

6 Diskussion

Taxol® als antineoplastische Substanz hat uns besonders interessiert, weil es 1. eine sehr hohe Antitumor- Aktivität gegen viele Tumortypen besitzt und es 2. wenig vorklinische Daten bzw. Vorversuche in der Therapie von Lebertumoren mit Taxol® gibt.

Taxol® ist ein natürliches zyklisches Diterpen, das aus der Rinde des *Taxus brevifolia* gewonnen wird. Taxol® wird mittlerweile erfolgreich in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt.

Taxol® wird in der primären Therapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem, metastasiertem Ovarialkarzinom (Responstrate 16-48 %), Mammakarzinom (Responstrate von 25-64,5 %) und bei verschiedenen anderen Tumortypen, wie z.B. Zervixkarzinom, Prostata- und Blasenkarzinom, Magen- und Pankreaskarzinom seit Jahren erfolgreich eingesetzt. [1].

Bei der Behandlung des rezidivierenden und platinresistenten bzw. refraktäre Ovarialkarzinom gehört Taxol® zweifellos zu den wirksamsten Zytostatika [1].

In der Behandlung des HCC gibt es sehr wenige Untersuchungen mit Taxol®.

Spencer and Fauds, 1994 [5] konnten in vitro- und in vivo- Versuchen zeigen, dass Taxol® die meisten etablierten Tumorzelllinien (Mamma-, Ovarial-, Zervixkarzinom und auch Leberzellkarzinom) in ihrem Wachstum hemmen.

Der Wirkmechanismus ist einzigartig: Taxol® bindet speziell an die β -Untereinheit des Tubulin und reduziert somit die für die Depolymerisierung kritische bzw. erforderliche Konzentration des Tubulin. Damit kippt das Gleichgewicht in Richtung der Polymerisation, das Wachstum der Mikrotubuli wird beschleunigt und der Zellpool an freiem Tubulin erschöpft sich [2,3].

Es fördert die Bildung von abnormen Mikrotubulus -Strukturen. Dies führt zur Störung des Mitoseablaufs. Es kommt zu Chromosomenbrüchen. Der zytotoxische Effekt hängt entscheidend ab:

1. von der Darreichungsform (SUV-Paclitaxel versus DSM- Paclitaxel versus reines Taxol®)
2. von der Dosis, die bedingt durch die relativ hohe Toxizität begrenzt ist (hypersensitive Reaktionen) [5].

Ziel ist es, die Therapieeffizienz solider Tumore durch längerfristige hohe Wirkstoffkonzentration im Tumor und Tumorrand bei möglichst geringer systemischer Belastung zu erhöhen. Darum werden neue Applikationsformen gesucht, um das Targeting der Medikamente zu verbessern. Bei regionaler Applikation kann die Dosis im Vergleich zur systemischen Therapie ohne Anstieg der Toxizität erhöht werden, vor allem in der liposomalen Form [78].

In den durchgeführten Untersuchungen wurde die Antitumorwirkung von Taxol® in Abhängigkeit von der Applikationsweise (intraarteriell versus systemisch) und therapeutischen Formulierung

(käufliches Taxol® mit dem Lösungsmittel Cremophor versus dem in unserem Labor synthetisierten liposomalem SUV -Paclitaxel mit und ohne Embolisat) getestet.

Die Leber stellt das erste durchströmte Organ für den gesamten Gastrointestinaltrakt dar.

Aufgrund der dualen, aber jeweils singulären Versorgung durch die A. hepatica und die Pfortader bietet sich die Leber als ideales Organ für eine regionale Applikation an [66].

Ziel der Chemoembolisation ist die Erhöhung der Zytostatikakonzentration im Zielgebiet unter Vermeidung systemischer Nebenwirkungen (Tumortargeting). Bei der Embolisation der Arterien werden eine partielle Verstärkung der Chemotherapeutikawirkung durch Hypoxie [46] und eine erhöhte Zytostatikaufnahme in die Tumoren bei verlangsamtem arteriellem Blutfluss erzielt [47].

Die mittels Embolisat erzeugte passagere Flussverzögerung trägt durch Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Therapeutikum und Gewebe zu einer vermehrten Anreicherung bei [67,68,69]. Um einen anhaltenden Behandlungsvorteil für die Patienten zu sichern, muss die Behandlung wiederholbar sein. Daher sollten in der Chemoembolisation keine permanenten Embolisate verwendet werden [58,70]. Eine länger dauernde Embolisation führt bereits nach wenigen Tagen zur Ausbildung von Kollateralgefäßen, wodurch der regionale Ansatz zerstört wird [69]. Der Tumor rekrutiert über intrahepatische Kollateralen oft ausreichend Zustrom, so dass der Effekt der Okklusion der A. hepatica propria auf den Tumor marginal ist [25].

Es werden in der Chemoembolisation daher bevorzugt kurz wirksame, passagere Embolisate angewendet [71]. Die Partikelgröße bestimmt das Maß der Flussverlangsamung im Gefäßbett und ist ein entscheidendes Kriterium für die Auswahl des geeigneten Embolisates [72]. Partikel über 50 µm befanden sich etwa in gleicher Anzahl sowohl in Embolisationsbezirken des Tumors als auch in den der gesunden Leber, während bei einer Partikelgröße unter 50 µm eine dreimal höhere Embolisationsrate im Tumor verglichen mit dem des gesunden Leberparenchym nachgewiesen werden konnte [73].

Degradable starch microspheres (Spherex®), absorbierende gelatine puder (Gelfoam®), Lipiodol und Prolamine werden als Embolisate verwendet.

Da Gelfoam®, Lipiodol und Spherex® eine passagere Ischämie erzeugen, sind sie die einzigen kompetitiven embolisierenden Substanzen [74].

Gelfoam® (absorbable gelatin sponge) wird aus gereinigter Schweinehautgelatine gewonnen, ist wasserlöslich, nicht elastisch, ein poröses Produkt, das in der Lage ist ein Mehrfaches, seines Gewichtes an Flüssigkeit zu absorbieren und in seinen Zwischenräume zu halten. Der fein gemahlene Gelfoampuder enthält Partikel mit einem Durchmesser von 40-60 µm, die einen Verschluss auf arteriolo- kapillärer Ebene bewirken. Die Okklusion wird durch die Kombination von mechanischer Verlegung und Thrombozytenaggregation hervorgerufen [54, 55,56].

Die Rekanalisation kann bei korrekt verschlossenem Blutgefäß zwischen 2-30 Tagen dauern [57].

Pohlen u. und Berger G. (2001) [74] konnten zeigen, dass die regionale Applikation von Carboplatin die Tumorkonzentration um das 4-fache gegenüber der systemischen Therapie erhöht. Bei Coapplikation von 10 mg Gelfoam® (gelatine Powder, Upjohn Kalamazoo, Mich. USA) und 150 mg Carboplatin wurden signifikant höhere Wirkstoffkonzentrationen (c.a.12fach) im Tumor als bei lokoregionärer Applikation von Carboplatin ohne Gelfoam® und sogar 44fach höher als bei i.v.- Gabe gemessen. Man kann sagen, dass Gelfoam® die Effizienz des Tumortargetings stark positiv beeinflusst. Dabei war die Belastung der Leber nur um das 1,6fache erhöht.

Spherex® bzw. Stärkepartikel bestehen aus einer durch körpereigene Alpha- Amylase völlig auflösbaren dreidimensional vernetzten, hydrophilen Stärkematrix, die aus hydrolisierter Kartoffelstärke gewonnen wird. Sie werden mit einem Durchmesser von 45 µm nach intraarterieller Applikation im Kapillarbett und in kleinen Arteriolen zurückgehalten [58,59]. Die Stärkemikrosphären werden beim enzymatischen Abbau in Fragmente unterschiedlicher Größe zerlegt. Größere werden durch Makrophagen beseitigt, ohne eine Stimulation des Immunsystems zu bewirken und kleinere werden durch renale Filtration ausgeschieden [59,60]. Die Halbwertszeit von Spherex® beträgt in vivo durchschnittlich 25 Minuten [60]. Die Dauer der Blockade ist abhängig von der applizierten Dosis und der individuellen Serumkonzentration der Alpha- Amylase. Auch bei sehr hoher Dosierung wird jedoch die Parenchyndurchblutung wiederhergestellt bevor ischämische Leberparenchymschäden entstehen. Durch die kombinierte temporäre arterielle Ischämie mittels Stärkemikrosphären wird eine erhöhte intrahepatische Retention erreicht, woraus eine geringere systemische Konzentration und somit auch Toxizität des Zytostatikums resultiert [61, 62,63]. Die Tumoransprechrates auf das Zytostatikum wird durch zusätzliche Spherex® -Gabe signifikant erhöht [63].

Wir haben uns für Spherex® aus folgenden Gründen entschieden:

1. Die kurzfristige Embolisation von etwa 10-30 min bzw. die schnelle Rekanalisation der Gefäße bewirkt im Gegensatz zu Embolisationsmaterialien mit längerer Wirkdauer nicht die Gefahr der Kollateralbildung, die weitere Behandlungszyklen erschweren würden [58,59,64].
2. Die optimale Partikelgröße der Stärkepartikel mit einem Durchmesser von etwa 45 µm.

Dagegen zeigte Gelfoam® -Puder mit einer Partikelgröße von 55-65 µm tierexperimentell einen deutlich schlechteren Transport in der Peripherie mit inhomogener Verteilung[66].

Ein zweites Prinzip, das Tumortargeting zu verbessern, ist der Einsatz von Drug Carriern (Transportsysteme). Diese sind in der Lage, das Therapeutikum selektiv in das Zielgebiet zu transportieren. Dazu muss das Medikament an das Transportvehikel gebunden werden können und diese Bindung darf das Targeting nicht beeinträchtigen. Ein idealer Carrier sollte möglichst

stabil, biologisch abbaubar und gut in der Extrazellulärflüssigkeit löslich sein. Es darf keine toxische Belastung für den Organismus sein und wenn möglich sollte es nicht immunogen sein [75].

Insbesondere Liposomen sind Gegenstand intensiver Forschungen, da sie viele der geforderten Eigenschaften von Drug Carrier erfüllen [76]. Liposomen sind Drug Carrier, die einige Probleme der Substanzlöslichkeit, Instabilität und schnelle Abflussrate lösen können [77].

So kann bei der Herstellung von SUV-Paclitaxel- Liposomen auf den toxischen Lösungsvermittler Cremophor verzichtet werden, der bei der Therapie mit käuflichem Taxol® unabdingbar ist.

Liposomen haben einen ähnlichen Aufbau wie biologische Membranen und sind deshalb sicher, biokompatibel und abbaubar [78]. Durch Manipulation bestimmter physikalischer Parameter, wie z.B. die Phospho - Lipid - Zusammensetzung oder Membranfluidität können Liposomen hergestellt werden, die effizient und effektiv verschiedene Pharmaka transportieren können. Kleine Änderungen dieser Parameter können ebenfalls tiefgründigere Effekte der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bewirken [79-86].

Chemotherapeutika, die in Liposomen inkorporiert sind, weisen längere Zirkulationszeiten auf mit einer größeren AUC, geringerer Clearance -Rate und kleineres Verteilungsvolumen als freie Chemotherapeutika [87-93]. Diese lange Zirkulationszeit ermöglicht höhere Konzentrationen von liposomal verkapselten Pharmaka in Regionen hoher Gefäßpermeabilität wie bei soliden Tumoren und die Abflussrate des Pharmakon im gesunden Gewebe ist geringer [77].

Liposomen als Carrier haben die Fähigkeit, sowohl wasserlösliche als auch fettlösliche Medikamente zu transportieren [94]. Liposomal verkapselte Substanzen, insbesondere im Inneren der Liposomen, erhalten einen substanziellen Schutz vor Interaktionen mit abbauenden Enzymen, vor physiologischen Prozessen oder unvorteilhaften pH -Änderungen, die sofort zum Zusammenbruch führen können.

Untersuchungen deuten darauf hin, dass liposomal verkapselte Substanzen die Multi- drug- Resistenz gegen Anti - Cancer - Pharmaka umgehen können, vermittelt durch das MRP (Multi- drug- resistance- Protein). Solange sie verkapselt sind, nehmen sie die Pharmakokinetik des Drug Carriers an, nicht die der zytotoxischen Substanz.

Die aus den Liposomen freigesetzte Droge wird zur freien Droge und verhält sich demnach pharmakokinetisch genauso wie eine freie Droge. Liposomen scheinen nicht die intakte Blut-Hirnschranke im signifikanten Umfang zu überschreiten, obwohl schon nachgewiesen worden ist, dass Liposomen diese Barriere bei Krankheit überschreiten können [95-97].

Diese Substanzen, welche am meisten von der Verbindung mit Liposomen als Drug Carrier profitieren, sind diejenigen, die eine ungünstige Pharmakokinetik und Bioverteilung aufweisen

bzw. sehr toxisch sind: Antitumor- Pharmaka sind erwiesenermaßen besonders für das Liposomen- delivery- system geeignet .

Die liposomale Verkapselung von Paclitaxel wurde entwickelt, um die Probleme der Stabilität, Löslichkeit des herkömmlichen Taxol® zu überwinden [98]. Vorklinische Studien demonstrieren, dass liposomal verkapseltes Paclitaxel die multi- drug- Resistenz in humanen promyeololeukämischen HL -60/ VCR- Zellen 9fach und in humanen Ovariell SK VLB- Cancer- Zellen 8fach herabsetzen als das konventionelle Taxol®. Zusätzlich reicherte sich Taxol® 3-4 mal mehr an, wenn es in Liposomen verabreicht wurde.

Liposomal verkapseltes Paclitaxel zeigte eine signifikante Reduktion der Abflussrate in den untersuchten Zellen als freies Taxol® [99]. Ein weiteres Studiendesign wurde entwickelt, um die Pharmakokinetik, die Toxizität, die Verteilung im Gewebe und die therapeutische Effizienz von liposomal verkapselten und freien Taxol® untereinander zu vergleichen.

In normalen Mäusen war SUV-Paclitaxel weniger toxisch als freies Taxol® mit vergleichbarer Antitumor-Aktivität [78]. In dieser Studie war die AUC 2fach höher und die Elimination- Halbwertszeit des SUV-Paclitaxel doppelt so lang wie die des freien Taxol®. Freies Taxol® zeigt eine nicht-lineare Pharmakinetik mit einer disproportionierten wachsenden AUC in Abhängigkeit der verabreichten Dosis. SUV- Paclitaxel zeigte in den Studien eine lineare Kinetik.

Die Anreicherung von SUV- Paclitaxel war in der Milz 10fach höher und in der Leber 3,5fach höher als die des freien Taxol®. In anderen Organen, wie z.B. in Nieren, Lunge und Gehirn , wurden 2-3fach geringere Konzentrationen des SUV-Paclitaxel gemessen als bei der Applikation von freiem Taxol®. Die signifikante geringere Toxizität, die höhere AUC im Plasma und die höhere Halbwertszeit des SUV-Paclitaxel zeigen, dass die liposomale Verkapselung von Paclitaxel eine sehr wahrscheinliche Alternative zum herkömmlichen freien Taxol® sein könnte [100].

Generell sinkt die Halbwertszeit der konventionellen Liposomen mit zunehmendem Durchmesser, negativer Ladungsdichte und abnehmender Membranstabilität. Damit ist für diese Liposomen eine maximale Halbwertszeit nur in Nutzung von SUV möglich, die einen kleinen Durchmesser und einen stabilen Membranaufbau aufweisen. Sie bestehen aus Distearoyl - Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin und Cholesterol bestehen, welche eine feste, neutrale Doppelmembran liefern.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein Tumormodell benötigt, das sich problemlos in der Leber der gewählten Versuchstiere implantieren lässt und die Eigenschaften des humanen HCCs aufweist. Das CC-531 ist ein etabliertes Tumormodell für das HCC und Lebermetastasen [101,102]. Das CC-531-Tumormodell ist einfach hand zu haben und gut reproduzierbar. Die Haltung der Zelllinie, Aufbereitung der Tumorsuspension und Implantation waren mit Standardmethoden durchführbar und die Tumorwachstumsrate betrug 98%. Im Gegensatz zur Inokulation kleiner Tumorstücke [130] sind Tumore, die durch subkapsuläre Implantation einer

definierten Zellzahl induziert werden, besser reproduzierbar. Durch die subkapsuläre Injektion kann die Lage und Zahl der Tumormanifestation genau bestimmt werden [131]. Nach Implantation von 5×10^5 Zellen wuchsen innerhalb von 12 Tagen Tumore mit einem Durchmesser von etwa 1 cm.

Aus vorangegangenen Überlegungen und Versuchen resultiert das CC-531-Tumormodell und die Analytik von Taxol®. Die vorgelegte Arbeit untersucht das Tumortargeting und die Pharmakokinetik von Taxol® und SUV- Paclitaxel in der systemischen Therapie und in der lokoregionären Therapie. Dabei sollte der Einfluss von 2 Drug Carrier (Stärkemikrosphären und Liposomen) in der lokoregionären Therapie überprüft werden.

Generell wurden 6 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt untersucht:

Um die Reaktion auf die verschiedenen Behandlungsmethoden der einzelnen Therapiegruppen vergleichen zu können, wurden die Tiere bei Erreichen der gewünschten Tumorgroße (1 cm) alle nach gleichem Schema behandelt:

1. gleiche Menge Zytostatikum intravenös oder lokoregionär
2. gleiche Formulierung des Liposomen- Zytostatikum intravenös oder lokoregionär
3. gleiche Dosis Stärkemikrosphären intravenös oder lokoregionär
4. alle Tiere wurden zu definierten Zeitpunkten (5, 15, 30, 45, 60, 120, 240 min, 24h und 3 Tage) in Vollnarkose euthanisiert, die Organe (Leber, Tumor, Tumorrand, Lunge, Pankreas, Milz, Niere, Peritoneum, Lymphknoten, Magenwand, Herz, Lunge und Plasma) entnommen und die Gewebeproben nach ein und derselben analytischen Vorgehensweise untersucht..

Hier die Resultate:

A) Verbessern Liposomen als Drug Carrier das Tumortargeting in der systemischen Therapie?

Bei der Applikation von 1 mg Paclitaxel lokoregionär haben wir eine 10fach höhere Anreicherung im Tumor und eine 3-4fach höhere Anreicherung im Tumorrand im Vergleich zur intravenösen Gabe von Paclitaxel gemessen. Die lokoregionäre Therapie verbessert das Tumortargeting gegenüber der systemischen Therapie.

B) Verbessert die lokoregionäre Therapie das Tumortargeting gegenüber der systemischen Therapie? Die ermittelten pharmakokinetischen Daten zeigten, dass Liposomen als Drug

Carrier das Tumortargeting in der systemischen Therapie erheblich verbessern: Im Tumor war die Anreicherung von SUV-Paclitaxel 20fach höher im Vergleich zur Applikation von herkömmlichen Taxol® und im Tumorrand war die Anreicherung von SUV-Paclitaxel 15fach höher im Vergleich zur Applikation von herkömmlichen Taxol®.

C) Verbessern Stärkemikrosphären das Tumortargeting in der lokoregionären Therapie?

Spherex® verbessert das Tumortargeting in der lokoregionalen Therapie: Bei der intraarteriellen Applikation von DSM- Paclitaxel wurde im Tumor eine doppelt so hohe Konzentration als ohne Embolisat gemessen, im Tumorrand war die Anreicherung annähernd gleich hoch wie ohne Embolisat.

Mit Liposomen als Drug Carrier verglichen, hat die lokoregionäre Therapie von Paclitaxel mit Embolisat jedoch einen geringen therapeutischen Effekt.

D) Welchen Einfluss haben SUV-Liposomen auf das Tumortargeting in der lokoregionären Therapie?

Im Tumor war die Anreicherung von SUV-Paclitaxel lokoregionär 10fach höher als bei lokoregionären Applikation von originalem Taxol®, etwa 5-6-mal höher als bei der regionalen Applikation von Paclitaxel + Embolisat und 3 fach höher im Vergleich zur intravenösen Applikation von SUV-Paclitaxel.

Im Tumorrandbereich wurden noch höhere Konzentrationen gemessen: insgesamt 3-4fach höher als im Tumor. Bei der lokoregionären Applikation von SUV-Paclitaxel war die Anreicherung im Tumorrand 14fach höher als bei lokoregionären Applikation von originalem Taxol®, 10-12fach höhere Anreicherung als bei der regionalen Applikation von originalem Paclitaxel + DSM und 4fach höhere Anreicherung im Vergleich zur intravenösen Gabe von SUV-Paclitaxel.

An den pharmakokinetisch ermittelten Daten geht hervor, dass SUV- Liposomen das Tumortargeting in der systemischen und lokoregionären Therapie in einem erheblichen Umfang verbessern.

E) Welchen Einfluss haben die Kombination von 2 Drug Carriern (Stärkemikrosphären + Liposomen) auf das Tumortargeting in der lokoregionären Therapie?

SUV-Paclitaxel mit Embolisat lokoregionär verabreicht zeigt, dass die Anreicherung im Tumor doppelt so hoch und im Tumorrand annähernd gleich hoch ist im Vergleich zur lokoregionären Applikation von SUV- Paclitaxel ohne Embolisat.

Beim Vergleich der Taxol®- Anreicherungen im Tumor zwischen den intraarteriell therapierten Gruppen, zeigte die liposomale Applikation in Kombination mit Embolisierung (SUV- DSM- Paclitaxel) eine 20 fache Konzentration, gefolgt von der reinen liposomalen Gabe (SUV- Paclitaxel) mit einer 10 fach höheren Anreicherung und der Kombination Paclitaxel + DSM gegenüber der lokoregionären Monotherapie (Taxol® i.a).

Bei allen anderen Gruppen war der Taxol® -Gehalt vergleichsweise gering.

Diese positiven Ergebnisse kommen durch 2 Faktoren zustande: 1. die lokoregionäre Darreichungsform der Substanz und 2. durch die Anwendung von Drug Carrier (SUV, DSM).

→ die liposomale Verkapselung ermöglicht einen besseren Transport des Medikaments in die Zelle als die Monosubstanz

→ die Kombination mit Spherex® führt durch eine passagere, periphere Chemoembolisation zu einer gesteigerten Akkumulation des Therapeutikums im gut durchbluteten Tumoranteil.

Diese Arbeit unterstreicht die Wirksamkeit der liposomalen Verkapselung des Zytostatikums Paclitaxels, die in Kombination mit dem flussverlangsamenden Embolisat Spherex® zu einer sehr hohen, selektiven Anreicherung des Therapeutikums im Tumorgewebe führt.