf.

Im xenogenen Tumormodell konnten die Ergebnisse reproduziert werden. Der FaDu Tumor war sensitiver gegenüber Dox, so dass auch die Behandlung mit PG₂-TSL (Dox) und PG₃-TSL (Dox) zu Remissionen (je 3 von 8) führten. Die höchste antitumorale Wirkung wurde wieder durch Behandlung mit P-Lyso-PC TSL (Dox) erreicht (5 von 8 Remissionen und längste Wachstumsverzögerung).

Im Gegensatz zur therapeutischen Effizienz in der Maus deuteten sowohl die längeren HWZ als auch die hohe Anreicherung von Dox im Tumorgewebe nach Behandlung mit PG-TSL (Dox) in der Ratte auf eine höhere therapeutische Effizienz dieser Formulierungen verglichen mit FDox und Lyso-PC TSL (Dox) hin.

Allerdings traten nach der Behandlung der Ratten mit PG-TSL (Dox) in Kombination regionalen HT (Wasserbad 42 °C) verstärkt die Nebenwirkungen auf, die bei einigen Mäusen im BFS-1 Tumormodell nach Behandlung mit Lyso-PC TSL (Dox) beobachtet worden waren. Da im Gegensatz zur Maus keine Heilung eintrat und das hyperthermierte Gewebe der Hintergliedmaße nekrotisch wurde, mussten die Ratten frühzeitig (nach etwa 10 Tagen) euthanasiert werden. Auch nach der Behandlung mit P-Lyso-PC TSL (Dox) trat in den hyperthermierten Gliedmaßen eine Rötung und Ödematisierung auf. Diese war im Vergleich zu den PG-TSL (Dox) behandelten Tieren jedoch nur geringgradig ausgeprägt. Die Gewebenekrosen deuten auf eine massive Freisetzung von Dox in der gesamten, mit Hyperthermie behandelten Gliedmaße hin. Um gesundes Gewebe zu schonen ist daher bei der Behandlung mit hohen Zytostatika-Dosen eine lokale HT anstelle von regionaler HT notwendig. Da für die tierexperimentellen Studien jedoch keine modernen Geräte zur präzisen Erwärmung des Tumorgewebes zur Verfügung

standen war die Anwendung lokaler HT zunächst problematisch. Mit einer Kaltlichtquelle und durch Kontrolle mit einer intratumoralen Messsonde konnte jedoch über einen Zeitraum von 60 min eine HT von 41 °C erreicht werden. Wurde diese mit nach Applikation von 5mg/kg TSL (Dox) durchgeführt wurden keine NW mehr an der hyperthermierten Gliedmaße beobachtet. Um eine Sättigung des Tumorgewebes mit Dox zu vermeiden wurde die Dosis auf 2 mg/kg Dox reduziert. Eine Pilotstudie, in der je 6 Tiere mit PG₃-TSL (Dox) oder P-Lyso-PC TSL (Dox) in Kombination mit lokaler HT behandelt unterstützte die Ergebnisse der PK- und Anreicherungsstudie. Die PK hatte längere HWZ und höhere AUC für PG-TSL (Dox) im Vergleich zu P-Lyso-PC TSL (Dox) gezeigt. In der Anreicherungsstudie wurde die 16-fache Dox-Konzentration in hyperthermierten Tumoren gemessen, eine nur 4-fache Anreicherung nach Applikation von P-Lyso-PC TSL (Dox). Dies erklärt die Tumorwachstumsverzögerung durch PG₃-TSL (Dox) bzw. Remissionen bei 3 Tieren trotz der Dosisreduktion. Dagegen zeigte sich keine gesteigerte therapeutische Effizienz nach Behandlung mit P-Lyso-PC TSL (Dox).

7 ZUSAMMENFASSUNG

Thermosensitive Liposomen in Kombination mit regionaler Hyperthermie sind ein vielversprechendes *drug targeting* und *drug delivery* System zur Behandlung solider Tumoren.

In dieser Arbeit wurden neuartige, auf synthetischen Phosphoglycerol-Lipiden basierende thermosensitive Liposomen mit dem enkapsuliertem Zytostatikum Doxorubicin (Dox) zunächst *in vitro* charakterisiert und insbesondere hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht. Anschließend wurde *in vivo* die Pharmakokinetik und Organverteilung, die Dox-Akkumulierung in Tumorgewebe nach Freisetzung durch regionale Hyperthermie, sowie die Effizienz in syngenem und xenogenem Tumormodellen in zwei verschiedenen Spezies (Ratte und Maus) evaluiert. In diesem Kontext war der Vergleich mit FDox, der nicht thermosensitiven Formulierung Caelyx[®] und der thermosensitiven Formulierung P-Lyso-PC TSL (Dox), welche derzeit in einer klinischen Phase-III Studie getestet wird, von besonderem Interesse.

DPPG_n-TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) wurden mit der Lipidfilm, Hydratations- und Extrusionsmethode sowie anschließendem Dox-Einschluss über einen transmembranen pH-Gradienten hergestellt. Die biophysikalische Charakterisierung erfolgte durch Photonenkorrelationsspektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Phosphatanalyse dynamische Differenzkalorimetrie, sowie Fluoreszenzspektroskopie (Doxorubicinbestimmung, Öffnungskinetik und temperaturabhängige Freisetzung) und wies chargenabhängig einheitliche Werte (Vesikelgröße, PDI, ζ-Potential, Dox-Konzentration, Lipidzusammensetzung) auf.

In vitro zeigte sich, dass die temperaturabhängige Dox-Freisetzung aus PG₂-TSL (Dox) Formulierungen in Plasma speziesabhängig ist. In Mausplasma war die Freisetzung bei niedrigeren Temperaturen, insbesondere bei 39 °C signifikant höher, als in Plasma anderer Spezies (Hamster, Ratte, Mensch). Dies hatte auch Auswirkungen auf das pharmakokinetische Verhalten der PG-TSL (Dox) *in vivo*. Während die Plasmakonzentrationskurven in der Maus biexponential waren und nur kurze, initiale HWZ der PG₂- und PG₃-TSL (Dox) (12,6 min und 13,8 min) gemessen wurden, waren die Plasmakonzentrationskurven in der Ratte linear mit verlängerten HWZ (PG₂-TSL (Dox) 118 min und PG₃-TSL (Dox) 110 min). Da die HWZ für die auf natürlichem PG₁ basierende Formulierung in der Maus nur 1,8 min betrug und vorherige Versuche *in vitro* ebenfalls auf eine geringere Stabilität gegenüber den PG₂- und PG₃-TSL (Dox) hindeuteten wurde diese Formulierung in der Ratte nicht weiter untersucht.

Für Lyso-PC (TSL) wurden sowohl in der Maus (10,2 min) als auch in der Ratte (4,5 min) gegenüber FDox nur geringfügig verlängerte HWZ gemessen. Mithilfe der *in-vitro*-Experimente wurde gezeigt, dass hierbei die verbesserte Liposomenstabilität von PG₂- und PG₃-TSL (Dox) gegenüber P-Lyso-PC TSL (Dox) maßgebend ist. Da die Liposomensuspensionen durch Applikation in den Blutkreislauf auch *in vivo* einer starken Verdünnung ausgesetzt werden, wurde der Einfluss einer Verdünnung auf das Wirkstoff – Lipid Verhältnis verschiedener Formulierungen untersucht. Während PG₂- und PG₃-TSL (Dox) nach Verdünnung der Liposomensuspension wie bei Caelyx® keine Veränderung des Wirkstoff – Lipid Verhältnisses aufwiesen, war dies nach Verdünnung von Lyso-PC TSL (Dox) deutlich erniedrigt. Die Reduktion des Wirkstoff – Lipid Verhältnisses nach Verdünnung der Lyso-PC TSL (Dox) weist auf einen Wirkstoffverlust in großen Volumina (Blutkreislauf) hin.

Der Unterschied zwischen PG-TSL (Dox) und P-Lyso-PC TSL (Dox) wurde in weiteren *in-vivo*-Experimenten bestätigt. Sowohl in der Maus als auch in der Ratte wurde im Tumormodell gezeigt, dass systemisch applizierte PG₂- und PG₃-TSL (Dox) in Kombination mit regionaler HT zu einer gezielten Dox-Anreicherung im hyperthermierten Tumorgewebe führen. Wie durch vorherige PK-Experimente erwartet, war in der Ratte die Dox-Anreicherung nach Behandlung mit PG₂- und PG₃-TSL (Dox) deutlich höher als nach Behandlung mit P-Lyso-PC TSL (Dox). In Tumorwachstumsstudien waren alle TSL (Dox) bezüglich der therapeutischen Effizienz gegenüber FDox und Caelyx® überlegen. Während in der Maus durch speziesspezifische Effekte die PG₂- und PG₃-TSL (Dox) noch den P-Lyso-PC TSL (Dox) unterlagen waren, zeigte sich in der Ratte sowohl eine höhere Anreicherung von Dox durch PG₂- und PG₃-TSL (Dox) gegenüber P-Lyso-PC TSL (Dox) als auch eine bessere antitumorale Wirkung. Da nach regionaler HT mittels Wasserbad eine massive Dox-Freisetzung in der Gliedmaße zu starken NW (Gewebenekrosen) führte, ist die lokale, ausschließlich auf das Tumorgewebe begrenzte HT für eine therapeutische Anwendung unerlässlich. Dies wurde durch eine therapeutische Tumorwachstumsstudie, in der lokale Hyperthermie mittels einer Lichtquelle appliziert wurde belegt.

Die Ergebnisse bezüglich der Stabilität *in vitro* als auch der therapeutischen Effizienz *in vivo* zeigen einen klaren Vorteil der PG₂- und PG₃-TSL (Dox) gegenüber Lyso-PC basierten TSL (Dox). Insgesamt bestanden nur marginale Unterschiede zwischen PG₂- und PG₃-TSL (Dox). Für eine klinische Anwendung stellen daher beide Formulierungen eine vielversprechende Alternative zu Lyso-PC basierten TSL dar.

8 SUMMARY

Novel thermosensitive liposomes for targeted therapy of solid tumours – characterization *in vitro* and *in vivo*

Thermosensitive liposomes in combination with regional mild hyperthermia are a promising drug targeting and drug delivery system for the treatment of solid tumours.

In this thesis novel thermosensitive liposomes, based on synthetic phosphoglycerol lipids and encapsulating the chemotherapeutic drug doxorubicin (Dox) were characterized *in vitro*, with a focus on the liposomal stability. Afterwards the plasma pharmacokinetics and tissue distribution, the Dox accumulation in tumour tissue after release by regional mild HT and the therapeutic efficiency in syngeneic and xenogeneic tumour models was evaluated in two different species (mouse and rat). In this context the comparison with free Dox, the non thermosensitive liposomal formulation Caelyx[®] and the thermosensitive liposomal formulation P-Lyso-PC TSL (Dox) that is currently tested in a clinical phase-III study was of particular interest.

DPPG_n-TSL (Dox) and Lyso-PC TSL (Dox) were prepared by the lipid film, hydration and extrusion method followed by encapsulation of Dox by a transmembrane pH gradient. The biophysical characterization was carried out by dynamic light scattering, thin layer chromatography, phosphate analysis, differential scanning calorimetry as well as fluorescence spectroscopy (quantification of Dox, time and temperature dependent release) and showed high batch-to-batch consistency (vesicle size, PDI, ζ -potential, Dox-concentration, lipid composition).

In vitro it could be demonstrated that the temperature dependent Dox release of PG₂-TSL (Dox) formulations in plasma is species dependent. In mouse plasma Dox release was significantly higher at lower temperatures, especially at 39 °C than in plasma of other species (hamster, rat, human being). This also influenced the pharmacokinetic profile of PG-TSL (Dox) *in vivo*. While the plasma concentration curves in the mouse were biexponential and only short initial half-lives of PG₂- and PG₃-TSL (Dox) (12.6 min and 13.8 min) were measured, the plasma concentration curves in the rat were linear with prolonged half-lives (PG₂-TSL (Dox) 118 min; PG₃-TSL (Dox) 110 min). Because the half-life of the formulation based on the natural occurring lipid PG₁ was only 1.8 min in the mouse and previous *in vitro* studies also showed a lower stability this formulation compared to PG₂- and PG₃-TSL (Dox) was excluded from the study in rats.

For P-Lyso-PC TSL (Dox) in the mouse (10.2 min) as well as in the rat (4.5 min) only slightly prolonged half-lives were measured. With additional *in vitro* experiments it was

demonstrated that for this the improved stability of PG₂- and PG₃-TSL (Dox) compared to P-Lyso-PC TSL (Dox) is decisive. As the liposomal suspensions are exposed to a massive dilution due to intravenous application into the blood circulation, the influence of dilution on the drug: lipid ratio of different formulations was examined. While the drug: lipid ratio of PG₂- and PG₃-TSL (Dox) as well as of Caelyx[®] was not changed after dilution and dialysis, the drug:lipid ratio of P-Lyso-PC TSL (Dox) was significantly decreased. The reduction of the drug:lipid ratio after dilution of P-Lyso-PC TSL (Dox) indicates an initial drug leakage after dilution in high volumes (blood circulation).

The difference between PG-TSL (Dox) and P-Lyso-PC TSL (Dox) was confirmed in further in vitro studies. Both in the mouse and in the rat it could be demonstrated that intravenous applied PG₂- and PG₃-TSL (Dox) in combination with regional mild hyperthermia leads to a targeted accumulation of Dox inside heated tumour tissue. As expected from the pharmacokinetic experiments, the accumulation after treatment with PG₂- and PG₃-TSL (Dox) considerably increased compared to the accumulation after treatment with P-Lyso-PC TSL. In all tumour growth studies TSL (Dox) were superior to FDox and the non thermosensitive formulation Caelyx[®], regarding the therapeutic efficacy. While in the mouse PG₂- and PG₃-TSL (Dox) were inferior to P-Lyso-PC TSL (Dox) due to the species specific effects, in the rat a higher Dox accumulation by PG₂- and PG₃-TSL (Dox) compared to P-Lyso-PC TSL (Dox) as well as a superior antitumoral effect was shown. Nevertheless regional hyperthermia of the hind leg applied with a water bath led to necrosis of the whole heated tissue because of massive Dox release in the leg. Therefore local hyperthermia limited to tumour tissue is essential for a clinical treatment with thermosensitive liposomes. This has been proven by a tumour growth study, where heat was applied locally by a light source.

The results regarding the stability in vitro as well as the therapeutic efficacy in vivo demonstrate an obvious advantage of PG₂- and PG₃-TSL (Dox) compared to P-Lyso-PC TSL (Dox). However, only marginal differences were found between PG₂- and PG₃-TSL (Dox). Therefore both formulations are a promising alternative to P-Lyso-PC TSL (Dox) for a clinical usage.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hossann M, Wiggenhorn M, Schwerdt A, Wachholz K, Teichert N, Eibl H, et al. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Oct;1768(10):2491-9.
2. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul*. 2001;41:189-207.
3. Bangham AD, Horne RW. NEGATIVE STAINING OF PHOSPHOLIPIDS AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY SURFACE-ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN THE ELECTRON MICROSCOPE. *J Mol Biol*. 1964 May;8:660-8.
4. Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res*. 1968 May;9(3):310-8.
5. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(21):7413-7.
6. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11307-11.
7. Veelken H, Jesuiter H, Mackensen A, Kulmburg P, Schultze J, Rosenthal F, et al. Primary fibroblasts from human adults as target cells for ex vivo transfection and gene therapy. *Hum Gene Ther*. 1994 Oct;5(10):1203-10.
8. Ren H, Boulikas T, Lundstrom K, Soling A, Warnke PC, Rainov NG. Immunogene therapy of recurrent glioblastoma multiforme with a liposomally encapsulated replication-incompetent Semliki forest virus vector carrying the human interleukin-12 gene--a phase I/II clinical protocol. *J Neurooncol*. 2003 Aug-Sep;64(1-2):147-54.
9. Rudin CM, Marshall JL, Huang CH, Kindler HL, Zhang C, Kumar D, et al. Delivery of a liposomal c-raf-1 antisense oligonucleotide by weekly bolus dosing in patients with advanced solid tumors: a phase I study. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 1;10(21):7244-51.
10. Cusi MG. Applications of influenza virosomes as a delivery system. *Hum Vaccin*. 2006 Jan-Feb;2(1):1-7.
11. Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM, et al. The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine*. 2005 Jul 8;23 Suppl 1:S26-38.
12. Morita K, Zywiets F, Kakinuma K, Tanaka R, Katoh M. Efficacy of doxorubicin thermosensitive liposomes (40 degrees C) and local hyperthermia on rat rhabdomyosarcoma. *Oncol Rep*. 2008 Aug;20(2):365-72.
13. Ishida O, Maruyama K, Yanagie H, Eriguchi M, Iwatsuru M. Targeting chemotherapy to solid tumors with long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Jpn J Cancer Res*. 2000 Jan;91(1):118-26.
14. Patel AJ, Lazdunski M, Honore E. Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Aug;13(4):422-8.
15. Kung C. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):647-54.
16. ElBayoumi TA, Torchilin VP. Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 15;15(6):1973-80.
17. Drummond DC, Hong K, Park JW, Benz CC, Kirpotin DB. Liposome targeting to tumors using vitamin and growth factor receptors. *Vitam Horm*. 2000;60:285-332.
18. Yamada A, Taniguchi Y, Kawano K, Honda T, Hattori Y, Maitani Y. Design of folate-linked liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 15;14(24):8161-8.
19. Li X, Ding L, Xu Y, Wang Y, Ping Q. Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. *Int J Pharm*. 2009 May 21;373(1-2):116-23.

20. Hashida N, Ohguro N, Yamazaki N, Arakawa Y, Oiki E, Mashimo H, et al. High-efficacy site-directed drug delivery system using sialyl-Lewis X conjugated liposome. *Exp Eye Res.* 2008 Jan;86(1):138-49.
21. Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.* 2006 Jul 1;66(13):6732-40.
22. Huth U, Wieschollek A, Garini Y, Schubert R, Peschka-Suss R. Fourier transformed spectral bio-imaging for studying the intracellular fate of liposomes. *Cytometry A.* 2004 Jan;57(1):10-21.
23. Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science.* 1978 Dec 22;202(4374):1290-3.
24. de Smet M, Langereis S, van den Bosch S, Grull H. Temperature-sensitive liposomes for doxorubicin delivery under MRI guidance. *J Control Release.* 2010 Apr 2;143(1):120-7.
25. Gaber MH, Hong K, Huang SK, Papahadjopoulos D. Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharm Res.* 1995 Oct;12(10):1407-16.
26. Unezaki S, Maruyama K, Takahashi N, Koyama M, Yuda T, Suginaka A, et al. Enhanced delivery and antitumor activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethylene glycol in combination with local hyperthermia. *Pharm Res.* 1994 Aug;11(8):1180-5.
27. Mills JK, Needham D. Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Oct 15;1716(2):77-96.
28. Sandstrom MC, Ickenstein LM, Mayer LD, Edwards K. Effects of lipid segregation and lysolipid dissociation on drug release from thermosensitive liposomes. *J Control Release.* 2005 Sep 20;107(1):131-42.
29. Ickenstein LM, Arfvidsson MC, Needham D, Mayer LD, Edwards K. Disc formation in cholesterol-free liposomes during phase transition. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Aug 7;1614(2):135-8.
30. Schagon O. Variation der biopharmazeutischen Eigenschaften durch 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphat-oligoglycerin [Inaugural]: TU Braunschweig; 1997.
31. Yan X, Scherphof GL, Kamps JA. Liposome opsonization. *J Liposome Res.* 2005;15(1-2):109-39.
32. Koning GA, Eggermont AM, Lindner LH, ten Hagen TL. Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors. *Pharm Res.* 2010 Aug;27(8):1750-4.
33. Jones K. MEN-10755. Menarini. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003 Dec;4(12):1473-8.
34. Sinha BK, Trush MA, Kennedy KA, Mimnaugh EG. Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Res.* 1984 Jul;44(7):2892-6.
35. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999 Apr 1;57(7):727-41.
36. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Jr., Von Hoff AL, Rozenzweig M, et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 1979 Nov;91(5):710-7.
37. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer.* 2003 Jun 1;97(11):2869-79.
38. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(6):431-44.
39. Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity

profiles. *Drug Saf.* 2001;24(12):903-20.

40. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11460-4.

41. Lorusso D, Naldini A, Testa A, D'Agostino G, Scambia G, Ferrandina G. Phase II study of pegylated liposomal doxorubicin in heavily pretreated epithelial ovarian cancer patients. May a new treatment schedule improve toxicity profile? *Oncology.* 2004;67(3-4):243-9.

42. Lotem M, Hubert A, Lyass O, Goldenhersh MA, Ingber A, Peretz T, et al. Skin toxic effects of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin. *Arch Dermatol.* 2000 Dec;136(12):1475-80.

43. Nagore E, Insa A, Sanmartin O. Antineoplastic therapy-induced palmar plantar erythrodysesthesia ('hand-foot') syndrome. Incidence, recognition and management. *Am J Clin Dermatol.* 2000 Jul-Aug;1(4):225-34.

44. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Jan(262):3-11.

45. Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, et al. Neoadjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):561-70.

46. Dewhirst MW, Ozimek EJ, Gross J, Cetas TC. Will hyperthermia conquer the elusive hypoxic cell? Implications of heat effects on tumor and normal-tissue microcirculation. *Radiology.* 1980 Dec;137(3):811-7.

47. Urano M, Rice LC, Montoya V. Studies on fractionated hyperthermia in experimental animal systems II. Response of murine tumors to two or more doses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1982 Feb;8(2):227-33.

48. Leopold KA, Dewhirst M, Samulski T, Harrelson J, Tucker JA, George SL, et al. Relationships among tumor temperature, treatment time, and histopathological outcome using preoperative hyperthermia with radiation in soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;22(5):989-98.

49. Milani V, Noessner E. Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Mar;55(3):312-9.

50. Kuperberg G, Ellis J, Marcinkiewicz J, Chain BM. Temperature-induced stress abrogates co-stimulatory function in antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 1991 Nov;21(11):2791-5.

51. Nathanson SD, Haas GP, Bobrowski R, Lee M, Tilley B, Schultz L, et al. Regional lymph node and pulmonary metastases after local hyperthermia of melanomas in C57BL/6 mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987 Feb;13(2):243-9.

52. Seegenschmiedt MH, Feldmann HJ, Wust P, Molls M. Hyperthermia--its actual role in radiation oncology. Part IV: Thermo-radiotherapy for malignant brain tumors. *Strahlenther Onkol.* 1995 Oct;171(10):560-72.

53. Song CW, Shakil A, Osborn JL, Iwata K. Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures. 1996. *Int J Hyperthermia.* 2009 Mar;25(2):91-5.

54. Griffin RJ, Corry PM. Commentary on classic paper in hyperthermic oncology 'Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures' by CW Song et al., 1996. *Int J Hyperthermia.* 2009 Mar;25(2):96-8.

55. Horsman MR, Overgaard J. Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2007 Aug;19(6):418-26.

56. Roots R, Smith KC. On the nature of the oxygen effect on x-ray-induced DNA single-strand breaks in mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1974 Nov;26(5):467-80.

57. Matsumoto H, Hayashi S, Shioura H, Ohtsubo T, Kitai R, Ohnishi K, et al. Suppression of heat-induced HSF activation by CDDP in human glioblastoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998 Jul 1;41(4):915-20.

58. Engin K. Hyperthermia in cancer treatment (I). *Neoplasma.* 1994;41(5):269-76.

59. Engin K. Biological rationale for hyperthermia in cancer treatment (II). *Neoplasma*. 1994;41(5):277-83.
60. Urano M, Kuroda M, Nishimura Y. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia*. 1999 Mar-Apr;15(2):79-107.
61. Kampinga HH. Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field. *Int J Hyperthermia*. 2006 May;22(3):191-6.
62. Wang T, Hossann M, Reinl HM, Peller M, Eibl H, Reiser M, et al. In vitro characterization of phosphatidylglyceroglycerol-based thermosensitive liposomes with encapsulated 1H MR T1-shortening gadodiamide. *Contrast Media Mol Imaging*. 2008 Jan;3(1):19-26.
63. Mayer LD, Bally MB, Cullis PR. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochim Biophys Acta*. 1986 May 9;857(1):123-6.
64. Mayer LD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem Phys Lipids*. 1986 Jun-Jul;40(2-4):333-45.
65. Eibl H, Lands WE. A new, sensitive determination of phosphate. *Anal Biochem*. 1969 Jul;30(1):51-7.
66. Cullis PR, Hope MJ, Bally MB, Madden TD, Mayer LD, Fenske DB. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Sep 8;1331(2):187-211.
67. Schafer CB, Bartzsch OM, Feldmann HJ, Molls M, Allgauer M. [Ultrasound volumetry of cervical lymph nodes during radiotherapy as a method of therapy monitoring]. *Ultraschall Med*. 1996 Dec;17(6):289-94.
68. Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, et al. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res*. 2000 Dec 15;60(24):6950-7.
69. Banno B, Ickenstein LM, Chiu GN, Bally MB, Thewalt J, Brief E, et al. The functional roles of poly(ethylene glycol)-lipid and lysolipid in the drug retention and release from lysolipid-containing thermosensitive liposomes in vitro and in vivo. *J Pharm Sci*. 2010 May;99(5):2295-308.
70. Magin RL, Niesman MR. Temperature-dependent permeability of large unilamellar liposomes. *Chem Phys Lipids*. 1984 Mar;34(3):245-56.
71. Scherphof G, Roerdink F, Waite M, Parks J. Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Aug 17;542(2):296-307.
72. Allen TM, Cleland LG. Serum-induced leakage of liposome contents. *Biochim Biophys Acta*. 1980 Apr 10;597(2):418-26.
73. Mannel DN, Rosenstreich DL, Mergenhagen SE. Mechanism of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis: requirement for lipopolysaccharide-sensitive lymphoreticular cells. *Infect Immun*. 1979 May;24(2):573-6.
74. Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 1;11(19 Pt 1):6944-9.
75. Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Dec 31;53(3):285-305.
76. Chen Q, Tong S, Dewhirst MW, Yuan F. Targeting tumor microvessels using doxorubicin encapsulated in a novel thermosensitive liposome. *Mol Cancer Ther*. 2004 Oct;3(10):1311-7.
77. Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H, Teichert N, Schmitt-Sody M, Issels RD, et al. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 15;10(6):2168-78.
78. Anderson M, Omri A. The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Deliv*. 2004 Jan-Feb;11(1):33-9.
79. Hernandez-Caselles T, Villalain J, Gomez-Fernandez JC. Influence of liposome

charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. *Mol Cell Biochem.* 1993 Mar 24;120(2):119-26.

80. Amin K, Wasan KM, Albrecht RM, Heath TD. Cell association of liposomes with high fluid anionic phospholipid content is mediated specifically by LDL and its receptor, LDLr. *J Pharm Sci.* 2002 May;91(5):1233-44.

81. Hosokawa T, Sami M, Kato Y, Hayakawa E. Alteration in the temperature-dependent content release property of thermosensitive liposomes in plasma. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2003 Nov;51(11):1227-32.

82. Schenkman S, Araujo PS, Dijkman R, Quina FH, Chaimovich H. Effects of temperature and lipid composition on the serum albumin-induced aggregation and fusion of small unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Dec 21;649(3):633-47.

83. Shabbits JA, Chiu GN, Mayer LD. Development of an in vitro drug release assay that accurately predicts in vivo drug retention for liposome-based delivery systems. *J Control Release.* 2002 Dec 5;84(3):161-70.

84. Guo LS, Hamilton RL, Goerke J, Weinstein JN, Havel RJ. Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res.* 1980 Nov;21(8):993-1003.

85. Fattal DR, Ben-Shaul A. Mean-field calculations of chain packing and conformational statistics in lipid bilayers: comparison with experiments and molecular dynamics studies. *Biophys J.* 1994 Sep;67(3):985-95.

86. Shibata S, Ochi A, Mori K. Liposomes as carriers of cisplatin into the central nervous system--experiments with 9L gliomas in rats. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1990 Apr;30(4):242-5.

87. Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep.* 2002 Apr;22(2):129-50.

88. Hauck ML, LaRue SM, Petros WP, Poulson JM, Yu D, Spasojevic I, et al. Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 1;12(13):4004-10.

89. Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010 Jan;13(1):111-23.

90. Ishida T, Harashima H, Kiwada H. Liposome clearance. *Biosci Rep.* 2002 Apr;22(2):197-224.

91. de Kruyff B, van Dijk PW, Godlbach RW, Demel RA, van Deenen LL. Influence of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane-bound enzymes in *Acholeplasma laidlawii*. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Dec 22;330(3):269-82.

92. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev.* 1999 Dec;51(4):691-743.

93. Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry.* 1998 Sep 15;37(37):12875-83.

94. Lee KD, Hong K, Papahadjopoulos D. Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Jan 31;1103(2):185-97.

95. Cui J, Li C, Guo W, Li Y, Wang C, Zhang L, et al. Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations: is AUC predictive for toxicity and efficacy? *J Control Release.* 2007 Apr 2;118(2):204-15.

96. Soloman R, Gabizon AA. Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2008 Feb;8(1):21-32.

97. Lee RJ, Wang S, Turk MJ, Low PS. The effects of pH and intraliposomal buffer strength on the rate of liposome content release and intracellular drug delivery. *Biosci Rep.* 1998 Apr;18(2):69-78.

98. Shibata H, Saito H, Yomota C, Kawanishi T. Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie.* 2010 Apr;65(4):251-3.

99. Wu NZ, Da D, Rudoll TL, Needham D, Whorton AR, Dewhirst MW. Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of Stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res.* 1993 Aug 15;53(16):3765-70.
100. Maeda N, Takeuchi Y, Takada M, Sadzuka Y, Namba Y, Oku N. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome. *J Control Release.* 2004 Nov 5;100(1):41-52.
101. Drummond DC, Noble CO, Hayes ME, Park JW, Kirpotin DB. Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. *J Pharm Sci.* 2008 Nov;97(11):4696-740.
102. Hossann M, Wang T, Wiggenhorn M, Schmidt R, Zengerle A, Winter G, et al. Size of thermosensitive liposomes influences content release. *J Control Release.* 2010 Aug 19.
103. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):567-83.
104. Horsman MR. Tissue physiology and the response to heat. *Int J Hyperthermia.* 2006 May;22(3):197-203.
105. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(5):419-36.
106. Papahadjopoulos D, Gabizon A. Liposomes designed to avoid the reticuloendothelial system. *Prog Clin Biol Res.* 1990;343:85-93.
107. Sahani DV, Kalva SP, Hamberg LM, Hahn PF, Willett CG, Saini S, et al. Assessing tumor perfusion and treatment response in rectal cancer with multisection CT: initial observations. *Radiology.* 2005 Mar;234(3):785-92.

10 ANHANG

10.1 Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under the curve; Fläche unter der Plasmaspiegelkurve
BFS-1	Methylcholanthrene A induziertes Fibrosarkom
BN	Brown Norway
BN175	Syngenes Fibrosarkom der Brown Norway Ratte
CF	Carboxyfluoreszein
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxorubicin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DPPG ₂	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglycerol
DPPG ₃	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglyceroglycerol
DSC	differential scanning calorimetry
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSPE-PEG ₂₀₀₀	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylene-glycol)-2000]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
EPR-Effect	Enhanced permeability and retention effect
Ex	Extinktion
FaDu	Humanes Plattenepithelkarzinom
FDox	freies Doxorubicin
FKS	fetales Kälberserum
g	Zentrifugalbeschleunigung
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society of Laboratory Animal Science
h	Stunden
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethanesulfonsäure)
HN-Puffer	Hepes-NaCl Puffer
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSPC	high purity hydrogenated soy phosphocholin

HT	Hyperthermie
HWZ $T_{1/2}$	Halbwertszeit
i.p	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
LUV	large unilamellar vesicle
min	Minuten
MLV	multilamellar Vesicle
MPEG	Methoxy-Polyethylenglykol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchloridlösung
NMRI	Naval Medical Research Institute
NTSL	Nicht Thermosensitive Liposomen
NW	Nebenwirkung(en)
ÖK	zeitabhängige Öffnungskinetik
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDI	Polydispersionsindex
PEG	Polyethylenglykol
PK	Pharmakokinetik
P-Lyso-PC	1-Palmitoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PPE	Palmar Plantare Erythroästhesie
RES	Retikulo-Endotheliales System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s.c.	subkutan
S-Lyso-PC	1-Stearoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
sn	stereospezifische Nummerierung; eine chemische Nomenklatur
SUV	small unilamellar vesicle
T _m	Phasenumwandlungstemperatur
TÖK	temperaturabhängige Öffnungskinetik
TSL	thermosensitive Liposomen
v/v	Verhältnis (Volumen/Volumen)
WST-1	water-soluble tetrazolium salt

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Thermotrope Phasenzustände	8
Tabelle 2 Phasenumwandlungstemperaturen ausgesuchter Phospholipide	9
Tabelle 3 Passives und aktives drug targeting	11
Tabelle 4 Passive und aktive drug delivery Systeme	11
Tabelle 5 Physikalische Eigenschaften von Dox	18
Tabelle 6 Pharmakokinetische Eigenschaften von Dox (Mensch)	18
Tabelle 7 Anwendungsgebiete zugelassener Dox-Präparate	19
Tabelle 8 Onkologische H	26
Tabelle 9 Verwendete Lipide zur Liposomenherstellung	28
Tabelle 10 Chemikalien und Lösungsmittel	29
Tabelle 11 Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 12 Plasmen	31
Tabelle 13 Verwendete Zelllinien für Tiermodelle und Zytotoxizitätstest	31
Tabelle 14 Verwendete Medien und Reagenzien in der Zellkultur	32
Tabelle 15 Versuchstiere.....	33
Tabelle 16 Arzneimittel, die in den Tierversuchen eingesetzt wurden.....	33
Tabelle 17 Verbrauchsmaterial bei der Liposomenherstellung	34
Tabelle 18 Verbrauchsmaterial Zellkultur	34
Tabelle 19 Verbrauchsmaterial Tierversuche	34
Tabelle 20 Verwendete Geräte für Liposomenherstellung	35
Tabelle 21 Verwendete Geräte für Liposomencharakterisierung	35
Tabelle 22 Verwendete Geräte für Dox-Nachweis aus Plasma, Tumoren und Organen ..	36
Tabelle 23 Verwendete Geräte in der Zellkultur	37
Tabelle 24 Verwendete Geräte bei den Tierversuchen	37
Tabelle 25 Verwendete Softwareprogramme.....	38
Tabelle 26 Physikalische Bedingungen bei der Herstellung der Lipidfilme.....	39
Tabelle 27 Pharmakokinetik Maus	55
Tabelle 28 Pharmakokinetik Ratte; n = 3 pro Zeitpunkt.....	57
Tabelle 29 TSL (Dox) für Messung der temperaturabhängigen Dox-Freisetzung	62
Tabelle 30 Ergebnisse der Charakterisierung der Lyso-PC TSL (Dox).....	67
Tabelle 31 Berechnete Öffnungskonstanten von P- und S-Lyso-PC TSL (Dox).....	69
Tabelle 32 Vergleich der relativen Überlebensrate [%].....	75
Tabelle 33 IC ₅₀ -Werte [μM].....	75
Tabelle 34 Halbwertszeit T _{1/2α} (h) + T _{1/2β} (h), AUC (h*μM) und C ₀ (μM)	80
Tabelle 35 AUC _{0-60min} (ng*min/μl); n = 3	91

Tabelle 36 $T_{1/2}$ (min) nach linearer Regression.....	91
--	----

10.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktur eines Liposoms	3
Abbildung 2 Aufbau der Liposomenmembran	6
Abbildung 3 Aggregatstrukturen von Phospholipiden in Abhängigkeit von ihren Packingparametern;.....	7
Abbildung 4 Packungsparameter von Phospholipiden	8
Abbildung 5 Strukturformeln der Phospholipide DPPC und DSPC.....	12
Abbildung 6 Strukturformeln der Lysolipide.....	13
Abbildung 7 Strukturformel DSPE-PEG ₂₀₀₀	14
Abbildung 8 Strukturformeln DPPG _n	14
Abbildung 9 Strukturformel Doxorubicin.....	17
Abbildung 10 Dialyse der Liposomenlösung nach der Verdünnung Zellkultur	46
Abbildung 11 Aufbau HT der Zellen im Wasserbad	48
Abbildung 12 NADH abhängige Spaltung des Farbreagens WST-1.....	49
Abbildung 13 Skizze HT mit Wasserbad im Tiermodell;.....	52
Abbildung 14 Foto HT mit Wasserbad im Tiermodell	53
Abbildung 15 Foto; Aufbau Tiermodell; HT mit Kaltlichtquelle	54
Abbildung 16 Größe und PDI verwendeter Liposomenchargen.....	59
Abbildung 17 Wirkstoff-Lipid Verhältnis verwendeter Liposomenchargen	60
Abbildung 18 Zetapotential verwendeter Liposomenchargen	60
Abbildung 19 Repräsentative Dünnschichtchromatographie.....	61
Abbildung 20 Phasenumwandlungstemperatur verwendeter Chargen	61
Abbildung 21 Dox-Freisetzung nach 60 min Inkubation.....	63
Abbildung 22 Dox-Freisetzungsprofil von PG ₂ -TSL (Dox).....	64
Abbildung 23 Vergleich der Dox-Freisetzung aus PG ₂ -TSL (Dox)	64
Abbildung 24 Dox-Freisetzung aus DPPC:DSPC:DPPG ₂ 70:20:10 (m/m).....	65
Abbildung 25 Dox-Freisetzungsprofil von DPPC:DSPC:DPPG ₂ 70:20:10 (m/m).....	66
Abbildung 26 Dox-Freisetzung aus DPPC:DSPC:DPPG ₂ 70:20:10 (m/m).....	66
Abbildung 27 Einschlusskinetik von S- und P-Lyso-PC TSL (Dox) bei 38 °C	67
Abbildung 28 Dox-Freisetzung aus P-Lyso-PC TSL (Dox)	68
Abbildung 29 Dox-Freisetzung aus S-Lyso-PC TSL (Dox)	68
Abbildung 30 Vergleich der Öffnungskonstanten von P- und S-Lyso-PC TSL (Dox)....	69
Abbildung 31 Vergleich der temperaturabhängigen Dox-Freisetzung von P- und S- Lyso-PC TSL (Dox)	70
Abbildung 32 Wirkstoff-Lipid Verhältnis	71
Abbildung 33 Dosis-Wirkungskurve nach 15 min Inkubation bei 37 °C	73

Abbildung 34 Dosis-Wirkungskurve nach 15 min Inkubation bei 42 °C	73
Abbildung 35 Dosis-Wirkungskurve nach 60 min Inkubation bei 37 °C	74
Abbildung 36 Dosis-Wirkungskurve nach 60 min Inkubation bei 42 °C	74
Abbildung 37 Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von P-Lyso-PC TSL (Dox) und PG ₂ -TSL (Dox).....	75
Abbildung 38 Histologisches Präparat BFS-1 Tumor; He-Färbung	76
Abbildung 39 Histologisches Präparat FaDu-Tumor; He-Färbung	77
Abbildung 40 Histologisches Präparat BN175 -Tumor; He-Färbung.....	77
Abbildung 41 Dox-Plasmakonzentrationskurve bis 24 h nach Applikation.....	78
Abbildung 42 Dox-Plasmakonzentrationskurve bis 1 h nach Applikation.....	79
Abbildung 43 Vergleich der Dox-Konzentration im Plasma.....	79
Abbildung 44 Dox-Konzentrationen im Herz.....	81
Abbildung 45 Dox-Konzentrationen im Herz.....	81
Abbildung 46 Dox-Konzentrationen in der Leber	82
Abbildung 47 Dox-Konzentrationen in der Leber	83
Abbildung 48 Dox-Konzentrationen in der Milz.....	84
Abbildung 49 Dox-Konzentrationen in der Milz;.....	84
Abbildung 50 Dox-Konzentrationen im hyperthermierten und nicht hyperthermierten Tumor	85
Abbildung 51 Anreicherungsfaktor von Dox im hyperthermierten (1h) im Vergleich zum nicht hyperthermierten Tumorgewebe.....	86
Abbildung 52 Dox-Konzentrationen im Herz.....	87
Abbildung 53 Dox-Konzentrationen in Milz (A) und Leber (B).....	87
Abbildung 54 Linke Hintergliedmaße: 3 Tage nach Behandlung mit Lyso-PC TSL (Dox)	88
Abbildung 55 Tumorwachstumsstudie syngener BFS-1 Tumor.....	89
Abbildung 56 Tumorwachstumsstudie xenogener FaDu Tumor	90
Abbildung 57 Pharmakokinetik Ratte; Anteil des hyperthermierten Gewebes am Gesamtgewicht des Versuchstieres	90
Abbildung 58 PK Caelyx [®] ; bei 38 °C; Dosis: 5mg/kg; n = 3	92
Abbildung 59 PK PG ₂ -TSL (Dox); bei 38 °C (blau) und 42 °C (rot).....	92
Abbildung 60 PK PG ₃ -TSL (Dox); bei 38 °C (blau) und 42 °C (rot).....	93
Abbildung 61 PK Lyso-PC TSL (Dox); bei 38 °C (blau) und 42 °C (rot).....	93
Abbildung 62 Vergleich PK PG ₂ -TSL (Dox) und PG ₃ -TSL (Dox) bei 38 °C	93
Abbildung 63 Vergleich PK PG ₂ -TSL (Dox) und PG ₃ -TSL (Dox) bei 42 °C.....	94
Abbildung 64 Vergleich PK PG ₂ -TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) bei 38 °C	94
Abbildung 65 Vergleich PK PG ₂ -TSL (Dox) und Lyso-PC TSL (Dox) bei 42 °C	94
Abbildung 66 Anreicherung von Dox.....	96

Abbildung 67 Anreicherungsfaktor	96
Abbildung 68 Theoretischer Anteil FDox (grau) und liposomales Dox (schwarz) am Gesamt-Dox im Tumorgewebe	97
Abbildung 69 Dox-Konzentrationen in der Milz nach 60 min HT	98
Abbildung 70 Dox-Konzentrationen in der Leber nach 60 min HT	98
Abbildung 71 Dox-Konzentrationen in der Gliedmaßenmuskulatur	99
Abbildung 72 Dox-Konzentrationen im Herz nach 60 min HT.....	100
Abbildung 73 Dox-Plasmakonzentration nach 1 h bzw. 24 h (Caelyx [®]) nach HT- Behandlung.....	101
Abbildung 74 Tumorwachstumsstudie BN175-Fibrosarkom	103
Abbildung 75 Intratumorale Temperatur während lokaler HT mittels Kaltlichtquelle...	104
Abbildung 76 Tumorwachstumsstudie	105
Abbildung 77 Dox-Freisetzung nach 15 min oder 60 min Inkubation in FCS	113

10.4 Veröffentlichungen

Paper

MARTIN HOSSANN, TUNGTE WANG, MICHAEL WIGGENHORN, REBECCA SCHMIDT, ANJA ZENGERLE, GERHARD WINTER, HANSJÖRG EIBL, MICHAEL PELLER, MAXIMILIAN REISER, ROLF D. ISSELS, LARS H. LINDNER

Size of thermosensitive liposomes influences content release

Journal of Controlled Release; 2010

Vorträge

R. SCHMIDT, M. HOSSANN, A. ZENGERLE, M. OGRIS, G. KONING,

R. ISSELS, L.H. LINDNER

Species dependent doxorubicin release of thermosensitive liposomes in vitro

ESHO 2009; 25th Annual Meeting of the European Society for Hyperthermic Oncology

Verona, Italy June 4 - 6, 2009

R. SCHMIDT, M. HOSSANN, A. ZENGERLE, M. OGRIS, G. KONING, R. ISSELS,

L.H. LINDNER

New Thermosensitive liposomes - a smart method of drug targeting

20th Mountain/Sea Liposome Workshop

Ameland, Niederlande 27.09.-3.10.2009

R. SCHMIDT, M. HOSSANN, K. WACHHOLZ, A. ZENGERLE, M. OGRIS, R.

ISSELS, G.A. KONING, L.H. LINDNER

Thermosensitive Liposomes (TSL) for drug targeting - proof of concept in vivo-

ESHO 2010; 26th Annual Meeting of the European Society for Hyperthermic Oncology

Rotterdam, The Netherlands May 20 - 22, 2010

Posterpräsentation

SCHMIDT, M. HOSSANN, K. WACHHOLZ, A. ZENGERLE, M. OGRIS, R. ISSELS ,

G.A. KONING, L.H. LINDNER

Accumulation of doxorubicin in tumor tissue using thermosensitive liposomes in combination with mild hyperthermia – in vivo study in rats

Wissenschaftliches Symposium der Medizinische Klinik und Poliklinik III vom

23.-24.07.2010 Herrsching