

**Entwicklung und Herstellung von  
„Trojan Horse“- Liposomen zur Therapie  
von Hirntumoren und Metastasen**

**Experimentelle Studien liposomaler Nanocarrier *in vitro* und *in vivo***

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

von  
**Andrea Orthmann**  
aus Berlin

Berlin 2011



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. habil. Iduna Fichtner (Experimentelle Pharmakologie, Max Delbrück Centrum für molekulare Medizin Berlin-Buch) und Herrn Dr. rer. nat. Reiner Zeisig (Experimentelle Pharmakologie und Onkologie GmbH Berlin) am Max Delbrück Centrum für molekulare Medizin Berlin-Buch von November 2007 bis Juli 2011 angefertigt. Die experimentellen Arbeiten wurden von November 2007 bis Dezember 2010 durchgeführt. Das Projekt wurde durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, Pro Inno II (Förderkennzeichen: KF 2134101UL8) und ZIM (Förderkennzeichen: KA 0453401UL7), finanziert.

**1. Gutachterin**

**Dr. rer. nat. habil. Iduna Fichtner**

Experimentelle Pharmakologie

Max Delbrück Centrum Berlin

**2. Gutachterin**

**Univ.-Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting**

Institut für Pharmazie

Freie Universität Berlin

**Disputation am:**

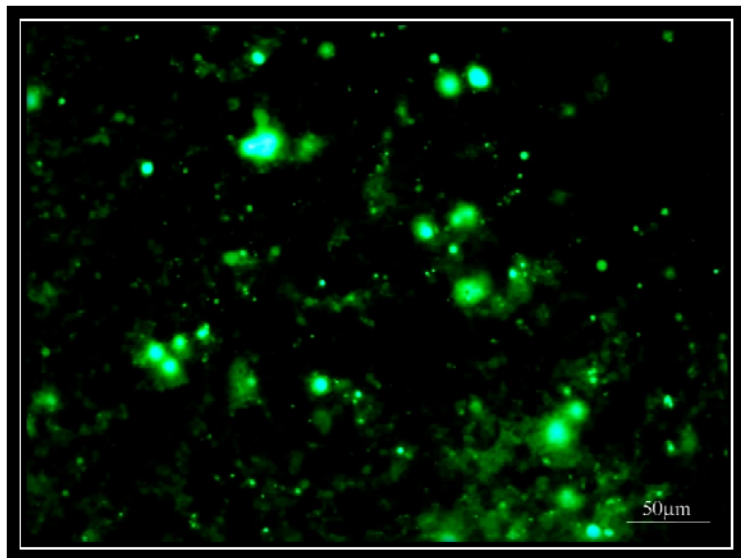
25. November 2011





**In Liebe für André & Klara**





*„Vor den Mauern der Stadt blieb der Inhalt des Trojanischen Pferdes völlig unerkannt, während nach dem Einbringen in feindliches Gebiet dessen Inhalt vollständig entleert wurde und zum Sieg gegen die feindliche Übermacht führte.“*

*Elke Wolf, 2001*



## **Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Frau Dr. Iduna Fichtner für die Aufnahme zur Anfertigung meiner Promotion in ihrer Arbeitsgruppe, die Mitarbeit an einem sehr interessanten Thema, die guten Arbeitsmöglichkeiten im Institut, ihr stetiges großes Interesse an meiner Arbeit sowie die zahlreichen Anregungen im Rahmen ihrer Betreuung bedanken. Sie gab mir nicht nur die Möglichkeit, diese Arbeit am MDC anzufertigen, sondern förderte mich auch durch Teilnahmen auf nationalen und internationalen Kongressen und Weiterbildungen.

Mein größter Dank geht an Herrn Dr. Reiner Zeisig für die professionelle Einführung in die wissenschaftliche Arbeit mit Liposomen, für die ständige Hilfe bei organisatorischen Fragestellungen, die Beurteilung und Korrektur dieser Arbeit und vor allem die angenehme Zusammenarbeit im Laboralltag.

Frau Univ.-Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich für ihre fachliche Unterstützung und die kurzfristige Übernahme des Erstgutachtens sowie die Vertretung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Bei den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe, vor allen bei Frau Margit Lemm und meiner Schwester Annika Hoffmann, die immer zu fachlicher Unterstützung in einer sehr netten Arbeitsatmosphäre bereit waren, möchte ich mich an dieser Stelle bedanken. Auch die zahlreichen Gespräche, die ich mit Annika bei vielen entspannenden Ausritten führen konnte, trugen zur Vollendung dieser Arbeit bei.

Ich möchte mich auch recht herzlich bei der Firma EPO GmbH Berlin-Buch, insbesondere bei Herrn Dr. Christian Nowak und Herrn Dr. Jens Hoffmann, für die zur Verfügung gestellten Materialien, Laborausstattung und Geräte sowie die finanzielle Unterstützung bedanken.

Mein Dank geht auch an nationale und internationale Kooperationspartner im Speziellen an Herrn Dr. Burkhard Wiesner, Frau Jenny Eichhorst, Frau Dr. Dorothea Lorenz und Herrn Dr. Ingolf E. Blasig vom Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (Berlin), Frau Prof. Dr. Regine Süss von der Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), Herrn Prof. Dr. Alfred Fahr von der Friedrich-Schiller-Universität (Jena) sowie Frau Prof. Dr. Marjeta Šentjurc und Herrn Dr. Tilen Koklič vom Jozef Stefan Institut (Ljubljana, Slovenien) für die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung von Geräten und Arbeitstechniken.

Besonders danke ich meinem Mann André für seine Liebe und seinen Rückhalt während der gesamten Zeit. Ohne seine Durchhalteparolen, sowie die fachliche und emotionale Unterstützung wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie fertig geworden.

Ich möchte meinen Eltern von Herzen danken, denn ihnen habe ich alles zu verdanken. Sie haben mich auf meinem bisherigen Weg, vor allem im vorausgegangenen Studium, mit allen Mitteln unterstützt und immer an mich geglaubt.



## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XXI</b>
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Blut-Hirn-Schranke .....	4
1.1.1. Aufbau .....	5
1.1.2. Barrierefunktion .....	6
1.2. Arzneistofftransport über die BHS.....	8
1.3. Vesikuläre Trägersysteme.....	11
1.3.1. Polymere Trägersysteme.....	11
1.3.2. Oberflächenmodifizierte Nanopartikel .....	12
1.3.3. Trägersysteme auf Lipidbasis .....	13
1.3.4. Dendrimere .....	13
1.3.5. Liposomen .....	14
1.4. Zielgerichtete Anwendung von Liposomen .....	17
1.5. LDL Rezeptoren.....	20
1.5.1. LDL Rezeptor related Protein (LRP1 / LRP2).....	20
1.5.2. Targeting-Strategien für die Überwindung der BHS mittels LRP1 / LRP2 ....	22
1.6. Zielsetzung.....	24
<b>II. Material .....</b>	<b>27</b>
<b>III. Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1. Liposomenpräparation .....	31
3.1.1. Lipidfilm-Hydratation und Extrusion .....	31
3.1.2. Mitoxantron-Beladung .....	32
3.1.3. Post Insertions Technologie .....	32
3.2. Liposomencharakterisierung .....	33
3.2.1. Größe und Größenverteilung .....	33
3.2.2. Konzentration des Gesamtlipidgehaltes .....	33
3.2.3. Zeta-Potential .....	34
3.2.4. Beladung.....	35
3.2.5. Lagerstabilität.....	36
3.2.6. Serumstabilität .....	36

3.3. Elektronenparamagnetische Resonanzmessung .....	37
3.4. Kryogenische Transmissionselektronenmikroskopie .....	37
3.5. Zellkultur .....	37
3.6. Durchflusszytometrie.....	38
3.7. Quantifizierung der zellulären Aufnahme .....	38
3.8. Konfokale Laserscanning Mikroskopie .....	39
3.9. Fluoreszenzmikroskopie .....	40
3.10. Transzytose-Experimente .....	40
3.10.1. Optische Prüfung.....	41
3.10.2. Transzelluläre elektrische Widerstandsmessung .....	41
3.10.3. Mannitolbehandlung.....	41
3.10.4. Durchlässigkeitsmessung mit FITC-Dextran .....	42
3.10.5. Quantifizierung der Transzytose-Rate.....	42
3.11. Zytotoxizitätstest .....	42
3.12. Metastasenmodelle <i>in vivo</i> .....	43
3.13. Pharmakokinetische Studien .....	44
3.14. Statistik .....	47
<b>IV. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1. Herstellungsverfahren liposomaler Nanocarrier .....	50
4.1.1. Etablierung und Standardisierung von Herstellungs- und Beladungs- verfahren für Liposomen.....	50
4.1.2. Etablierung und Optimierung der Post Insertions Technologie.....	52
4.2. Liposomencharakterisierung .....	53
4.2.1. Prüfung der Größe, der Größenverteilung, des Gesamtlipidgehaltes, des Zeta-Potentials und der Beladung .....	54
4.2.2. Prüfung der Lagerstabilität und der Stabilität im Serum .....	57
4.3. Strukturanalyse von Liposomen mittels elektronenparamagnetischer Resonanzmessung .....	62
4.4. Strukturanalyse von Liposomen mittels kryogener Transmissions- elektronenmikroskopie.....	65
4.5. Etablierung und Charakterisierung verschiedener Zelllinien.....	66
4.6. <i>in vitro</i> Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie .....	68
4.7. <i>in vitro</i> Quantifizierung der Aufnahmerate vom Liposomen.....	71
4.8. Charakterisierung der zellulären Aufnahme von Liposomen mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie.....	76



4.9.	Charakterisierung der zellulären Aufnahme von Liposomen mittels Fluoreszenz- mikroskopie .....	79
4.10.	<i>in vitro</i> Untersuchungen zum Durchtritt von Liposomen durch Zellbarrieren .....	81
4.10.1.	Etablierung und Standardisierung der Funktionsfähigkeitsprüfung eines <i>in vitro</i> Schrankenmodells.....	82
4.10.2.	<i>in vitro</i> Quantifizierung der Permeationsrate .....	85
4.11.	<i>in vitro</i> Prüfung auf Toxizität von verschiedenen Liposomen .....	89
4.12.	Therapieversuche am Hirnmetastasenmodell in der Nude-Maus .....	90
4.13.	Pharmakokinetische Studien .....	95
<b>V.</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>107</b>
<b>VI.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>109</b>
<b>VII.</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>111</b>
<b>VIII.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>IX.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>129</b>
Tabelle A	Liposomenzusammensetzung.....	130
Tabelle B	Physikochemische Eigenschaften der Liposomen und deren zelluläre Aufnahmerate .....	132
Abbildung A	Zeitliche Verteilung von Mitoxantron nach i.v. Behandlung in der Nude-Maus .....	134
Abbildung B	Relative Verteilung von Mitoxantron nach i.v. Behandlung in der Nude-Maus .....	135

## Abkürzungsverzeichnis

AIC	Akaike Informationskriterium
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CH	Cholesterol
CMC	Comprehensive Medical Chemistry
Cryo-TEM	Kryogenische Transmissionselektronenmikroskopie
DCP	Dicetylphosphat
DDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPE	1,2-Dioleoyl-s,n-glycero-3-phosphoethanolamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronenparamagnetische Widerstandsmessung
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FBS	Fötale Kälberserum
$F_{em}$	Emissionswellenlänge
$F_{ex}$	Extinktionswellenlänge
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FU	Fluoreszenzeinheiten
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
$IC_{50}$	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
i.c.	Intrazerebral
i.v.	Intravenös
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein Rezeptor
LRP	Low density lipoprotein Rezeptor - related Protein
LUV	Große unilamellare Vesikel
mFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MLV	Multilamellare Vesikel
MPS	Monozyten/Makrophagen-System
MRT	Mittlere Verweildauer im Körper
MTO	Mitoxantron
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
OLV	Große oligolamellare Vesikel
OPP	4-((Hydroxy(octadecyloxy)phosphinyl)oxy)-1,1-dimethylpiperidin-1-ium-4-yl-phosphat (Perfosine)
p	Signifikanz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PEG-PE	N-Methyl-(polyethylenglycol) <sub>2000</sub> -1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin
PI	Polydispersitätsindex
PIT	Post Insertions Technologie
PMT	Photomultiplier Tubes
RT	Raumtemperatur
RTV	Relatives Tumolvolumen
s.c.	Subkutan

S.D.	Standardabweichung
SfM	Serumfreies Medium
SLC	Solute Class Carrier
SM	Sphingomyelin
SUV	Kleine unilamellare Vesikel
TER	Transzellulärer elektrischer Widerstand
T <sub>emp</sub>	Empirische Korrelationszeit
TL	Gesamtlipid
UV/Vis	Ultravioletter und sichtbarer Wellenbereich
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

### Technische Einheiten

cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol%	Molprozent
mT	Millitesla
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
pg	Picogramm
pH	pH-Wert
pmol	Picomol
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
V	Volt
V <sub>ac</sub>	Wechselstrom (engl. alternating current = ac)
°C	Grad Celsius
%	Prozent
Ω	Ohm
'	Minute
∅	Durchmesser

## Liposomale Formulierungen

<b>L1</b>	Liposomenzusammensetzung mit starrer Lipidmembran
<b>L2</b>	Liposomenzusammensetzung mit positiv geladener Lipidmembran
<b>L3</b>	Liposomenzusammensetzung mit leicht flexibler Lipidmembran
<b>L4</b>	Liposomenzusammensetzung mit stark flexibler Lipidmembran
<b>L5</b>	Liposomenzusammensetzung mit PEG enthaltener Lipidmembran
<b>L1-LG</b>	<b>L1</b> mit gekoppeltem Peptidliganden
<b>L4-LG</b>	<b>L4</b> mit gekoppeltem Peptidliganden
<b>L1<sub>Calcein</sub></b>	<b>L1</b> mit verkapseltem Calcein
<b>L2<sub>Calcein</sub></b>	<b>L2</b> mit verkapseltem Calcein
<b>L3<sub>Calcein</sub></b>	<b>L3</b> mit verkapseltem Calcein
<b>L4<sub>Calcein</sub></b>	<b>L4</b> mit verkapseltem Calcein
<b>L5<sub>Calcein</sub></b>	<b>L5</b> mit verkapseltem Calcein
<b>L1<sub>Calcein</sub>-LG</b>	<b>L1</b> mit verkapseltem Calcein und gekoppeltem Peptidliganden
<b>L4<sub>Calcein</sub>-LG</b>	<b>L4</b> mit verkapseltem Calcein und gekoppeltem Peptidliganden
<b>L1<sub>MTO</sub></b>	<b>L1</b> mit verkapseltem Mitoxantron
<b>L4<sub>MTO</sub></b>	<b>L4</b> mit verkapseltem Mitoxantron
<b>L1<sub>MTO</sub>-LG</b>	<b>L1</b> mit verkapseltem Mitoxantron und gekoppeltem Peptidliganden
<b>L4<sub>MTO</sub>-LG</b>	<b>L4</b> mit verkapseltem Mitoxantron und gekoppeltem Peptidliganden



## Abbildungsverzeichnis

Nr.	Seite
1	1
2	5
3	6
4	15
5	21
6	22
7	24
8	34
9	36
10	38
11	40
12	41
13	45
14	46
15	53
16	56
17	57
18	59
19	60
20	61
21	64
22	66
23	67
24	68
25	69
26	70

<b>27</b>	Zellulär aufgenommene Menge an Calcein in MDCK Zellen in Abhängigkeit von der liposomalen Formulierung.....	72
<b>28</b>	Zellulär aufgenommene Menge an Calcein in MDCK Zellen über die Zeit.....	74
<b>29</b>	Zellulär aufgenommene Menge an Calcein in Abhängigkeit von der liposomalen Formulierung und dem eingesetzten Zelltyp .....	75
<b>30</b>	Lokalisation von liposomalem Calcein in MDCK Zellen dargestellt mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie .....	77
<b>31</b>	Lokalisation von liposomalem Calcein im Zytosol von MDCK Zellen dargestellt mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie .....	78
<b>32</b>	Lokalisation von liposomalem Calcein in MDKC Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	80
<b>33</b>	Mikroskopische Aufnahmen von MDCK Zellen auf einem Filtereinsatz eines Transwell-Filtersystems .....	82
<b>34</b>	Änderung des transzellulären Widerstandes von MDCK Zellen über die Zeit vor und nach einer Behandlung mit Mannitol.....	83
<b>35</b>	Zellulärer Transport von FITC-Dextran mit und ohne Öffnung der Zellbarriere durch Mannitol .....	85
<b>36</b>	Transzytose von liposomalem Calcein durch einen dichten MDCK Monolayer.....	86
<b>37</b>	Transzytose von liposomalem Calcein durch einen dichten MDCK Monolayer in Abhängigkeit von der liposomalen Formulierung .....	88
<b>38</b>	Wachstumshemmung des s.c. implantierten humanen MT-3 Tumors während der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO .....	91
<b>39</b>	Hemmung des im Gehirn wachsenden humanen MT-3 Tumors durch MTO-haltige Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.....	92
<b>40</b>	Unerwünschte Begleiterscheinungen der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO .....	94
<b>41</b>	Zeitabhängigkeit der Wiederfindungsrate von MTO in Plasmaproben.....	96
<b>42</b>	Wiederfindungsraten für MTO aus biologischen Proben.....	97
<b>43</b>	MTO Konzentration im Plasma und im Gehirn nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.....	98
<b>44</b>	MTO Konzentration im s.c. MT-3 Tumor nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.....	99
<b>45</b>	MTO Konzentration in den Nieren und in der Leber nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO .....	100
<b>46</b>	Schematische Darstellung der Abnahme des Plasmaspiegels eines Wirkstoffes nach i.v. Applikation bei Vorliegen eines 2-Kompartiment-Modells .....	102

## Tabellenverzeichnis

Nr.	Seite
1 WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS .....	2
2 Liposomencharakterisierung. ....	15
3 Vektorbasierte Liposomen für einen Arzneistofftransport über die BHS. ....	19
4 Liganden und Modelkomponenten zur Herstellung oberflächenmodifizierter Liposomen. ....	29
5 Molare Zusammensetzung der verwendeten Liposomenformulierungen [mol%]. ....	31
6 Kenndaten zu den beispielhaften polynominalen Kalibriergeraden von PC und CH.. ....	34
7 Kenndaten zu den linearen Kalibriergeraden von Calcein und MTO. ....	35
8 Analytische Grenzwerte für den Messbereich der verwendeten photometrischen Methoden zur Bestimmung von Calcein und MTO nach DIN 32645.....	35
9 Kenndaten zur Kalibriergeraden von MTO.....	45
10 Analytische Grenzwerte für den Messbereich der verwendeten HPLC Methode zur Bestimmung von MTO nach DIN 32645. ....	45
11 Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften der verwendeten liposomalen Formulierungen. ....	55
12 Lagerstabilität von Calcein-enthaltenden Liposomen.....	58
13 Lagerstabilität von MTO-enthaltenden Liposomen.....	58
14 Wachstumshemmung (IC <sub>50</sub> ) verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff.....	89
15 Unerwünschte Begleiterscheinungen der verwendeten Therapeutika. ....	94
16 MTO Konzentration in der Milz, im Herzen und in der Lunge nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO. ....	101
17 Pharmakokinetische Parameter der MTO Konzentrationsverteilung im Plasma.....	104
18 Ermittelte Modell-Parameter für das 2-Kompartiment-Modell zur Auswertung der MTO Konzentration im Plasma. ....	104

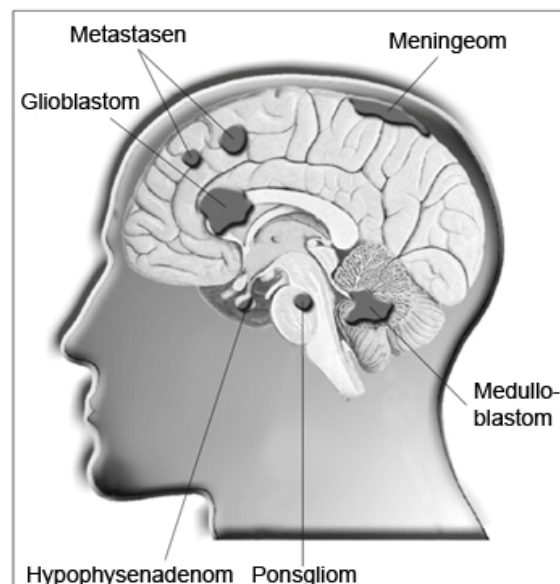




## I. Einleitung

Krebserkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) sind überwiegend Hirntumoren, die in Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe in mehrere Subtypen eingeteilt werden (Abb.1).

Sehr häufig entstehen Hirntumoren aus den Gliazellen des ZNS. Zu diesen Krebsformen gehören die Gliome, die ca. 50 % aller primären Tumoren im Gehirngewebe ausmachen. Da sich im Gehirn mehrere Arten von glialen Stützzellen befinden, können Gliome in verschiedene Untergruppen wie die Glioblastome, die Astrozytome, die Oligodendrogliome oder die Ponsgliome eingeteilt werden. Ependymome gehen vom Deckgewebe des Nervensystems aus. Die Meningeome sind Tumoren der sogenannten Meningen, der Hirn- und Rückenmarkshäute. Beim Medulloblastom handelt es sich um eine der häufigsten Tumorerkrankungen im Kindesalter, wobei es sich um eine Geschwulst des Kleinhirns handelt, die aus unreifen Zellen des kindlichen Gehirns hervorgeht. Andere Tumorarten können in den Hirnnerven entstehen, dazu zählen z.B. Schwannome. Die Tumoren der Hirndrüsen (Hypophysenadenome) sind meist gutartig. Weitere tumoröse Veränderungen des ZNS sind Hirnmetastasen. Dies sind Sekundäransiedelungen von Krebszellen anderer Organtumoren, die über das Blut- oder Lymphsystem bis ins Gehirn oder Rückenmark vorgedrungen sind. Häufig können sie bei Lungen-, Brust- oder Nierenkrebserkrankungen entstehen. Sie haben wesentlich schlechtere Heilungschancen als der Primärtumor und werden, auch wenn sie im Gehirn diagnostiziert wurden, chemotherapeutisch wie der Primärtumor behandelt [1].



**Abb.1: Lokalisation verschiedener Tumorarten im Gehirn\*.**

Abhängig vom Zelltyp (Astrozyten, Nervenzellen, Zellen der Hirnhäute oder Drüsengewebe) und der Lokalisation im Gehirn unterscheidet man zwischen verschiedenen Tumorarten.

\*[2]; ©Deutschen Krebshilfe e.V. Bonn, 2009.

Eine weitere Einteilung von Hirntumoren kann nach der weltweit gebräuchlichen und allgemeinen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erfolgen [3]. Die WHO-Klassifikation fasst die histologische Definition der verschiedenen Tumoren in einer Gradierung zusammen (Tab.1). Diese Gradierung bezieht sich auf die immunhistochemischen und molekulargenetischen Eigenschaften der Tumoren und ist ein wichtiger Bestandteil der neuropathologischen Diagnostik. Die sich von dieser Einteilung ableitenden Befunde sind hierdurch weltweit vergleichbar und haben durch ihre prognostischen Aussagen auch eine klinische Bedeutung bei der Entscheidung zur angewandten adjuvanten Chemo- oder Strahlentherapie.

Bezeichnung	Histologische Definition	Beispiele
WHO Grad I	<i>gutartige</i> Tumoren operative Entfernung möglich mit guten Heilungschancen	Neurinom, pilozytisches Astrozytom
WHO Grad II	<i>gutartige</i> , infiltrativ wachsende Tumoren mit Rezidivneigung schlecht operabel, aber mit guten Heilungschancen	Astrozytom
WHO Grad III	<i>bösartige</i> Tumoren schlecht operabel und mit Reduktion der Überlebensrate	anaplastisches Astrozytom
WHO Grad IV	<i>äußerst bösartige</i> Tumoren mit Rezidivneigung kaum operabel und mit deutlicher Reduktion der Überlebensrate	Glioblastom

**Tab.1: WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS\*.**

\* Modifiziert aus Louis 2007 [3].

Hirntumoren treten im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen (z.B. Brust- oder Lungenkrebs) relativ selten auf. Beim Erwachsenen liegt der Anteil an Hirntumoren bei 1,7 % bezogen auf die Gesamtheit aller Krebserkrankungen, was in Deutschland 3290 Neuerkrankungen pro Jahr bei Frauen und 3880 bei Männern entspricht und verursachen 2,6 % aller Krebstodesfälle. Im Kindesalter machen ZNS-Tumoren mehr als 1/5 aller Krebserkrankungen aus. Die 5 Jahres-Überlebensraten für Tumoren des ZNS liegen insgesamt zwischen 34 % und 38 %, wobei die 5 Jahres-Überlebensraten von äußerst bösartigen Tumoren (Glioblastom, Grad IV) nur 5 % bis 7 % beträgt [4,5].

Die meisten primären Hirntumoren werden operativ entfernt und anschließend mit einer Strahlen- und Chemotherapie behandelt, die bei vielen, wenn auch nicht allen Hirntumoren einen therapeutischen Effekt zeigt. Die hierbei verwendeten Zytostatika der ersten Generation

(Alkylanzien, Antimetabolite oder Antitumorantibiotika) sind hinsichtlich ihres Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum gut erforscht. Die Anwendungsmöglichkeiten der Chemotherapie für Hirntumoren konnten durch die Entwicklung neuer Wirkstoffe wie Temodar, Vincristin, Temozolamid, Platinverbindungen (cis-Platin) oder Topoisomerase-Hemmer (Mitoxantron) sowie durch Therapieoptimierungsstudien in präklinischer und klinischer Forschung erweitert werden. Durch diese Pharmaka wurde der therapeutische Effekt bei der Behandlung von Hirntumoren deutlich verbessert. Dennoch kommt es auch bei diesen Zytostatika bei der systemischen Gabe zu unspezifischen Anreicherungen im gesunden Gewebe und in Organen wie der Leber, der Milz, den Nieren oder dem Herzen was zu signifikanten Nebenwirkungen führt und sich für die klinische Anwendung dieser Substanzen nachteilig auswirkt (geringe Patientenakzeptanz).

Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften (Hydrophilie und hohes Molekulargewicht) können viele dieser Zytostatika die Blut-Hirn-Schranke nicht oder nur in geringem Maße passieren oder werden von spezifischen Transportern wie z.B. Effluxpumpen wieder ausgeschleust. Um eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe und damit eine erfolgreiche Chemotherapie zu erreichen, müssen die Dosierungen entsprechend hoch gewählt werden. Dadurch kann es zu erheblichen Nebenwirkungen kommen, u.a. durch die Schädigung schnell proliferierender, gesunder Zellen, was die einsetzbare Dosis der herkömmlichen Chemotherapie limitiert.

Bedingt durch einen wachsenden Wissensstand über physiologische Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wie die transportervermittelte Transzytose, die adsorptive Transzytose sowie die rezeptorvermittelte Transzytose ist die Entwicklung neuartiger Transportsysteme vorangeschritten. Die Nutzung dieser aktiven Transportprozesse für eine Verbesserung des Arzneistofftransportes über die BHS führte zu den „lokalisierten Therapien“. Die Entwicklung zielgerichteter Wirkstofftransporter orientiert sich vorwiegend an den „Targeted Therapies“. Hierbei werden „small molecules“, Proteine oder RNAi (RNA-Interferenz) wie Kinaseinhibitoren, Antihormone, monoklonale Antikörper oder rekombinante Proteine verwendet, die gezielt gegen Bindungsstellen auf Tumorzellen eingesetzt werden [6]. Diese Substanzen richten sich gegen spezielle zelluläre Strukturen wie Enzyme oder Oberflächenmoleküle, die überwiegend auf oder in Tumorzellen zu finden sind. Sie sollen somit gezielt in Wachstums- und Stoffwechselforgänge der Malignome eingreifen [1].

Eine zielgerichtete lokalisierte Therapie von Hirntumoren ist auch mit herkömmlichen Zytostatika durch oberflächenmodifizierte Trägersysteme wie Matrixmodelle, Nanopartikel oder Liposomen möglich, indem z.B. ein physiologischer, rezeptorvermittelter Transportprozess für die Überwindung der BHS genutzt wird. Durch eine Verkapselung der Wirkstoffe in diese Trägersysteme können sie vor unspezifischer Anreicherung im gesunden Gewebe und metabolischem Abbau (enzymatisch in der

Leber und Milz) geschützt, die unerwünschten Begleiterscheinungen vermindert und eine hohe therapeutische Effizienz (Tumorreduktion, Verlängerung der Überlebensrate, Heilung) erreicht werden [7]. Liposomen können sich für eine „lokale Therapie“ als Trägersystem gut eignen, da sie sich durch eine relativ einfache Herstellung, eine leichte und effiziente Arzneistoffbeladung, physiologische Verträglichkeit und die Möglichkeit der Modifikation mit Transportmolekülen auszeichnen.

In publizierten Forschungsarbeiten, die sich mit dem Transport arzneistoffbeladener Trägersysteme (Liposomen) über die BHS befassten, spielte Apolipoprotein E (ApoE) eine bedeutende Rolle [8]. ApoE ist ein Ligand des LDL Rezeptors (LDLR) und induziert eine vesikuläre, endozytotische Aufnahme von LDL in Endothelzellen. Der LDLR wird u.a. am zerebralen Kapillarendothel exprimiert. Peptide, die abgeleitet von der LDLR Bindungsdomäne des ApoE synthetisiert wurden, zeigten eine gute Bindungsaktivität im Gehirn [9]. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese verfolgt, dass oberflächenmodifizierte Liposomen, die als Liganden ein Peptid gebunden haben, das an den LDLR am Gehirn bindet, die BHS überwinden können und zu einer Verbesserung des therapeutischen Effektes bei Hirntumoren und Hirnmetastasen führen sollen.

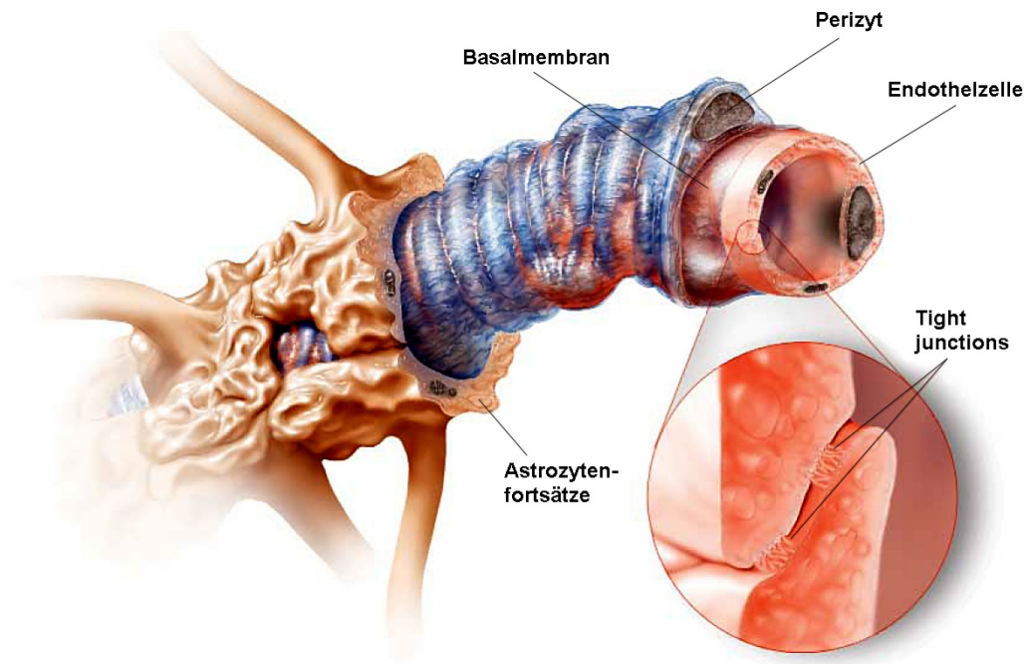
### **1.1. Die Blut-Hirn-Schranke**

Die Blut-Hirn-Schranke ist die physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem. Die Aufgabe der BHS ist es, die Milieubedingungen (Homöostase) im Gehirn aufrecht zu erhalten und sie von denen des Blutes abzugrenzen. Durch spezielle Transportprozesse wird eine konstante Sauerstoff- und Energieversorgung im Gehirn gewährleistet und Stoffwechselendprodukte werden abgeführt. Die BHS schützt das Gehirn nicht nur vor schwankenden Milieubedingungen, sondern auch vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, Toxinen sowie Neurotransmittern und verhindert gleichzeitig die Passage zahlreicher Xenobiotika [10].

Bereits im Jahr 1885 wurden erste Versuche, die auf die Existenz der BHS hindeuteten, vom deutschen Chemiker Paul Ehrlich durchgeführt. Er stellte bei Versuchen mit wasserlöslichen sauren Vitalfarbstoffen fest, dass nach intravenöser Injektion in Ratten alle Organe außer Gehirn und Rückenmark angefärbt wurden [11]. Er interpretierte diese Versuchsergebnisse allerdings falsch, indem er annahm, dass eine geringe Affinität des Gehirngewebes zu den injizierten Farbstoffen zu diesem Resultat führte. Erwin Goldmann, ein ehemaliger Mitarbeiter von Paul Ehrlich, formulierte erstmals 1913 nach weiterführenden Experimenten mit dem Di-Azofarbstoff Trypanblau die Vermutung, dass die BHS eine Schrankenfunktion ausübt [12]. Erst mit der Etablierung der Elektronenmikroskopie konnte die BHS 1967 nachgewiesen und die Barrierefunktion den Endothelzellen der zerebralen Kapillargefäße zugeordnet werden.

### 1.1.1. Aufbau

Endothelzellen, die eng miteinander verknüpft sind, bilden die Innenwand der Gehirnkapillaren. Die Gefäße sind von einer Basalmembran umgeben, die eine Stützfunktion ausübt. An der abluminalen Oberfläche sind die Kapillaren mit Astrozytenfortsätzen und Perizyten besetzt (Abb.2).



**Abb.2: Schematische Darstellung einer Hirnkapillare\*.**

Die BHS wird von den kapillaren Endothelzellen gebildet, die durch Tight Junctions (vergrößerter Ausschnitt) abgedichtet werden. Zusätzlich wird die Funktion der BHS durch Astrozytenfortsätze und Perizyten, die die Endothelzellen umgeben, unterstützt.

\* Modifiziert aus Miller 2002 [13]; © The American Association for the Advancement of Science.

Astrozyten zählen zur Familie der Gliazellen und sind für die physiologische Schrankenfunktion des Gehirns von großer Bedeutung [14]. Es wird vermutet, dass sie durch verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren die spezifischen Eigenschaften der BHS in den Endothelzellen induzieren. Weitere Bestandteile der BHS sind Perizyten und Neuronen (Innervierung der Kapillaren), die sich auf der Basalmembran befinden. Die genaue Funktion der Perizyten an der BHS ist bisher noch unbekannt [15].

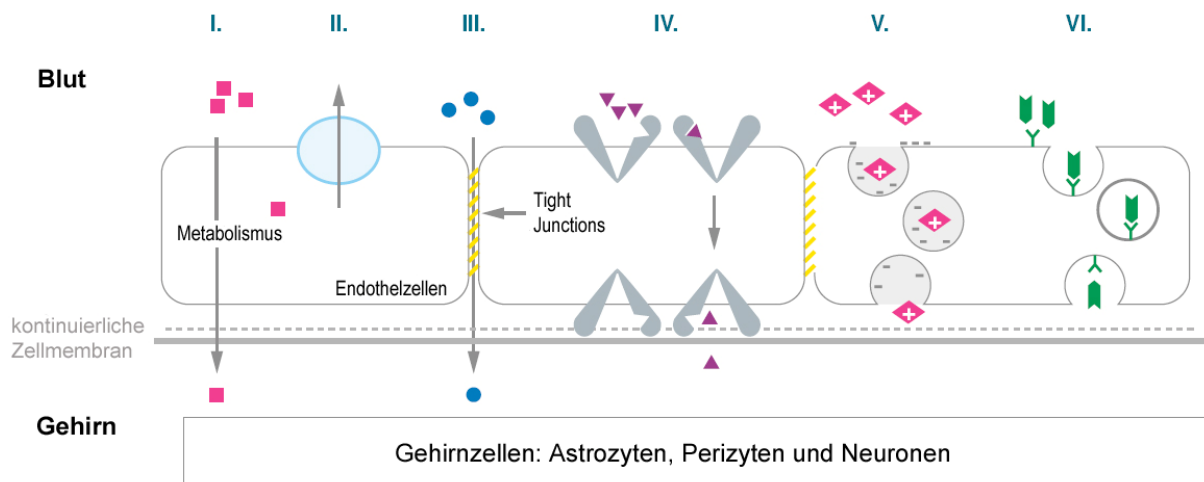
Im Gegensatz zu peripheren Kapillaren weisen Hirnkapillaren keine Fenestrierung auf, sondern sind durch kontinuierliche Zell-Zell-Verbindungen, den Tight Junctions (lat. zonula occludens), verbunden [16,17]. Tight Junctions sind schmale Bänder aus Membranproteinen, wie z.B. Occludin, Claudin-1, oder E-Cadherin, welche durch die Verbindung dieser Bänder benachbarter Zellen einen sehr engen

Kontakt zwischen den Zellmembranen bilden. Dieser lückenlose Verband der Endothelzellen versiegelt die luminalen Seite der Kapillaren und bildet damit eine strikte Trennung zwischen dem Interstitium des Gehirns und dem Blutkreislauf [18].

### 1.1.2. Barrierefunktion

Die physiologische Barrierefunktion der BHS wird durch spezielle morphologische und metabolische Eigenschaften generiert und erlaubt einen selektiven Stoffaustausch zur Versorgung des Gehirns. Gleichzeitig stellt diese Schranke aber auch den Schutz des Gehirns vor Schadstoffen sicher. Eine Übersicht der Transportprozesse an der BHS ist schematisch in Abbildung 3 zu sehen.

Der wichtigste morphologische Bestandteil der BHS ist der kontinuierliche Zellverband der Endothelzellen der Hirnkapillaren. Die Tight Junctions zwischen den Zellen schränken den Transport von niedermolekularen Substanzen stark ein und leisten damit einen wesentlichen Anteil an der Barrierefunktion der BHS.



**Abb.3: Transportprozesse am Kapillarendothel der BHS\*.**

An der BHS laufen verschiedene passive (I, III, V) und aktive (II, IV, VI) Transportprozesse ab, die das Gehirn in einem selektiven Stoffaustausch mit essentiellen Nährstoffen versorgen, Metaboliten entsorgen und es gleichzeitig vor Schadstoffen schützen. Zu diesen Prozessen gehören:

I. Transzelluläre Diffusion, II. Effluxpumpen (Pgp), III. Parazelluläre Diffusion, IV. Transporter-vermittelte Transzytose, V. Adsorptive Transzytose, VI. Rezeptor-vermittelte Transzytose.

\* Modifiziert aus Visser 2004 [19]; © Springer Verlag, Deutschland.

Die transzelluläre Diffusion (I) findet an der luminalen und abluminalen (basalen) Membran des Kapillarendothels statt und gehört zu den passiven Transportprozessen der morphologischen Barriere [20]. Diesen Transportprozess können nur unpolare Stoffe und Lipide nutzen.

Aktive Transportsysteme, die von den Effluxpumpen (**II**), den Multidrug-Resistance-associated Proteinen (MRP 1, 2, 5 und 6, ABC-Transporter-Familie) und dem P-Glykoprotein (PgP, ABC-Transporter-Familie) [21] sowie von den Transportern der SLC-Klasse [22] gebildet werden, sind auf der luminalen Seite der zerebralen Endothelzellen vorhanden und gehören ebenfalls zur morphologischen Barriere der BHS [23]. Diese Pumpen sind für den Rücktransport von lipophilen Stoffen, einschließlich kleiner, lipophiler Arzneistoffe in das Lumen verantwortlich [24]. Das breite Substratspektrum und die hohe Aktivität der Effluxpumpen an den Endothelzellen erklärt, warum nur ca. 5 % der in der CMC-Datenbank (1999) aufgenommenen Wirkstoffe hirngängig sind [25]. Desweiteren wird eine hohe Expression des Multidrug-Resistenz Transporters, der ein breites Substratspektrum für Zytostatika aufweist, an Hirntumorzellen beschrieben [26]. Die sich daraus ergebende unzureichende Konzentration zytostatischer Arzneistoffe im Tumorgewebe führt zu einem verringerten therapeutischen Effekt und stellt ein großes Problem für die Behandlung von Hirntumoren dar.

Die parazelluläre Diffusion (**III**) von Substanzen durch einen Konzentrationsgradienten ist stark eingeschränkt und wird ebenfalls durch Tight Junctions gesteuert. Die starke Isolationsfunktion der Endothelzellmembran wird auch durch einen außerordentlich hohen transendothelialen Widerstand (TER) von bis zu  $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  verdeutlicht [27]. Nur lipophile Moleküle (z.B. einige lipophile Vitamine und Arzneistoffe) und andere Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht ( $< 500 \text{ Da}$ ) sind in der Lage, die BHS auf diese Weise zu überwinden [13]. Kleine polare Substanzen wie Ionen, Ethanol, Glycerin und Harnstoff können mit Hilfe von Aquaporinen durch die BHS diffundieren. In der Regel spielt dieser Transportmechanismus für die Überwindung der BHS von Arzneistoffen aber nur eine untergeordnete Rolle.

Zur Versorgung des Gehirns mit essentiellen Nährstoffen verfügt die BHS über spezifische passive und aktive Transportproteine (**IV**), die einen selektiven Stoffaustausch an den Kapillarendothelien ermöglichen. Der Transport von Glukose, dem Hauptenergielieferanten für das Gehirn, erfolgt passiv über einen Konzentrationsgradienten durch den Glut-1-Transporter (Glucose-Uniporter) [15]. Für die Aufnahme von Aminosäuren stehen verschiedene Transportsysteme zur Verfügung. Das charakteristische Substratspektrum für diese aktiven Transportproteine richtet sich nach den physikochemischen Eigenschaften der Aminosäuren. Große, neutrale und aromatische Aminosäuren sind Liganden für das L-System, während die kleinen, neutralen Aminosäuren durch das A-System transportiert werden. Ein weiterer Transporter, das ASC-System, nimmt spezifisch schwefelhaltige Aminosäuren auf [28]. Saure und kationische Aminosäuren werden von Ionenkanälen und Transportern (Kanalproteine) wie der  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase oder dem  $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$ -Cotransporter befördert.



Ein weiterer wichtiger Transportprozess ist die adsorptive Endozytose (**V**), bei der positiv geladene Substanzen wie kationisiertes Albumin [29] oder Histone [30] mit anionischen Strukturen der Endothelzellmembran reagieren und internalisiert werden. Große und komplexere Moleküle wie das low density lipoprotein (LDL; LRP 1,2-Rezeptor) [31], das Eisen transportierende Transferrin (Transferrin 1,2-Rezeptor, Mellanotransferrin-Rezeptor) [32], das Insulin (Insulin-Rezeptor) [33], das Leptin [34] sowie der Insulin-like growth factor (IGF-1 und IGF-2) [35] werden durch rezeptor-vermittelte Endozytose (**VI**) von den Endothelzellen aufgenommen, in vesikulärer Form (Endosomen, Lysosomen) durch das Zytosol transportiert und an der abluminalen Membran wieder ausgeschleust. Endozytotische Prozesse nehmen die zu internalisierende Substanz durch Einschluss in die Plasmamembran auf (Abb.3, V und VI) [36]. Dieser Aufnahmemechanismus ist durch spezifische Inhibitoren [37] sowie durch niedrige Temperaturen (4 °C) hemmbar [38].

Weiterhin verfügen die zerebralen Endothelzellen über eine sehr hohe Stoffwechsel- und Enzymaktivität, die die metabolische Barriere der BHS ausmachen [39,40]. So können durch eine Reihe von Cytochrom P450 Monooxygenasen, Decarboxylasen, Monoaminoxidasen (MAO) oder  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen aufgenommene Stoffe schnell metabolisiert und damit inaktiviert werden [41].

## **1.2. Arzneistofftransport über die BHS**

Die Therapie von ZNS-Tumoren konnte durch neu entwickelte Wirkstoffe in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Dennoch scheitern 98 % aller therapeutisch wirksamen Substanzen an der Überwindung der BHS [42,43]. Ob eine Substanz die BHS passieren kann, hängt vorwiegend von ihrer Polarität, Größe und Plasmakonzentration ab. Kleinen, bis zu 500 Da schweren lipophilen Molekülen ist es möglich, die zerebrale Endothelzellmembran durch passive Diffusion zu überwinden [20,44,45]. Eine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften von Wirkstoffen dahingehend, dass ein direkter Membrantransport über die Lipiddoppelschicht durch passive Diffusion möglich wäre, ist eine elegante Methode zur Verbesserung der zellulären Aufnahme. Hierzu können polare funktionelle Gruppen eines Arzneistoffmoleküls durch Kopplung mit Acyl- oder Alkylgruppen umgesetzt werden, um die Lipophilie zu erhöhen. Beispielhaft sei hier, aus der Gruppe der Analgetika, das Heroin (Diacetylmorphin) genannt, dass im Vergleich zur Ausgangssubstanz Morphin eine verbesserte Hirngängigkeit aufweist [46].

Die Hirngängigkeit bzw. die Anreicherung von Substanzen im Gehirn ist jedoch nicht nur von deren Polarität oder Größe abhängig. Auch Arzneistoffe, die aufgrund ihrer Eigenschaften theoretisch gut aufgenommen werden, sind, wenn sie Substrate der Effluxpumpe P Glykoprotein (PGP) sind und dadurch aktiv aus der Zelle ausgeschleust werden, nicht oder nur in geringem Maße in der Lage in das Lumen der Endothelzellen einzudringen. Durch eine Kombination dieser Arzneistoffe mit Inhibitoren der PGP Pumpen wie dem Kalziumantagonisten (R)-Verapamil konnte experimentell

gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Steigerung der Aufnahme im Gehirn kommt [47]. Eine weitere Möglichkeit, die Ausschleusung durch Effluxpumpen zu verhindern, ist das Chemical Delivery System. Hierbei sind die aktiven Substanzen ionische Verbindungen, die selbst keine Substrate der PGP und nicht BHS gängig sind. Sie werden in Form von lipophilen Prodrugs appliziert, die nach der Passage der BHS enzymatisch in ihre aktive Form gespalten werden. Diese Methode fand bis jetzt jedoch nur experimentelle Anwendung [48].

Eine Möglichkeit, die BHS zeitweise zu öffnen, ist die invasive Methode der intrazerebroventrikulären Injektion von hyperosmotischen Zuckerlösungen oder biologisch aktiven Substanzen. Hierbei wird eine hyperosmolare Mannitol- oder Arabinoselösung in die Halsschlagader injiziert, wodurch es intrazerebral zu einem Wasserausstritt aus dem Kapillarendothel kommt. Das wiederum führt zu einem Schrumpfen der Endothelzellen und zur osmotischen Öffnung der Tight Junctions. Eine parazelluläre Passage von Substanzen ist für ca. 30 Minuten möglich [49]. Auch eine Injektion des Bradykinin-Rezeptoragonisten RMP-7 (Cereport) führt durch eine Rezeptoraktivierung an der Endothelzellmembran zum Öffnen der Tight Junctions [50]. Weitere biologisch aktive Substanzen die zu einer vorübergehenden Erhöhung der Durchlässigkeit an der BHS führen können sind Leukotriene, Histamin sowie 5-Hydroxytryptamin [51]. Eine invasive Öffnung der BHS birgt jedoch immer ein hohes Risiko, da durch die unspezifische Permeabilitätserhöhung alle im Blut zirkulierenden Substanzen, einschließlich Krankheitserregern, ins Hirn gelangen können und es somit zu einer dauerhaften Neuronenschädigung kommen kann [13,52]. Eine dritte invasive Behandlungsmethode für ZNS-Erkrankungen ist die direkte, intraventrikuläre Injektion in das Putamen des Gehirns wie sie bereits bei Morbus Parkinson Patienten angewendet wurde [53]. Diese Methode ist jedoch sehr umstritten, da sie Infektionen und dauerhafte Schäden im Gehirn verursachen kann. Weiterhin kann eine invasive Anwendung von Arzneistoffen im Gehirn immer nur für die lokale Verabreichung von Pharmaka in einem sehr begrenzten räumlichen Areal eingesetzt werden. Deshalb können diese Applikationen nicht für die Therapie von ZNS-Erkrankungen eingesetzt werden, die größere Hirnareale wie bei diffusen Tumoren und Metastasen, Alzheimer, Multiple Sklerose, lysosomalen Speicherkrankheiten oder Epilepsie umfassen.

Alternativ zu den risikobehafteten und nur beschränkt einsetzbaren invasiven Methoden besteht die Möglichkeit, physiologische Transportmechanismen der BHS zu nutzen. Die Verwendung dieser Transportwege stellt jedoch gewisse Anforderungen an die Wirkstoffe. So müssen diese ein hohes Maß an Ähnlichkeit in ihrer physikochemischen Struktur zu den endogenen Substraten (Aminosäuren, Hexosen, Vitamine, Neuropeptide) aufweisen [54]. Die Verwendung des neutralen Aminosäuretransporters LAT-1 wie im Beispiel des Prodrugs L-Dopa (L-Dihydroxy-phenylalanin) führt zu einer erfolgreichen Behandlung von Morbus Parkinson, was mit dem eigentlichen Wirkstoff Dopamin, ein polares Katecholamin, aufgrund der Schrankenundurchlässigkeit, nicht möglich ist.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Anwendung von Konjugaten. Diese Arzneiformen bestehen aus einer pharmakologisch aktiven Substanz, die kovalent an einem spezifischen Transportvektor, meistens modifizierte Proteine oder monoklonale Antikörper, gebunden ist. Diese „trojanischen Pferde“ nutzen, unabhängig von den physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs, eine rezeptorvermittelte oder adsorptive Endozytose bzw. Transzytose zur Überwindung der BHS und führen somit zu einem Drug Targeting im Gehirn [55]. Dadurch werden die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes und seine therapeutische Effizienz erhöht und gleichzeitig das Nebenwirkungsspektrum reduziert. Modellvektoren wie die murinen, monoklonalen Antikörper Anti-Insulin-Rezeptor-Antikörper 83-14MAb [56,57] und Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper OX-26 [57-59], 8D-3 und R-17217 [60,61] erkennen ein externes Epitop des Zielrezeptors, das auf zerebralen Endothelzellen stark exprimiert wird, binden daran und leiten damit einen selektiven rezeptorvermittelten Transportprozess ein. Eine aktive, rezeptorvermittelte Aufnahme ins Kapillarendothel der BHS kann auch durch modifizierte Peptide, die ein rezeptorspezifisches Substrat wie z.B. LDL imitieren, erreicht werden (LRP1 und LRP2) [62]. Des Weiteren kann die an Hirntumorzellen zu findende Überexpression von Membranrezeptoren wie für Interleukin-13, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (anti-VEGF: Avastin®), HER2/ErbB2/neu (Anti-ErbB2: Herceptin®; small molecule: Tyverb®), Tumor spezifische Antigene (MAGE) oder extrazelluläre Matrixproteine (Chondroitinsulfatproteoglycan) für ein Drug Targeting [63] oder zur Interaktion mit bestimmten Signalrezeptoren genutzt werden [64].

Die adsorptive Endozytose wird durch elektrostatische Interaktionen positiver Proteine mit negativ geladenen Sialinsäure-Resten auf der luminalen Seite oder Heparinsulfat-Gruppen auf der abluminalen Seite der Endothelzellmembran ausgelöst [65]. Dieser Prozess beruht nur auf elektrochemischer Adsorption und bezieht keine spezifischen Plasmamembran-Rezeptoren ein [66]. Für diesen Ansatz können stark kationische Transportvektoren wie kationisiertes Albumin und Peptide der „zellpenetrierenden Klasse“ (Arginin-reiche Tat-Peptide, Penetratin, Pegelin, Syn B1-Peptid) verwendet werden [67-69]. Verschiedenste Moleküle wie Peptide [70], Proteine [71], Oligonukleotide [72], Peptidnukleinsäuren [73] und Trägerstrukturen wie Liposomen [74] und polymere Nanopartikel [75,76] sind mit diesem passiven Target-System bereits effizient in Hirnendothelzellen eingeschleust worden. Eine geringe Selektivität für die BHS und die damit verbundene Toxizität limitieren jedoch die klinische Anwendbarkeit dieser Systeme [77]. Ein weiterer großer Nachteil entsteht durch die notwendige Modifikation der Wirkstoffe mit den als Vektoren verwendeten Proteinen. Somit können chemische und strukturelle Veränderungen von Pharmaka deren Wirkung stark beeinträchtigen und zu unerwünschten Begleiterscheinungen führen. Auch die Modifikation der Targeting-Proteine führt häufig zu einer erhöhten immunologischen Reaktion [54]. Um eine selektive therapeutische Wirkung mit ausreichender Arzneistoffkonzentration am Zielgewebe (Gehirn oder Gehirntumor) zu erreichen, werden verstärkt alternative Wirkstoffträger

und Kombinationen aus vesikulären Trägersystemen mit den oben beschriebenen Transportvektoren untersucht. Solche Trägersysteme wie Liposomen [78,79] oder Nanopartikel [80,81] können aufgrund ihrer hohen Transportkapazität und ihrer Ähnlichkeit zu biologischen Membranen die BHS überwinden und den therapeutischen Effekt erhöhen.

### **1.3. Vesikuläre Trägersysteme**

Die Voraussetzung für einen effektiven therapeutischen Einsatz von Wirkstoffen ist deren Verfügbarkeit am Zielorgan oder -gewebe. Vesikuläre Trägersysteme wie Liposomen, Nanopartikel oder Mizellen ermöglichen es, integrierte Wirkstoffe (z.B. Zytostatika) unabhängig von ihren Eigenschaften über Zellbarrieren zu transportieren [82]. Um die Selektivität dieser Transporter zu erhöhen, können sie durch eine Konjugation mit funktionellen Gruppen, Proteinen oder Molekülen, die ein Targeting zu und eine Aufnahme in die Zielzellen ermöglichen (siehe 1.2.), modifiziert werden. Ein ideales Trägersystem sollte folgende Charakteristika aufweisen: Ausreichende Beladungskapazität mit Wirkstoff, hohe Resistenz gegenüber metabolischem Abbau, niedrige Immunogenität, hohe Selektivität für die Zielzellen, geringe Toxizität und damit ein möglichst geringes Nebenwirkungsspektrum. Zur Entwicklung solcher Trägersysteme stehen unterschiedliche Materialien zur Verfügung. Neben Strukturen, die aus anorganischen Materialien wie aus Kohlenstoff (Fullerene), Silizium (Kieselgel) oder Metallen (Eisen- oder Goldpartikel) aufgebaut sind, werden immer häufiger biologische Materialien wie Lipide, Poly-Laktat oder polymere Kohlenhydrate verwendet, die physiologisch abbaubar sind und somit die Verträglichkeit dieser Transporter erhöhen [83].

#### **1.3.1. Polymere Trägersysteme**

Die Fähigkeit von Nanopartikeln wie Nanopellets oder Nanokapseln mit biologischen Systemen (Zellen, Gewebe) auf molekularer Ebene über Rezeptorinteraktionen zu interagieren, ermöglicht ein breites Anwendungsspektrum dieser Trägersysteme. Wie bei Bhaskar [84] beschrieben, finden sie unter anderem Anwendung als Transporter für biologische Fluoreszenzlabel [85,86], Arzneistoffe und Gen-Therapeutika [87] in speziellen Geweben wie z.B. in das Gehirn [88], als Vektor von DNA-Sonden [89], beim Tissue Engineering (Transfektion) [90], bei der thermischen Tumorerstörung (Hyperthermie) [91] sowie in der Kernspintomographie (MRT) für die Kontrastverstärkung [92]. Nanopartikeln bieten eine ideale Plattform für den Transport von Arzneistoffen über die BHS. Die am häufigsten verwendeten Nanopartikel sind multifunktionelle, polymere feste Matrices (Nanopellets) oder Hüllen (Nanokapseln, Nanosphärchen) aus synthetischen Kunststoffen vom Typ Polyalkylacrylat, -cyanoacrylat, -vinylpyrrolidon oder Acrylpolymere. Diese Trägersysteme weisen eine geringe Größe (<100 nm) auf, sind im Allgemeinen untoxisch, biologisch abbaubar und biokompatibel, haben eine

ausreichende Stabilität im Blutkreislauf und ihre Oberfläche ist für kleine Arzneistoffmoleküle, Peptide, Proteine oder Nukleinsäuren passierbar. Durch eine gezielte Modifikation der Trägersoberfläche mit Hilfe von Liganden besteht sogar die Möglichkeit, einen gezielten Arzneistofftransport (rezeptorvermittelte Endozytose) zu begünstigen [93-95]. Wirkstoffmoleküle können in der festen Matrix bzw. in der Hülle gelöst oder im hochdispersen Zustand eingeschlossen werden. Sie können die Nanopartikel aber auch umhüllen oder an deren Oberfläche adsorbiert werden. Durch die kovalente oder adsorptive Bindung eines Wirkstoffes an ein Polymer kann eine kontinuierliche Freisetzung des Arzneistoffes erfolgen womit eine Depotwirkung erreicht werden kann. Die daraus resultierende längere Blutzirkulation und die langsamere Verstoffwechslung des Wirkstoffes führt zu einer erhöhten Effizienz mit verminderten Nebenwirkungen, was am Beispiel von Paclitaxel-Poly-(D,L-laktat-co-glukonsäure)-Nanopartikeln gezeigt werden konnte [96]. Trägersysteme aus Polyethylvinylacetat wurden bereits als Hirn-Implantate für die lokale Verabreichung von Medikamenten (z.B. Temodar) ins Gehirn eingesetzt. Diese Arzneiform führt dann zu einer begrenzten lokalen Freisetzung des Wirkstoffes am Implantationsort und nicht zu einer globalen Wirkstoffverteilung [97].

### **1.3.2. Oberflächenmodifizierte Nanopartikel**

Einen großen Einfluss auf den Transport von Arzneistoffen durch Nanocarrier ins Gehirn hat die Oberflächenmodifizierung dieser polymeren Systeme. Um eine Oberflächenveränderung zur Kopplung eines Liganden (Drug Targeting) vorzunehmen, stehen verschiedene Beschichtungsmaterialien wie Polysorbat 80 (Tween® 80) oder anderen Polysorbate mit 20, 40 oder 60 Polyethylen-Einheiten und Polyethylenglykol (PEG) zur Verfügung [98]. Diese biokompatible Beschichtung von Nanopartikeln ermöglicht eine Bindung von biologischen Molekülen wie zellpenetrierende Peptide, Tumormarker, Antikörper oder siRNA wie unter 1.2. beschrieben. Des Weiteren dient die Beschichtung von vesikulären Trägersystemen mit Polysorbaten (Tween®) oder PEG dem Schutz vor zu schneller Elimination aus dem Blutkreislauf und führt zu einer Erhöhung der Plasmahalbwertszeit. Die z.B. mit PEG modifizierte Oberfläche des Trägers bildet eine hydratisierte Hülle, wodurch eine Abschirmung vor den Komponenten des monozytären, phagozytierenden Systems (MPS) erfolgt. Weiterhin kann PEG nicht nur zu Modifizierung von Oberflächen dienen, sondern auch selbst Trägersysteme bilden. Amphiphatische PEG-Blockkopolymere bilden in wässrigen Phasen spontan Mizellen aus. Diese Mizellen weisen eine sehr gute Stabilität mit einer hohen Halbwertszeit auf, was durch eine sehr niedrige kritische Mizellbildende Konzentration ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M) charakterisiert ist. Durch ihren Aufbau (hydrophober Kern, hydrophile Hülle) sind diese Systeme besonders zur Verkapselung von lipophilen Substanzen geeignet [99]. Eine Reihe von Wirkstoffen, die in Polysorbat beschichteten Nanopartikeln eingeschlossen wurden, konnten bereits

erfolgreich über die BHS transportiert werden [100,101]. Hierzu zählen das Zytostatikum Doxorubicin [102], der Opioid  $\mu$ -Rezeptoragonist Loperamid [8], der NMDA-Rezeptorantagonist MRZ 2/576 [103], der Nikotinrezeptorantagonist Tubocurarin [104] sowie die Alzheimer-Medikamente Tacrin und Rivastigmin [105]. Weiterhin kann über die Zusammensetzung (Art des Polymers) des Trägersystems eine kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen bei Hirntumoren erreicht werden was mit Paclitaxel beladenen, pH-sensitiven (PolyN, N-Dimethylaminoethylmethacrylat)/2-Hydroxyethylmethacrylat)-Nanopartikeln gezeigt werden konnte [106].

### **1.3.3. Trägersysteme auf Lipidbasis**

Lipidbasierte Nanopartikel stellen alternative Trägersysteme zu den konventionellen, kolloidalen Trägern wie Emulsionen, Liposomen oder Polymer-Partikel dar. In einer umfangreichen Arbeit von Blasi [107] wurden die verschiedenen Formulierungen (SLN, NLC, LDC: siehe folgender Abschnitt) ausführlich beschrieben und unterschiedliche Anwendungsgebiete dieser Nanopartikel, unter anderem für die Behandlung von ZNS Erkrankungen, vorgestellt.

Trägersysteme, die vorrangig aus den Lipiden Phosphatidylcholin und Cholesterol bestehen, zeigen eine geringe Toxizität und Immunogenität, da diese Komponenten gleichzeitig Hauptbestandteil von biologischen Membranen sind. Vorteile von Nanopartikeln, die aus festen Lipiden aufgebaut sind wie feste Lipid-Nanopartikel (SLN, englisch: solid lipid nanoparticles), nanostrukturierte Lipidträger (NLC, englisch: nanostructured lipid carriers) und Lipid-Wirkstoff-Konjugate (LDC, englisch: lipid drug conjugate) [108,109], gegenüber anderen Nanopartikel-Systemen sind die einfache Herstellung in großen Mengen [110] mit einer hohen Beladungskapazität [111] und eine geringe Toxizität [112]. Beispiele für SLN sind Polymer-Lipid-Hybrid-Nanopartikel, nanostrukturierte Lipidträger und lange im Blutkreislauf zirkulierende SLN [113]. Diese Systeme werden bei der Behandlung verschiedenster Erkrankungen und in unterschiedlichen Applikationen, vorrangig aber bei Krebserkrankungen wie Ovarialkarzinom, Brustkrebs oder Leukämie [108] und zur Behandlung von AIDS [114] eingesetzt. Ein großer Nachteil von SLN ist deren geringe physikalische Stabilität, welche ohne die Verwendung von Beschichtungen zu Aggregationen und Gelbildung führt. Liposomale Trägersysteme werden in diesem Kapitel nicht erwähnt, da diese Formulierungen der Hauptbestandteil dieser Arbeit sind und unter 1.3.5. ausführlich beschrieben werden.

### **1.3.4. Dendrimere**

Dendrimere (griechisch: *Dendron* – der Baum) gehören ebenfalls zu den polymeren Trägern. Diese Polymere sind chemische Verbindungen, deren Struktur ausgehend von einem Verzweigungskern stark verästelt ist, wobei man von Dendrimern erst dann spricht, wenn diese Verästelungen aus repetitiven Einheiten bestehen, die eine radiale Symmetrie ergeben. Dendrimere sind aufgrund ihrer

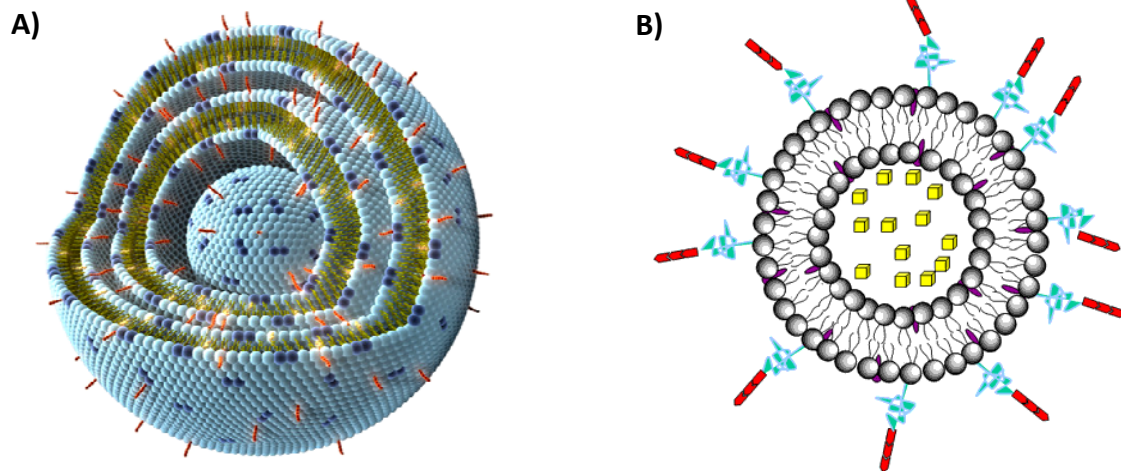
klar definierten Struktur monodispers und zählen zu den Kaskadenpolymeren, wodurch sie sich von klassischen Polymeren unterscheiden. Somit ist es möglich, Nanopartikel mit vielen reaktiven Gruppen, einfach zu modifizierenden Oberflächen und einer definierten Größe herzustellen. Der Einschluss von Substanzen in diese Trägersysteme basiert zum einen auf der vielfachen Funktionalisierung der Oberfläche, an der Wirkstoffe kovalent und adsorptiv gebunden werden können. Zum anderen besteht die Möglichkeit, die unterschiedliche chemische Umgebung des Innenraums auszunutzen, was quasi zu molekularen Kapseln führt, in denen Arzneistoffmoleküle eingelagert werden können [115,116]. Allerdings sind diese Systeme bisher nur experimentell untersucht worden und es ist noch keine Formulierung zugelassen worden.

### **1.3.5. Liposomen**

Liposomen gehören ebenfalls zur Klasse der lipidbasierten Trägersysteme. Diese, analog zu biologischen Membranen aufgebauten Systeme, wurden erstmals 1965 von A.D. Bangham beschrieben [117]. Sie bestehen im Allgemeinen aus amphiphilen Lipidmolekülen, oftmals Phospholipide wie Phosphatidylcholin (PC). Aufgrund ihrer dualen Polarität (polare Phosphat-Kopfgruppe, unpolare Fettsäurereste) bilden diese amphiphilen Moleküle in wässrigen Systemen spontan geordnete, supramolekulare Strukturen wie Mizellen, hexagonale  $H_{II}$ -Phasen, Doppelmembranen oder kolloidale Vesikel. Planare Doppelmembranen sind thermodynamisch instabil, so dass es spontan oder unter Energiezufuhr zur Ausbildung von räumlichen supramolekularen Strukturen (Vesikeln) kommt [118]. Die liposomalen Vesikel bestehen aus einer oder mehreren abgeschlossenen und konisch angeordneten Lipid-Doppelmembranen (Bilayer, Schichtdicke ca. 5 nm), die einen mit wässriger Lösung gefüllten Innenraum umschließen (Abb.4) [119]. Dieser wässrige Kern ermöglicht einen einfachen Einschluss von hydrophilen Wirkstoffen wie Doxorubicin in die Liposomen. Hydrophobe Substanzen wie Paclitaxel wiederum können sehr leicht in die Lipidmembran inkorporiert werden. Somit können Liposomen als biologische Lösungsmittel für hydrophobe Arzneistoffe genutzt werden. Des Weiteren können Substanzen an der Oberfläche der Lipidmembran (innen oder außen) assoziiert werden [120,121]. Diese Beladungsmöglichkeiten machen Liposomen zu einem vielseitig einsetzbaren Arzneistoffträger. In Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Löslichkeitseigenschaften des zu verkapselnden Wirkstoffes und der Lipidmembran können Liposomen nicht nur als reines Trägersystem sondern auch als „slow release“ System (Permeationsbarriere) fungieren, wenn sie den Wirkstoff während der Zirkulation im Blut langsam und gleichmäßig freisetzen und damit als Depot wirken.

Eine generelle Anwendung liposomaler Trägersysteme wird jedoch durch eine teilweise zu geringe Aufnahmekapazität von Wirkstoff in die Vesikel eingeschränkt. Dieser Nachteil resultiert aus dem geringen Innenvolumen, vor allem bei kleinen unilamellaren Vesikeln, das die Einschlusseffizienz für

hydrophile Wirkstoffe begrenzt [122]. Ein weiterer Faktor, der sich ebenfalls nachteilig auf die Beladungskapazität auswirken kann, ist die oftmals geringe Löslichkeit von Wirkstoffen. Durch die Optimierung verschiedener Beladungsmethoden wie dem „remote loading-Verfahren“ konnte dieser Nachteil von Liposomen bereits verbessert werden [123].



**Abb.4: Aufbau von Liposomen mit modifizierter Oberfläche\*.**

**A) Multilamellares Vesikel:** bestehend aus mehreren Lipiddoppelschichten, die von PC (hellblau) und CH (dunkelblau) gebildet werden. Einige Lipidmoleküle sind mit Liganden modifiziert worden (rot).

**B) Unilamellares Vesikel:** bestehend aus einer Lipiddoppelschicht. Es können sowohl hydrophile Substanzen (gelb) im wasserhaltigen Kern von Liposomen als auch lipophile Substanzen (violett) in der Membran verkapselt werden. Eine Modifikation der Oberfläche ist z.B. durch PEG (hellblau) möglich, an das Vektoren gebunden werden können (rot).

\* [124]; © Merck, Deutschland.

Unterschieden werden Liposomen durch ihre Größe und die Anzahl der Lipid-Doppelschichten in multilamellare Vesikel (MLV, Abb.4 A)), große oligolamellare Vesikel (OLV), große unilamellare Vesikel (LUV) und kleine unilamellare Vesikeln (SUV, Abb.4 B); Tab.2).

Bezeichnung	Größe	Bilayerschichten
multilamellare Vesikel (MLV)	100 – 1000 nm	mehrere
große oligolamellare Vesikel (OLV)	> 50 nm	mehrere
große unilamellare Vesikel (LUV)	> 50 nm	eine
kleine unilamellare Vesikel (SUV)	20 -50 nm	eine

**Tab.2: Liposomencharakterisierung.**



Liposomale Arzneistoffformulierungen mit einer Größe von bis zu 200 nm sind für parenterale Anwendungen sehr gut geeignet, da der enthaltene Wirkstoff durch die Verkapselung in den Vesikeln langsamer von der Leber verstoffwechselt wird und damit eine längere Plasmahalbwertszeit aufweist. Diese verlängerte Zirkulationszeit ermöglicht eine verstärkte Anreicherung der Liposomen am Zielorgan (z.B. im Gehirn), wodurch der therapeutische Effekt des Wirkstoffes verbessert wird.

Die physikochemischen Eigenschaften von Liposomen wie Größe, Ladung, Permeabilität und Membranfluidität hängen von ihrer Zusammensetzung und der Herstellungsart ab. MLV entstehen bei der Herstellung mittels Lipidfilm-Hydratation. Durch eine anschließende Ultraschallbehandlung können sich aus großen MLV durch die mechanische Reduktion der Größe und der Lamellenzahl kleine MLV oder bei größeren Ultraschallenergien SUV bilden. Eine alternative Methode zur Herstellung von LUV ist die Extrusion, bei der aber immer ein Dispersionsgemisch aus LUV und OLV entsteht [125].

Die Membranfluidität und damit die Stabilität der Vesikel wird durch die Größe der hergestellten Liposomen sowie durch die Struktur der Phospholipidmoleküle in der Lipiddoppelschicht bestimmt. SUV haben starke Krümmungen in der Lipiddoppelschicht, die Membranspannungen und Deformationen hervorrufen. Aus diesem Grund sind SUV relativ instabil, neigen durch ihren metastabilen Membranzustand zu Fusionen und Wechselwirkungen mit größeren Molekülen und zeigen eine erhöhte Permeabilität für eingeschlossene, hydrophile Substanzen. Im Gegensatz dazu sind LUV aufgrund ihrer Größe in ihrem Membranzustand annähernd spannungsfrei und zeigen eine gute Lagerstabilität [122]. Bei der Membranfluidität spielen sowohl die hydrophile Kopfgruppe als auch die Länge und der Sättigungsgrad der hydrophoben Fettsäurekette (Schwanzgruppe) eine Rolle. Der Ordnungszustand (Membranfluidität) der Lipidschicht ist temperaturabhängig (thermotroper Polymorphismus). Unterhalb der kritischen Phasenübergangstemperatur ( $T_m$ ) befinden sich die Phospholipide der Membran in einem geordneten Zustand (Gelphase). Mit steigender Temperatur (Temperatur  $> T_m$ ) nimmt dieser Zustand an Fluidität und somit an Flexibilität und Eigendynamik zu (flüssigkristalliner Zustand). Eine Herabsetzung der  $T_m$  kann durch die Verwendung von Lipiden wie PC, Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) oder Sphingomyelin (SM), die ungesättigte Fettsäuren (Ölsäure, Linolsäure oder Linolensäure) enthalten, erreicht werden [126]. Der Einbau von Cholesterol (CH) in die Lipidmembran erhöht dagegen die  $T_m$  aufgrund seiner sterischen Struktur durch die Einschränkung der Beweglichkeit der Fettsäureketten. Eine Modifikation der Membranoberfläche der Liposomen, z.B. durch Polyethylenglykol (PEG), führt nicht nur zu einer Erhöhung der Lagerstabilität, sondern spielt auch bei der klinischen Anwendung eine wichtige Rolle, da die Plasmahalbwertszeit für diese Vesikel deutlich erhöht werden kann [127]. Die so sterisch stabilisierten Vesikel (Stealth-Liposomen) sind durch die PEG-Moleküle abgeschirmt und es kommt zu einer verringerten Interaktion mit Blutbestandteilen wie z.B. Oponinen, Albumin,

Immunglobulinen, Komplementfaktoren oder Fibronectin. Somit werden diese Vesikel nicht so schnell von den Zellen des Immunsystems/MPS erkannt und zirkulieren länger im Blutkreislauf.

Liposomale Formulierungen eignen sich aufgrund ihrer Eigenschaften wie: kleiner Durchmesser, einheitliche Größenverteilung der Vesikel, gute Lagerstabilität (ausgenommen SUV), geringe Toxizität (Immunogenität), gute Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit (Metabolisierung) sehr gut als Trägersysteme für Arzneistoffe. Ein weiterer Vorteil ist die mögliche, auch simultane Beladung mit hydrophilen und hydrophoben Wirkstoffen.

Liposomale Trägersysteme können durch verschiedene Aufnahmemechanismen in Zellen aufgenommen werden [128,129]. Eine passive Anreicherung von unveränderten, liposomalen Vesikeln ist oftmals durch den EPR-Effekt (englisch: *enhanced permeability and retention* = „erhöhte Permeabilität und Retention“) in Tumorgewebe zu finden, da sie bei ausreichender Zirkulation im Blutkreislauf das ungeordnete Kapillarsystem im Tumor passieren und ins Gewebe penetrieren können [130]. Bei unspezifischen Wechselwirkungen mit biologischen Membranen kann es zur adsorptiven Endozytose, zum Lipidaustausch mit der Zellmembran oder zur Membranfusion kommen. Welcher dieser Aufnahmemechanismen vorherrscht, hängt vorwiegend von der Ladung, der Größe und der Zusammensetzung der Liposomen ab [131,132]. Die Freisetzung des Wirkstoffes in den Zielzellen erfolgt durch enzymatischen Abbau, pH-Änderungen (in Lysosomen) oder Temperaturänderungen.

Obwohl die großtechnische Herstellung von Liposomen immer noch einen relativ großen technischen Aufwand voraussetzt, gibt es eine Reihe von Liposomenformulierungen zur parenteralen Behandlung von Tumorerkrankungen, die bereits sehr erfolgreich auf dem Markt sind. Dazu zählen Caelyx® (Doxorubicin), Myocet® (Doxorubicin), Doxil® (Doxorubicin) und DaunoXome® (Daunomycin). AmBisome® (Amphotericin B) und Abelcet® (Amphotericin B) werden zur Behandlung von invasiven Mykosen (Candidiasis) verwendet. Eine weitere liposomale Formulierung die parenteral angewendet wird ist der Impfstoff Epaxal-Berna (Hepatitis A).

Weitere Anwendungsgebiete von liposomalen Formulierungen finden sich in der topischen Anwendung (Pevaryl®-Lipogel, Hepaplus®30 Emgel, Herarin PUR/-forte, Hametum® Creme), der medizinischen Diagnostik, der analytischen Biochemie, in der Genforschung, der Lebensmittelindustrie und in der Kosmetik [118].

#### **1.4. Zielgerichtete Anwendung von Liposomen**

Viele Trägersysteme, u.a. Liposomen, reichern sich relativ unspezifisch im Organismus an [132]. Um einen Vorteil auszuweisen sollten sich wirkstoffhaltige Liposomen spezifisch im Zielgewebe

anreichern und somit zu einer erhöhten therapeutischen Effizienz und einer Verringerung der Nebenwirkungen führen. Liposomen, die ein passives Targeting [133], eine sterische Stabilisierung [134,135] oder eine spezielle Lipidzusammensetzungen [136] haben, können bei der Behandlung von Tumoren und Infektionsherden eingesetzt werden, da diese eine erhöhte Kapillarpermeabilität und einen verringerten Abtransport der Vesikel über das Lymphsystem (EPR-Effekt) aufweisen. Um ein gewebespezifisches aktives Targeting zu erhalten ist eine Oberflächenmodifikation der Liposomen mit meist kovalent gebundenen und zielortspezifischen Vektoren erforderlich [137]. Als Vektoren werden hauptsächlich Proteine (Antikörper) und Peptide verwendet, die von spezifischen Zelloberflächenstrukturen, z.B. Rezeptoren, erkannt werden.

Damit ein aktives Targeting erfolgreich ist, müssen Oberflächendeterminanten (z.B. Rezeptoren) auf den Zielzellen der betroffenen Gewebe spezifisch exprimiert werden bzw. stärker exprimiert werden als in anderen Geweben oder Organen. Die erhöhte Expression des low density lipoprotein Rezeptors (LDLR) am Kapillarendothel der BHS [43], unter pathologischen Bedingungen exprimierte Adhäsionsmoleküle in Entzündungsarealen [138] oder tumorspezifische Antigene [139,140] sind Beispiele dafür.

Antikörpermodifizierte Liposomen (Immunoliposomen) wie der liposomale Nanocarrier MM-398 mit einem CTP-11 Targeting (klinische Phase II, Merrimack® Pharmaceuticals) werden bereits in klinischen Studien zur Tumorthherapie eingesetzt [141-143]. Ein Drug Targeting mit kleinen Peptiden als Vektor wurde ebenfalls erforscht. Hierfür wurde das RGD-Peptid zur Angiogeneseinhibition [144], das Fibrosarkom-spezifische YIGSR-Peptid [145], das den in Brustkrebszellen überexprimierten VIP-Rezeptor erkennende VIP-Peptid [146], der Wachstumsfaktor-Antagonist G [147] beim kleinzelligen Lungenkarzinom und das als Substrat für den LRP2 Rezeptor in zerebralen Endothelzellen fungierende Angio-Pep1-Peptid [148], verwendet.

Da noch nicht viele detaillierte Erkenntnisse über die Transportsysteme an der BHS bekannt sind, stehen nur sehr eingeschränkt vektorvermittelte Transportliposomen zur Verfügung [149]. In Tabelle 3 sind liposomale Systeme mit zumeist kovalent gebundenen Vektoren zusammengefasst, die einen Transport über die BHS ermöglichen sollen.

Die für den vesikulären Transport am besten charakterisierten spezifischen Rezeptoren sind der Insulin- und der Transferrin-Rezeptor. Beide Systeme führen zu einer rezeptorvermittelten Aufnahme von Trägersystemen in Hirnkapillaren. Es wurden, basierend auf diesen Aufnahmemechanismen, bereits einige Vektorformulierungen zur Therapie von ZNS Erkrankungen gefunden [149,150] (Tab.3). Dennoch sollten weitere, spezifisch an der BHS exprimierte Rezeptoren hinsichtlich ihrer Transportfähigkeit für Nanocarrier erforscht werden. Ein vielversprechendes Beispiel für einen

vektorvermittelten Transport über die BHS ist der LDL Rezeptor und dessen Rezeptor-Familie, da über diesen rezeptorvermittelten Transportweg bereits Arzneistoffkonjugate (ANG1005, ANG1007, ANG1009 von Angiochem) die BHS überwinden konnten und somit zur Therapie von Glioblastomen in klinischen Studien eingesetzt wurden [151]. Gerade für liposomale Formulierungen ist dieser Transportmechanismus geeignet, da Liposomen aufgrund ihres chemischen Aufbaus und ihrer Struktur eine Homologie zum natürlichen Liganden des LDLR, dem LDL, aufweisen.

Zielstruktur	Vektor	Transportmechanismus	Literatur
<i>Insulin-Rezeptor</i>	anti-Insulin-Rezeptor-AK	rezeptorvermittelte Transzytose	[149,152]
<i>Transferrin-Rezeptor</i>	anti-Transferrin-Rezeptor-AK (OX26) Transferrin Horseradish Peroxidase (HRP) anti-Transferrin-Rezeptor-AK (8D-3)	rezeptorvermittelte Transzytose	[153-155] [150,156-158] [159] [160]
<i>Lactoferrin-Rezeptor</i>	Lactoferrin	rezeptorvermittelte Transzytose	[161]
<i>Folat-Rezeptor</i>	Folat	rezeptorvermittelte Transzytose	[162,163]
<i>anionische Membran</i>	kationisches Albumin	adsorptive Transzytose	[164,165]
<i>EGFR-Rezeptor</i>	anti-EGFR-AK	rezeptorvermittelte Transzytose	[166]
<i>Interleukin 13-Rezeptor</i>	Interleukin 13	rezeptorvermittelte Transzytose	[167]
<i>Leptin-Rezeptor</i>	Leptin-Derivat-Peptid (Lep(70-89))	rezeptorvermittelte Transzytose	[168]
<i>Bradykinin-Rezeptor</i>	RMP7-Peptid	Öffnung der Tight Junctions	[169]
<i>Efflux Pumpen</i>	Tamoxifen	Blockierung von PGP oder MDR- Protein	[158,170,171]
<i>GLUT (Glukose-Transporter)</i>	Glycosyl derivatisiertes CH	Transport über Ionenkanal	[172]
<i>Endothelzellen</i>	Weizenkeim Agglutinin	Endozytose	[170]

**Tab.3: Vektorbasierte Liposomen für einen Arzneistofftransport über die BHS.**

## 1.5. LDL Rezeptoren

Zur low density lipoprotein Rezeptor (LDLR) Gen Familie gehören mehrere Transmembranproteine wie der LDL Rezeptor (LDLR) [173], das LDLR related protein (LRP1) [174], das GP 330/Megalin (LRP2) [175], der very low density lipoprotein Rezeptor (VLDL R) [176], der Apolipoprotein E Rezeptor II (ApoE R II) [177], das multiple EGF (epidermal growth factor)-repeat-containing Protein 7 (MEGF 7), sowie LRP 5 und LRP 6 [178].

Strukturell bestehen die Proteine dieser Rezeptorfamilie aus vier Grunddomänen: Der extrazellulären, cysteinreichen Ligandenbindungsdomäne (Complement Type Repeat), der epidermalen Wachstumsfaktor-Vorläufereinheit (Growth Faktor Repeats), die für die pH-abhängige Dissoziation von Liganden in Endosomen essentiell ist, der Transmembrandomäne und der intrazellulär liegenden Domäne mit NPXY-Motiv, die die Internalisation von Liganden über Clathrin-coated Pits reguliert.

Der LDLR wird ubiquitär auf fast allen Zellen exprimiert. Seine Hauptfunktion besteht in der Bindung und Aufnahme von CH reichen Lipoproteinen mittels clathrinvermittelter Endozytose. Andere Mitglieder dieser Rezeptorfamilie sind jedoch auch für weitere zelluläre Prozesse wichtig wie z.B. die Signalübertragung bei der Migration von Neuronen [179] oder die Kontrolle der Vitamin D3- und Vitamin A-Homeostase [180] und nur auf ausgewählten Zell- oder Gewebetypen präsent.

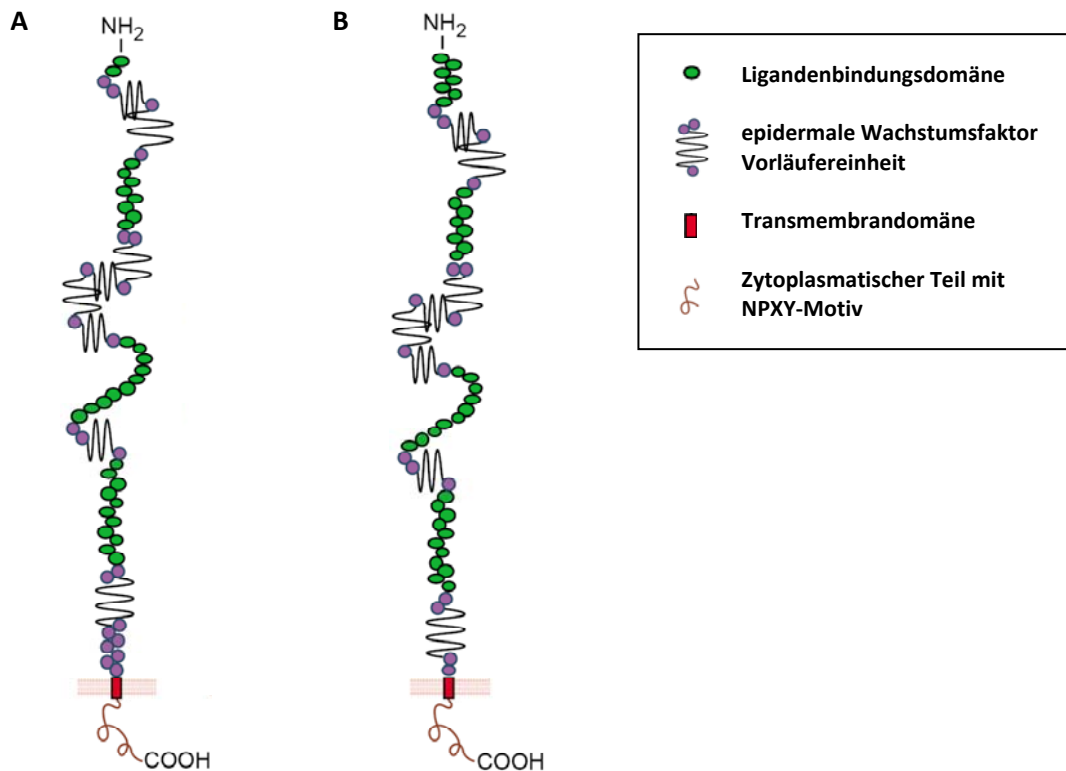
### 1.5.1. LDL Rezeptor related Protein (LRP1 / LRP2)

Ein rezeptorvermittelter Arzneistofftransport über die BHS kann durch die Rezeptoren LRP1 und LRP2 (Megalin oder Glykoprotein 330) in gleicher Weise wie beim Insulin- und Transferrin-Rezeptor induziert werden. Diese multifunktionalen Rezeptoren (LRP1 / LRP2) sind strukturell eng miteinander verwandt und gehören zu den größten Proteinen der LDL Rezeptorfamilie (Abbildung 5) [31].

Exprimiert wird der 600 kDa schwere LRP1 vorwiegend auf Parenchymzellen der Leber, am Herz, an der Lunge und auf mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen aber auch im Gehirn auf Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen des Cerebellum sowie auf Hirntumorzellen [181]. Der LRP2 (ca. 600 kDa) ist unter anderem auf Ependymzellen und dem Plexus choroideus der Hirnventrikel, am proximalen Tubulus und auf Nervenzellen zu finden. Die Hauptfunktion dieser Clearance-Rezeptoren ist die Beseitigung von Chylomikronresten [182] und  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Proteinase-Komplexen aus dem Blut [183].

Das gemeinsame Ligandenspektrum für beide multifunktionalen Rezeptoren umfasst eine sehr große Anzahl von Liganden wie Lipoprotein-Lipase (LPL),  $\alpha$ 2-Makroglobulin ( $\alpha$ 2M) [185], Lactoferrin, Gewebe- und Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (tPA / uPA), Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-

1) und tPA / uPA : PAI-1-Komplexe [186]. Ein weiterer Ligand, das sogenannte „Receptor Associated Protein“ (RAP), ist in der Lage, die Bindung aller anderen Liganden an LRP zu inhibieren und scheint somit ein regulatorisches Protein der Ligandenbindung zu sein [187].



**Abb.5: Schematische Darstellung der Domänenanordnung des LRP1 und des LRP2 Rezeptors\*.**

Alle Rezeptoren der LDL Gen Familie zeigen eine Homologie in der Struktur und Anordnung der Domänen. Diese strukturellen Ähnlichkeiten sind besonders hoch bei den Rezeptoren LRP1 (A) und LRP2 (B) ausgeprägt, wodurch auch ein ähnliches Substratspektrum erklärt werden kann.

\* Modifiziert aus Nykajaer 2002 [184]. © Elsevier Ltd.

Liganden, die an LRP1 binden sind vorwiegend Proteine, die eine Kunitz-Typ-Domäne enthalten wie Aprotinin, Amyloid- $\beta$ -Vorläuferprotein (APP) oder Faktor VIIa / Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI) und somit eine rezeptorvermittelte Endozytose auslösen. Weitere bedeutende Liganden des LRP1 sind beispielsweise Melanotransferrin (P97) [9] oder Apolipoprotein-E (ApoE). Zu den Substraten, die LRP2 aktivieren, gehören Apolipoprotein-J (ApoJ), ApoE, ApoB100, Aprotinin und very-low density-lipoprotein (VLDL) [188].

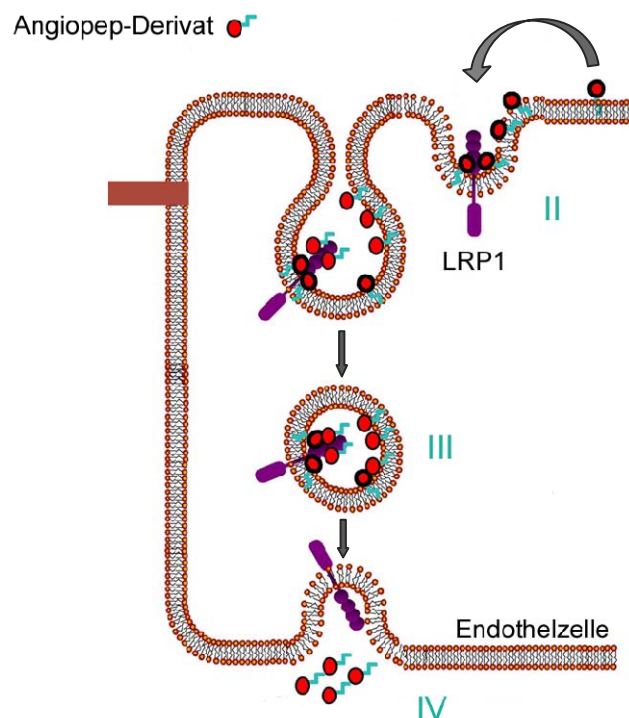
Aufgrund der zahlreichen Liganden, die einen endozytotischen Aufnahmemechanismus an LRP1 und LRP2 auslösen können und der Expression dieser beiden Rezeptoren im Gehirn, bietet sich die Entwicklung neuer Therapeutika unter Verwendung von Substrathomologa dieser Liganden als Vektoren für die Überwindung der BHS besonders an.

### 1.5.2. Targeting-Strategien für die Überwindung der BHS mittels LRP1 / LRP2

Im nachfolgenden Abschnitt werden beispielhaft zwei Möglichkeiten für ein Targeting des LRP1 oder des LRP2, die zu einem gezielten Wirkstofftransport über die BHS führen, vorgestellt.

Die Verwendung von Melanotransferrin als Vektor für Wirkstoffe (melanotransferrinvermittelte Drug-Targeting-Technologie = NeuroTrans™) führt zu einer rezeptorvermittelten Transzytose über den LRP1. Konjugate mit Melanotransferrin und dem Zytostatikum Adriamycin führten zu einer Reduktion des Hirntumors in der Maus [189]. Des Weiteren ist Melanotransferrin ein Tumor-Marker-Protein und wird auch in Hirnläsionen bei Morbus Alzheimer exprimiert, wodurch es auch als potentieller Marker für diese Erkrankung eingesetzt werden kann [190,191].

Eine weitere Targeting Strategie bilden funktionelle Kunitz-Domänen enthaltende Peptide, wie Angiopeps (z.B. Angiopep-1- und Angiopep-2-Peptide), die Sequenzen spezifischer Liganden des LRP1 Rezeptors imitieren. Diese Peptide konnten als Vektoren einen aktiven und endozytotischen Transport von Substanzen über die BHS vermitteln (Abbildung 6), wobei die primäre Sequenz und die Ladung der Angiopep-Derivate eine entscheidende Rolle spielten [148].



**Abb.6: LRP1 rezeptorvermittelte Aufnahme von Angiopep-Derivaten am Kapillarendothel\*.**

Angiopep-Derivate werden in einem mehrstufigen, rezeptorvermittelten Prozess von der luminalen Seite der Endothelzellen zur abluminalen Seite transportiert.

I. Interaktion mit der Zellmembran II. LRP1 rezeptorvermittelte Endozytose III. Internalisation und Transzytose IV. Freisetzung

\* Modifiziert aus Bertrand 2010 [192]; © John Wiley Sons, UK.

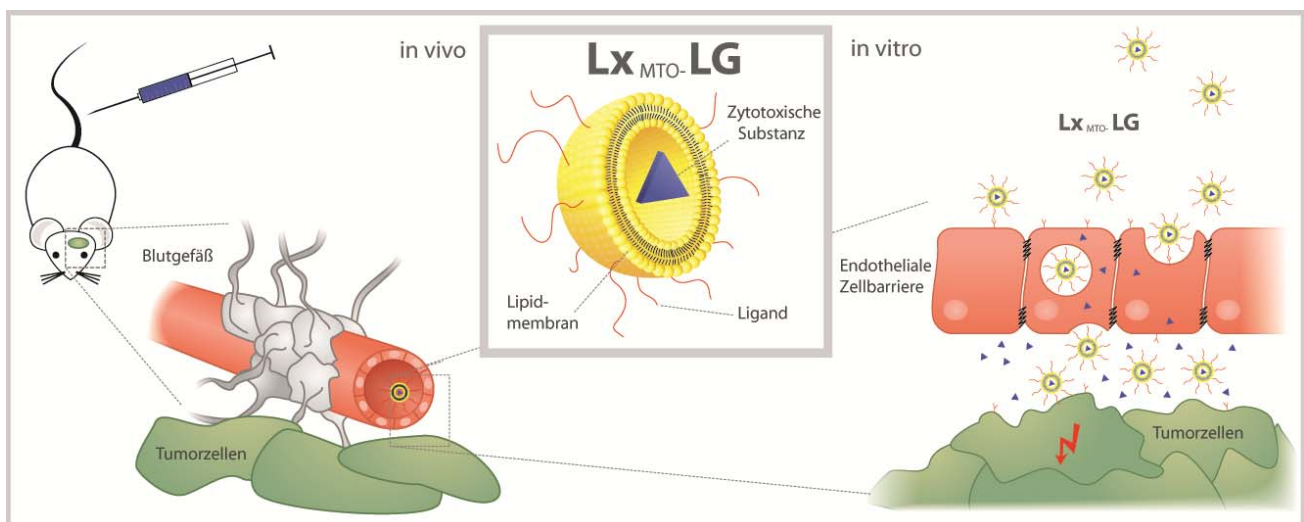
In experimentellen Untersuchungen zur Bindungsoptimierung dieser Vektor-Familie wurde ein sehr vielversprechendes Peptid (Angiopep-2) identifiziert, das aus einer 19-Aminosäure-Sequenz besteht, die von der Kunitz-Domäne des LRP-1-Liganden Aprotinin abgeleitet wurde [193]. Durch die direkte Konjugation der Zytostatika Paclitaxel (ANG1005) [194], Doxorubicin (ANG1007) und Etoposid (ANG1009) [195] an Angiopep-2 konnte eine größere Aufnahme des Wirkstoffes im Vergleich zum unkonjugiertem Wirkstoff im Hirnparenchym und damit ein verbesserter therapeutischer Effekt bei der Behandlung von Hirntumoren (Erhöhung der Lebensdauer um 15 % bei Glioblastom) und Hirnmetastasen (Erhöhung der Lebensdauer um 18-27 % bei Lungenkarzinom-Metastasen) *in vivo* (Ratte) erzielt werden [196].



## 1.6. Zielsetzung

Liposomale Formulierungen sind seit der Markteinführung von DaunoXome® im Jahr 1995 für die Therapie von Krebserkrankungen in der Klinik zugelassen, da diese lipophilen Wirkstoffsysteme aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften einen verbesserten therapeutischen Effekt („slow release“ Effekt) gegenüber den freien Wirkstoffen bewirken können. Gelingt es durch die Verwendung von oberflächenmodifizierten liposomalen Trägersystemen internalisierende Rezeptoren auf Organen oder an Zielgeweben zu aktivieren, könnte der, durch eine liposomale Depotwirkung entstandene, therapeutische Effekt noch durch einen aktiven Aufnahmemechanismus (Endozytose) verstärkt werden.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war die Entwicklung und Herstellung eines effektiven liposomalen Transportsystems für Zytostatika zur Behandlung von Hirnmetastasen durch eine verbesserte Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (Abb.7). Neben der Optimierung der Membran-eigenschaften der Vesikel („slow release“ Effekt) sollte für die Verbesserung des Transportes über diese Barriere auch ein aktives Targeting zur BHS genutzt werden, wodurch eine Anreicherung der Liposomen in ausreichender Konzentration am Zielort erreicht werden sollte.



**Abb.7: Graphische Darstellung der Zielsetzung dieser Arbeit.**

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden oberflächenmodifizierte Liposomen entwickelt, die an einen Vertreter der LDL Rezeptorfamilie, den LRP1, im Gehirn binden sollen, um einen endozytotischen Transport über die Zellbarriere zu vermitteln. Hierfür scheint der Einsatz von Peptiden wie die der Angiopep-Familie als Ligand für liposomale Vesikel erfolgversprechend. Angiopeptide wurden vom LRP spezifischen Aprotinin abgeleitet und können ein rezeptorvermitteltes Targeting an der BHS bewirken. Weiterhin kann eine erhöhte Expression von LDL-Rezeptoren an den Endothelzellen der

Gehirnkapillaren, welche den Hauptbestandteil der BHS ausmachen, zu einer Endozytose der Liposomen und damit zu einem verbesserten Transport über diese Schranke beitragen. Ein solches Wirkstoffsystem könnte die Grundlage für eine Plattformtechnologie bilden, mit der es möglich sein sollte, eine Vielzahl von Arzneistoffen aktiv ins Gehirn zu transportieren.

Zum Erreichen des Forschungsziels der vorliegenden Arbeit wurden Liposomen hergestellt, charakterisiert und anschließend in *in vitro* und *in vivo* Experimenten getestet.

Einführend wurden die Membraneigenschaften liposomaler Trägersysteme ausführlich untersucht, die eine passive Überwindung von zellulären Barrieren, unter anderem der BHS, ermöglichen. Damit sollte eine Verbesserung des Wirkstofftransports bei therapeutischen Anwendungen erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden über 25 verschiedene liposomale Formulierungen hergestellt und charakterisiert. Anschließend wurden mit diesen Vesikeln qualitative und quantitative Internalisierungsuntersuchungen an einem *in vitro* Schrankenmodell durchgeführt.

Folgende Schwerpunkte wurden hierbei behandelt:

- Optimierung der Herstellung und Charakterisierung liposomaler Formulierungen hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften (Größe, Beladungskapazität, Langzeitstabilität und Stabilität im biologischen Milieu),
- Untersuchung und Charakterisierung der Internalisierung der unterschiedlichen, mit einem Fluoreszenzmarker beladenen Liposomenformulierungen ohne Oberflächenmodifizierung an einem Zellschrankenmodell hinsichtlich der Effizienz ihrer zellulären Aufnahme und ihres transzellulären Transportes.

In den darauf aufbauenden Studien wurden neue ligandenbesetzte Liposomen hergestellt und mit Hinblick auf eine mögliche Anwendung zur Überwindung der BHS charakterisiert. Hierzu wurden oberflächenmodifizierte Liposomen (Trojan Horse Liposomen, THL) entwickelt, die über ein aktives Targeting-System den Wirkstofftransport durch die BHS erhöhen und damit zu einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten von Hirntumoren/-metastasen führen sollen. Hierfür wurden ebenfalls qualitative und quantitative Internalisierungsuntersuchungen an einem *in vitro* Schrankenmodell durchgeführt. Der therapeutische Effekt, die Verträglichkeit und die pharmakologische Eignung dieser liposomalen Wirkstoffsysteme wurde *in vivo* im Mausmodell für Hirnmetastasen untersucht.

Schwerpunkte dieser Studien waren:

- Auswahl und Optimierung einer technologischen Herstellungsmethode für die Bindung eines Peptid-Liganden an ausgewählte Liposomen für ein aktives Targeting,

- Testung der THL *in vitro* zum Nachweis ihrer Bindungsfähigkeit, der intrazellulären Anreicherung, der Effizienz des transzellulären Transportes und ihrer zytotoxischen Wirksamkeit an verschiedenen Zelllinien (MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3),
- Therapeutische Studien der ligandenbasierten und arzneistoffbeladenen Liposomen in einem Hirnmetastasenmodell (humanes Mammakarzinom) in der Nude-Maus,
- Pharmakokinetische Studie zur Charakterisierung der Arzneistoffverteilung im Organismus.

Mit diesen Schwerpunkten sollte ein Bogen von der technologischen Entwicklung, über die *in vitro* hin zur *in vivo* Testung dieses liposomalen Trägersystems gespannt werden und eine mögliche Eignung für die humanmedizinische Anwendung geprüft werden.

## II. Material

Im folgenden Abschnitt sind alle verwendeten Materialien und deren Bezugsquellen angegeben:

### *Lipide*

Cholesterol (CH)	Serva (Heidelberg)
Dicetylphosphat (DCP)	Serva (Heidelberg)
Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
1,2-Dioleyl-s,n-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N-Methyl-(polyethylenglycol) <sub>2000</sub> -1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphatidylethanolamin (PEG-PE)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
4-((Hydroxy(octadecyloxy)phosphinyl)oxy)-1,1-dimethylpiperidin-1-ium-4-yl-phosphat (OPP oder Perfosine)	ASTA Medica (Frankfurt)
Phosphatidylcholin (PC)	Lipoid (Heidelberg)

### *Spin-Sonden*

5-Doxylpalmithoylester (MeFASL (10,3))	S. Pečar (Universität Ljubljana, Slovenien)
12-Doxylpalmithoylester (MeFASL (2,11))	S. Pečar (Universität Ljubljana, Slovenien)

### *Reagenzien und Lösungsmittel*

Acetonitril (Reinheit für HPLC)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ameisensäure (50%)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumcitrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumformiat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ascorbinsäure	Merck (Darmstadt)
Calcein	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Calcein-AM Solution	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dichlormethan (Reinheit für HPLC)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure (konzentriert)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hexan (Reinheit für HPLC)	Merck (Darmstadt)

Hexansulfonsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol (99,9%, Reinheit für HPLC)	Merck (Darmstadt)
Mitoxantron (2mg/ml, Injektionslösung)	Hexal (Holzkirchen)
Natronlauge (1M)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Paraformaldehyd (4%)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Rattenschwanzkollagen R (10%)	Serva (Heidelberg)
Salzsäure (1M)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### ***Verbrauchsmaterialien***

HPLC Vials (2ml)	Agilent (Böblingen)
Mikrotiterplatten (schwarz)	Nunc GmbH (Wiesbaden)
Mikrotiterplatten (transparent)	Becton Dickinson (Meylan Cedex, Frankreich)
Nucleopore® Polykarbonat-Filter (0.1, 0.2 und 0.4 µm)	Whatman (Maidstone, UK)
Zellkultur-Transwelleinsätze	Millipore (Schwalbach)

### ***Histochemische Färbereagenzien***

Bisbenzimid 33258 (Hoechst 33258)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Trypanblau	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
MitoTracker® Orange	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
β-Actin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
goat anti-mouse (115-165-146)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

Alle für die Dünnschichtchromatographie (HPTLC) verwendeten Lösungsmittel sowie die verwendeten Silica-Gel 60 Platten (Abmessungen: 20\*10 cm; 0,25 mm Gelschichtdicke) wurden von Merck (Darmstadt) erworben.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze für Zellkulturen wurden von Invitrogen GmbH (Darmstadt), Gibco (Darmstadt) und Biochrom (Berlin) bezogen. Das verwendete Verbrauchsmaterial für Zellkulturarbeiten wie Pipetten, Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup>) bzw. -platten (6 Wells, 12 Wells, 24 Wells, 96 Wells mit Fachboden oder Rundboden) und Zentrifugenröhrchen (2ml, 10ml, 50ml) wurden von Sarstedt (Nürnberg), Eppendorf (Hamburg), Biochrom (Berlin) und Becton Dickinson (Meylan Cedex, Frankreich) erworben.

Die Herstellung von destilliertem bzw. bidestilliertem Wasser erfolgte mit einer Millipore®-Anlage (Millipore, Schwalbach).

### **Liganden und Modellkomponenten**

Der Ankerligand Chol-19-mer-Peptid (**1**), der Fluoreszenz-markierte Ligand 5-Fluo-19-mer-Peptid (**2**) und das Fluoreszenz-markierte Ankermolekül Chol-5-Fluo-Derivat (**3**) wurden von der Biosyntan GmbH (Berlin) synthetisiert. Hierbei ist nach der Fmoc/But-Strategie [197] vorgegangen worden, wofür ein Peptid-Syntheseautomat von SYRO (MultiSynTec GmbH, Witten) und eine PSSM-8 Anlage (Shimadzu, Duisburg) verwendet wurden. Die Aufreinigung der synthetisierten Peptide erfolgte mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) Anlage LC-9A (Shimadzu, Duisburg), ausgestattet mit einer Ultrasep ES RP-18 Säule und einen Photodiodendetektor SPD-M6A (Detektion bei 220 nm). Die Reinheit der einzelnen Peptide lag zwischen 60 und 70 % für **1**, zwischen 90 und 95 % für **2** und bei 90 % für **3**. Die gereinigten Produkte wurden anschließend lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Aufgrund des geringen Reinheitsgrades von Peptid **1** ist davon auszugehen, dass sich noch Nebenprodukte der Synthese im Lyophilisat befinden, die die Herstellung oberflächenmodifizierter Liposomen eventuell beeinflussen könnten. Die chemische Zusammensetzung, die Eigenschaften und die Verwendung der oben genannten Liganden, Ankermoleküle und Ankerliganden sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Nr.	Bezeichnung	Struktur	Molekulargewicht theoretisch/real [g/mol]	Reinheit [%]	Verwendung
<b>1</b>	Chol-19-mer-Peptid	CHSU-TFFYGGSRGKRNNF KTEEY-Amid x TFA	2769.3 / 2770.2	60-70	Ankerligand für <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Versuche
<b>2</b>	5-Fluo-19-mer-Peptid	5-Fluo-Ahx-TFFYGGSRGKRNNF KTEEY-Amid x TFA	2772.0 / 2772.7	90-95	fluoreszenzmarkierter Ligand für FACS-Analyse
<b>3</b>	Chol-5-Fluo-Derivat	CHSU-PEG2-PEG2-Lys (5Fluo)- Amid x TFA	1262.6 / 1263.9 - 1266.1	90	fluoreszenzmarkiertes Ankermolekül für PIT- Optimierung

**Abkürzungen:** **CHSU:** Cholesterolemisuccinat  
**5-Fluo:** 5-Carboxyfluorescein  
**Ahx:** 6-Aminohexanbonsäure

**PEG:** Polyethylenglycol  
**TFA:** Trifluoroacetylsäure

**Lys:** Lysin

**Tab.4: Liganden und Modellkomponenten zur Herstellung oberflächenmodifizierter Liposomen.**



### III. Methoden

#### 3.1. Liposomenpräparation

Liposomale Vesikel wurden in einem mehrstufigen Verfahren hergestellt. Die Zusammensetzung der einzelnen Formulierungen ist in *Tabelle A* im Anhang zusammengefasst. Tabelle 5 zeigt die molare Zusammensetzung von fünf ausgewählten liposomalen Formulierungen (**L1-L5**), die in dieser Arbeit genauer untersucht wurden.

Bezeichnung	PC	CH	DCP/DDAB	OPP	DOPE	PEG-PE
L1	70	30	10/-	-	-	-
L2	70	30	- /10	-	-	-
L3	40	30	10/-	-	30	-
L4	50	30	10/-	20	20	-
L5	70	30	10/-	-	-	5

Abkürzungen: **PC:** Phosphatidylcholin  
**CH:** Cholesterol  
**DCP:** Dicaprylphosphat  
**DDAB:** Dimethyldioctadecylammoniumbromid  
**OPP:** Octadecyl-(1,1-dimethyl-4-piperidin-1-ium-4-yl)-phosphat  
**DOPE:** 1,2-Dioleoyl-3-sn-glycero-3-phosphoethanolamin  
**PEG-PE:** N-Methyl-(polyethylenglycol)<sub>2000</sub>-1,2-distearoyl-3-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin  
**DCP:** negative Ladung; **DDAB:** positive Ladung

**Tab.5: Molare Zusammensetzung der verwendeten Liposomenformulierungen [mol%].**

##### 3.1.1. Lipidfilm-Hydratation und Extrusion

Die Herstellung von multilamellaren Vesikeln (MLV) erfolgte mittels Lipidfilm-Hydratationsmethode [131]. Hierzu wurden volumetrisch Aliquote der Stammlösungen der einzelnen Lipide (gelöst in Dichlormethan) wie in Tabelle 5 beschrieben gemischt. Durch Vakuumrotation bei 45 °C konnte das Lösungsmittel entfernt werden. Anschließend erfolgte eine einstündige Nachtrocknung der so entstandenen Lipidfilme im Hochvakuum. Zur Hydratation der homogenen Lipidfilme wurde bei 45 °C (oberhalb der Phasenübergangstemperatur) **a) phosphatgepufferte Salzlösung** (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline: PBS, ohne Ca<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup>, pH 7,5), **b) Calceinlösung** (50 mM oder 0,05 mM, pH 7,5) oder **c) Ammoniumcitrat-Puffer** (300 mM, pH 7,4) verwendet. Eine anschließende Extrusion der entstandenen MLV durch zwei Polykarbonat-Filter mit 200nm und 100 nm Porendurchmessern erzeugte unilamellare Vesikel (LUV) mit einer einheitlichen Größenverteilung. Nicht eingeschlossene



Substanz (Fluoreszenzmarker Calcein oder Ammoniumcitrat-Puffer) wurde von den beladenen Vesikeln durch Größenausschlusschromatographie an einer Sephadex G50 Säule abgetrennt.

### 3.1.2. Mitoxantron-Beladung

Die Beladung der, wie unter 3.1.1. c) beschrieben hergestellten Liposomen mit dem zytotoxischen Arzneistoff Mitoxantron (MTO) erfolgte mittels Ionengradienten-Technik [199]. Bei diesem Herstellungsverfahren wurden die LUV kurzzeitig im Wasserbad bei 60 °C erhitzt. Nach der Zugabe von 1 ml Mitoxantron-Stammlösung (2 mg/ml) zu 1 ml Liposomensuspension wurde der Ansatz kurz gemischt und weitere 10-30 min. bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Um eine möglichst große Verkapselungsrate zu erreichen, erfolgte anschließend eine 12-stündige Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nicht eingeschlossenes MTO wurde innerhalb von 8 Stunden durch Dialyse gegen PBS von den Liposomen abgetrennt (2 ml Liposomenansatz gegen 100 ml PBS). Hierzu ist eine Spectra/Por® Dialysemembran (Trennleistung: MWCO 6000-8000 kDa) verwendet worden. Das Wechseln der PBS-Lösung erfolgte einmal pro Stunde.

### 3.1.3. Post Insertions Technologie

Alle für dieses Verfahren benötigten Anker-moleküle sind in Tabelle 3 zusammengefasst und charakterisiert. Mit der Post Insertions Technologie (PIT) wurde der Ligand 19-mer-Peptid 1 an der Oberfläche der mit Calcein oder MTO beladenen LUV verankert [200]. Um Liganden tragende Liposomen (**L<sub>x</sub>-LG**) herzustellen, mussten die experimentellen Bedingungen der PIT optimiert werden. Hierfür wurde der fluoreszenzmarkierte Cholesterol-Anker 3 in einer Konzentration von 2 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst. 1-5 mol% dieser Lösung (bezogen auf das Gesamtlipid (TL) der Liposomen) wurden mit in PBS hergestellten LUV gemischt und bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 30 °C, 50 °C und 70 °C) und unter Schütteln bei 700 rpm für 15', 30', 60' und 12 h inkubiert. Die Abtrennung von nicht gebundenen Anker-molekülen erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von Centri-Spin-10® Säulen. Abschließend wurden der Lipidgehalt dieser oberflächenmodifizierten Vesikel mittels HPTLC und die Fluoreszenzmarker-Konzentration ( $F_{ex}$  485 nm und  $F_{em}$  517 nm) bestimmt. Die Liganden tragenden Liposomen, die in den *in vitro* und *in vivo* Experimenten zur Anwendung kamen, wurden analog zum oben beschriebenen Verfahren unter folgenden Bedingungen hergestellt: 2 mol% des 19-mer-Peptid 1 wurde mit Liposomen (7-13  $\mu$ mol TL) bei 28 °C über Nacht (ca. 12 h) inkubiert. MTO beladene LUV, die in den *in vivo* Versuchen Anwendung fanden, wurden vor der Anwendung am Tier zusätzlich noch durch Polykarbonat-Filter mit 400 nm Porengröße gegeben, um entstandene Aggregate zu beseitigen. Die oberflächenmodifizierten Liposomen wurden analysiert und innerhalb von 48h im Experiment verwendet.

### 3.2. Liposomencharakterisierung

Alle hergestellten Liposomenchargen wurden vor der experimentellen Verwendung *in vitro* bzw. *in vivo* auf ihre Stabilität geprüft. Hierfür wurden die Größe und Größenverteilung, die Konzentration des Gesamtlipidgehaltes, die Beladungskonzentration und die Stabilität in PBS bestimmt. Die Größe und Größenverteilung sowie die Stabilität in PBS wurden bei allen Chargen über einen längeren Zeitraum geprüft. Für die Erstellung der Langzeitstabilitätsprüfung und der Serumfreisetzung wurden Beispielchargen verwendet.

#### 3.2.1. Größe und Größenverteilung

Die Messung der Größe und Größenverteilung der hergestellten Vesikel erfolgte durch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) mit einem N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter Electronic, Lichtenstein) bei einem Winkel von 90° durch Dreifachbestimmungen. Zur Charakterisierung der Liposomen wurden der unimodale Durchmesser [nm] und der Polydispersitätsindex (PI) bestimmt.

#### 3.2.2. Konzentration des Gesamtlipidgehaltes

Die Gesamtlipidkonzentration der Liposomen ist über Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) wie bei Arndt beschrieben gemessen worden [134]. Die Validierung des Messbereiches der verwendeten HPTLC-Methode [202] erfolgte mit der Software WinCATS Planar Chromatography Manager (Version 3.15). Hierfür wurde bei jeder Messung eine Kalibriergerade von PC oder CH mit unten stehender Gleichung erstellt, mit der die Konzentrationen der Proben ermittelt wurden. Beispiele für die ermittelten Kenndaten für eine PC-Bestimmung sowie für eine CH-Bestimmung sind in Tabelle 6 zu sehen. Die dazugehörigen polynominalen Kalibriergeraden sind in Abbildung 8 dargestellt.

$$f(x) = ax^2 + bx + c$$

Die zu untersuchenden Liposomen wurden mit Lösungsmittel verdünnt und mit dem Standardlipid Phosphatidylcholin (PC) oder Cholesterol (CH) auf eine HPTLC Silica-Gel 60 Platte aufgetragen (Standardmessbereich: 500-1500 pmol PC bzw. CH). Die Auftrennung des Lipidgemisches erfolgte in einer Horizontalentwicklungskammer mit dem Laufmittelgemisch Dichlormethan : Methanol : Wasser : Essigsäure (50:30:4:4, v/v/v/v) für PC bzw. Dichlormethan : Hexan : Methanol (49:49:2, v/v/v) für CH. Die mit einem Färbereagens (Manganchlorid : Wasser : Methanol : Schwefelsäure) unter Hitze entwickelten Substanzspots (dunkelrote Spots) auf der Platte wurden mit einem TLC Scanner II (Camag, Schweiz) bei 540 nm detektiert. Die Berechnung der Lipidkonzentration [ $\mu\text{mol/ml}$ ]

der Basislipide PC oder CH erfolgte über die Software WinCATS III (Version 3.15) mit Hilfe der Standardkurve. Die abschließende Kalkulation des Gesamtlipidgehaltes [ $\mu\text{mol/ml}$ ] setzt die berechnete Lipidkonzentration der Basislipide PC oder CH ins Verhältnis zu den eingesetzten Lipidkonzentrationen der Einzellipide. Diese Hochrechnung beruht auf der Annahme wie bei Zeisig beschrieben [203], dass das molare Verhältnis der Einzellipide während der Herstellung konstant geblieben ist. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung angefertigt.

Kenndaten	quadratisches Glied ( $ax^2$ )	lineares Glied ( $bx$ )	Absolutglied ( $c$ )	Korrelationskoeffizient ( $r$ )
PC	$-0,4762 \cdot 10^{-3}$	2,667	-76,33	0,99974
CH	$-0,6499 \cdot 10^{-3}$	3,078	-384,5	0,99793

Tab.6: Kenndaten zur den beispielhaften polynominalen Kalibriergeraden von PC und CH.

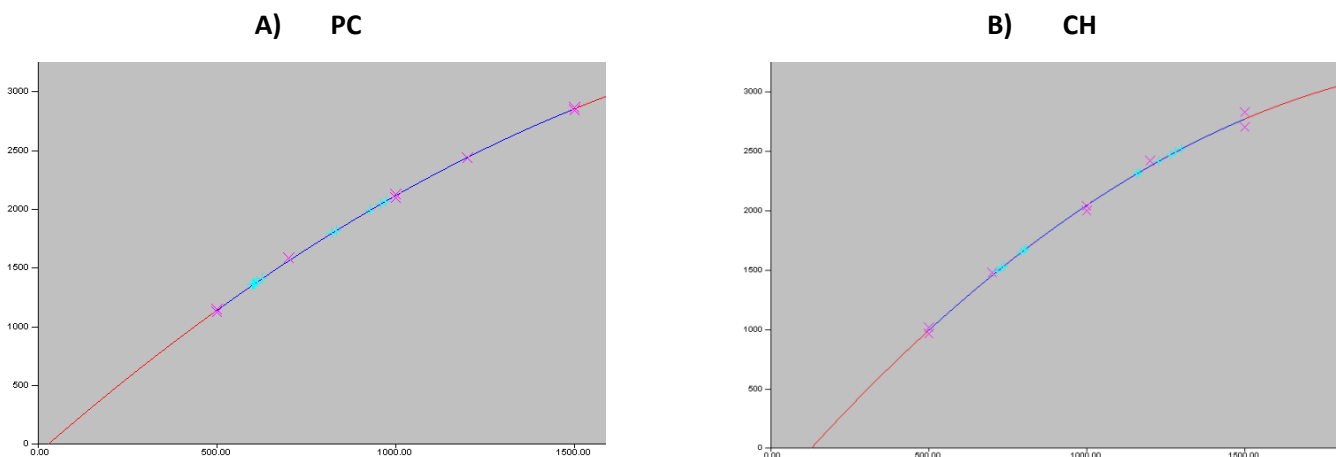


Abb.8: Polynomiale Kalibriergeraden einer PC- und einer CH-Bestimmung.

Die Software WinCATS Planar Chromatography Manager (Version 3.15) berechnete bei jeder PC- sowie CH-Bestimmung eine polynomiale Kalibriergerade aus dem mitgeführten Standard (PC bzw. CH, lila Kreuze) im Messbereich von 500-1500 pmol, aus der die Konzentrationen für die zu bestimmenden Proben (hellblaue Kreuze) ermittelt wurden. In den Graphen sind beispielhaft Kalibriergeraden für PC (A) und für CH (B) dargestellt.

### 3.2.3. Zeta-Potential

Die Messung des Zeta-Potentials der einzelnen liposomalen Formulierungen erfolgte mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited, Großbritannien). Die Vesikel wurden in Millipore-Wasser auf eine Konzentration von 500 nmol TL/ml verdünnt. Das Zeta Potential (mV) jeder Probe wurde jeweils dreimal bei 21 und 37 °C gemessen. Alle Bestimmungen erfolgten in mind. 6 unabhängigen Einzelmessungen.

### 3.2.4. Beladung

Die Beladungskonzentration der Liposomen mit Calcein wurde durch Fluoreszenzmessung ( $F_{\text{ex}}$  485 nm und  $F_{\text{em}}$  538 nm) in schwarzen Mikrotiterplatten (FluoroNunc™ MaxiSorp Surface) ermittelt. Die Bestimmung der enthaltenen Mitoxantron Konzentration in den Vesikeln erfolgte in transparenten 96 Well-Platten (Microtest™ 96 Plate) durch Absorptionsmessung (610 nm). Die Validierung des Messbereiches der verwendeten photometrischen Methode erfolgte mit der Software DINTEST (Version 2005, Universitätsklinikum Heidelberg). Hierfür wurden die Kalibriergeraden von Calcein und MTO nach DIN 32645 ausgewertet, mit der die Konzentrationen der Proben oberhalb der berechneten Bestimmungsgrenze ermittelt wurden. Beispiele für die ermittelten Kenndaten von Calcein und MTO sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengestellt. Die dazugehörigen linearen Kalibriergeraden sind in Abbildung 9 dargestellt.

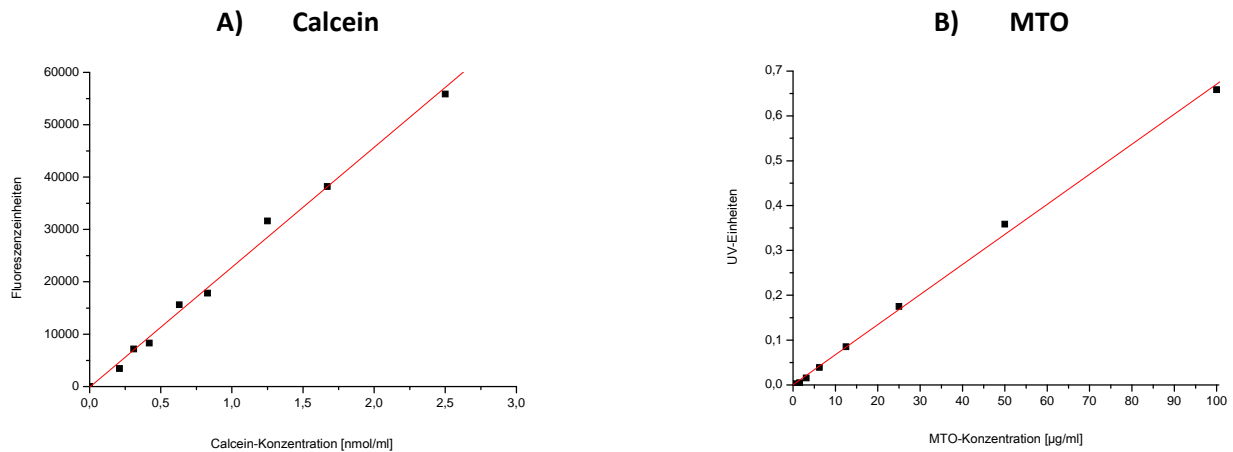
Die Messung beider Substanzen erfolgte im Tecan infinite M200 (TECAN GmbH, Deutschland). Die entsprechenden Konzentrationen wurden über eine Standardkurve von Calcein (Standardmessbereich: 0,21 - 2,5 nmol/ml) bzw. MTO (Standardmessbereich: 0,78 - 100 µg/ml) berechnet. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

Kenndaten	Steigung (a)	Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (r)	Anzahl der unabhängigen Messreihen
Calcein	22908,07904	-135,57534	0,99687	4
MTO	0,00671	$0,481 \cdot 10^{-3}$	0,99888	4

Tab.7: Kenndaten zu den linearen Kalibriergeraden von Calcein und MTO.

Analytische Grenzwerte nach DIN 32645	Nachweisgrenze [nmol/ml] [µg/ml]	Erfassungsgrenze [nmol/ml] [µg/ml]	Bestimmungsgrenze [nmol/ml] [µg/ml]
Calcein	0,180	0,359	0,535
MTO	3,723	7,447	7,342

Tab.8: Analytische Grenzwerte für den Messbereich der verwendeten photometrischen Methoden zur Bestimmung von Calcein und MTO nach DIN 32645.



**Abb.9: Kalibriergeraden der Calcein- und der MTO-Bestimmung.**

Die mit der Software DINTEST (Version 2005) berechneten linearen Kalibriergeraden aus dem jeweiligen Standard für Calcein (**A**) im Messbereich von 0,21 - 2,5 nmol/ml bzw. MTO (**B**) im Messbereich von 0,78 - 100 µg/ml, aus denen die Konzentrationen für die zu bestimmenden Proben ermittelt wurden, sind in den Diagrammen dargestellt.

### 3.2.5. Lagerstabilität

Die Liposomenpräparationen wurden über verschiedene Zeiträume (120 d bzw. 194 d) bei 4 °C in PBS gelagert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben der LUV (Beladung: Calcein und MTO) entnommen. Die Bestimmung der Lagerstabilität erfolgte, wie unter 3.2.1. und 3.2.4. beschrieben, mittels PCS Messung der Partikelgröße, durch Fluoreszenzmessung des Calceins sowie durch Absorptionmessung des MTO.

### 3.2.6. Serumstabilität

Die Verkapselungsstabilität von liposomalen Formulierungen in Serum wurde, wie unter 3.2.4. beschrieben durch die Fluoreszenzmessung des freigesetzten Calceins in Doppelbestimmungen ermittelt. Die Liposomen wurden, wie unter 3.1.1. b) beschrieben mit 50 mM Calcein hergestellt und auf ein Gesamtlipidgehalt von 5 µmol/ml eingestellt. Die Inkubation der Vesikel in PBS enthaltenem Serum (1:1 v/v) erfolgte bei 25 °C für 48 h unter Rühren. In regelmäßigen Abständen wurden je zwei Proben mit 100 µl aus dem System entnommen und fluorimetrisch ( $F_{\text{ex}}$  485 nm und  $F_{\text{em}}$  538 nm) vermessen. Die Berechnung der Calceinfreisetzung aus den Liposomen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Freisetzung [\%]} = \frac{m_{\text{Calcein}}}{m_{\text{Totalcalcein}}} * 100$$

$m_{\text{Calcein}}$  Anteil von freigesetztem Calcein in der Probe

$m_{\text{Totalcalcein}}$  Gesamtgehalt von Calcein in den Liposomen der Probe.

Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Calcein in der Probe (100  $\mu$ l) wurden die Vesikel mit 10  $\mu$ l Triton zerstört und ebenfalls photometrisch vermessen.

### 3.3. Elektronenparamagnetische Resonanzmessung

Zur Durchführung der Elektronenspinresonanzmessung (EPR-Messung) wurden die Liposomen, wie unter 3.1.1. a) beschrieben hergestellt und mit zwei lipophilen Spin-Sonden MeFASL (10,3) und MeFASL (2,11) in einem Verhältnis 1:200 (Spin-Sonde zu Gesamtlipidkonzentration) markiert. Dazu wurden die lipophilen Spin-Sonden als ethanolische Lösung in ein Reagenzglas gegeben und das Lösemittel durch Verdampfung entfernt. Der entstandene Film wurde mit 100  $\mu$ l Liposomensuspension versetzt und die Mischung bei Raumtemperatur für 15' geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Überführung der Probe in eine Glaskapillare und die Messung mit einem X-Band ERP Spektrometer Bruker EPS 300 in einem Temperaturspektrum von 25 °C bis 45 °C. Das Spektrometer arbeitete bei einer Mikrowellenleistung von 10 mW, einer Reglungsamplitude von 0,1 mT und einer Frequenz von 100 kHz, wobei jedes Spektrum siebenmal gescannt wurde. Die Kalkulation der empirischen Korrelationszeit  $T_{emp}$  [ns] erfolgte über die oben genannten Spektren [204]. Alle Bestimmungen wurden in drei unabhängigen Messungen durchgeführt.

### 3.4. Kryogenische Transmissionselektronenmikroskopie

Zum Anfertigen einer Einzelprobenpräparation wurden Karbonfilme mit Lichtgittern benutzt. Ein Tropfen der zu untersuchenden Liposomen wurde auf das aus Kupfer bestehende Lichtgitter gegeben und mit einem Karbonfilm abgedeckt. Die überschüssige Flüssigkeit der Probe ist mit Löschpapier abgesaugt worden, so dass nur noch ein dünner Film über den Löchern gespannt war. Die Einzelproben wurden umgehend mittels Einfriergerät (Zeiss, Deutschland) in einer stickstoffgekühlten Ethanolphase (-183 °C) schockgefroren. Der überschüssige Alkohol wurde, wie oben beschrieben abgesaugt [205]. Die Aufnahmen der Proben erfolgten anschließend mit einem Elektronenmikroskop LEO 912 (Zeiss, Deutschland) mit integrierter Digitalkamera.

### 3.5. Zellkultur

*Madin-Darby Canine Kidney Zellen* (MDCK, Hundenierenepithelzellen, Nr. 00062107, ECACC, Großbritannien) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit den Zusätzen L-Glutamin (1 %),  $\text{NaHCO}_3$  (7 g/L), Glucose (1 g/L) und hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FBS, 10 %) kultiviert. *Maushirnendothelzellen* (bEnd.3, Nr. CRL-2299, ATCC, USA) wurden ebenfalls in DMEM mit den gleichen Zusätzen (abweichend: Glukose 4,5 g/L) kultiviert. Für die *humanen Glioblastomzellen* (U373 MG, Nr. HTB-17, ATCC, USA) und die *humanen Mamakarzinomzellen* (MT-3, WONZ, Russland) wurde Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem

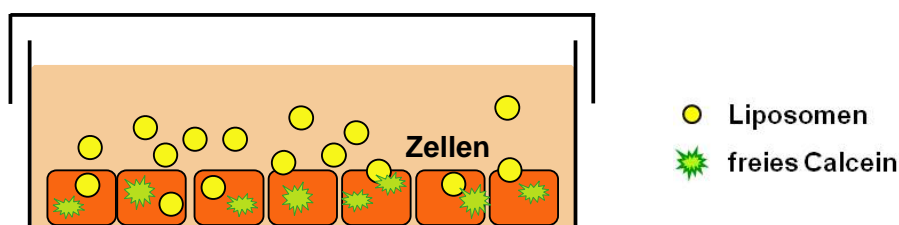
Kälberserum verwendet. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in handelsüblichen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>-150 cm<sup>2</sup>, BD, Frankreich) im Brutschrank (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>).

### 3.6. Durchflusszytometrie

Die Expression des „low density lipoprotein Rezeptor - related Protein“ (LRP) an der Zellmembranoberfläche der Zelllinien MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 wurde durch Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting) quantifiziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 50 µg/ml des fluoreszenzmarkierten Peptids 2 bei 37 °C und 4 °C. Nach jeweils 15', 30', 45', 60' und 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,025 % Trypsin /EDTA abgelöst und 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer Duallaser BD FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) vermessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte über die Software BD CellQuest™ (Version 5.2). Um gemessene Zelltrümmer nicht in die Auswertung mit einzubeziehen, wurden diese Werte (Threshold) von den Messdaten abgezogen. Anschließend wurden die Zellpopulationen gegliedert und der Prozentsatz positiver Zellen für den LRP kalkuliert. Desweiteren wurden alle Ergebnisse normiert indem das Grundrauschen, hervorgerufen durch die Eigenfluoreszenz der Zellen und die vereinzelt Messsignale der 4 °C Messungen abgezogen wurden. Die Darstellung der Messungen zeigt die positiven Zellpopulationen in einem Fluoreszenzintensitäts-Histogramm Plot. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

### 3.7. Quantifizierung der zellulären Aufnahme

Mit 50 mM Calcein beladene Liposomen wurden, wie unter 3.1.1. b) beschrieben hergestellt und an den Zelllinien MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 getestet.  $3 \cdot 10^5$  Zellen wurden in einer 24 Well-Mikrotiter Platte in 600 µl Medium ausplattiert (Abb.10).



**Abb.10:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Quantifizierung der zellulären Aufnahme von liposomalen Formulierungen.

Nach einer Anheftzeit von 24 h befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (70-80 % Konfluenz). Sie wurden mit PBS gewaschen und mit 600 µl Liposomensuspension (75 nmol TL/ml in Serum freien Medium, SfM) für 15', 30', 1 h, 2 h und 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte durch Inkubation mit den Liposomen für 15' bei 4 °C. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch eine Inkubation mit 500 µl RIPA-Puffer für 20' lysiert. Die Vermessung von jeweils 100 µl des Lysates erfolgte, wie unter 3.2.4. beschrieben fluorimetrisch. Die zelluläre Aufnahme rate an Calcein (nmol Calcein pro Well oder  $10^6$  Zellen) wurde über eine Standardkurve von freiem Calcein in PBS berechnet. Die Messergebnisse wurden um die unspezifische Calceinaufnahme korrigiert. Die Messungen erfolgten jeweils als Doppelbestimmung, alle vier Zelllinien in vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

### **3.8. Konfokale Laserscanning Mikroskopie**

24 h vor Beginn des Experimentes wurden  $3 \cdot 10^5$  MDCK Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in 6 Well-Platten ausplattiert. Nach dem Anheften der Zellen erfolgte eine Inkubation mit 3 ml Liposomensuspension (75 nmol TL/ml in SfM; PBS und 0,05 mM Calcein) für 3 h bei 37 °C, die wie unter 3.1.1. a) und b) beschrieben hergestellt wurden. Nach der Entnahme der Deckgläschen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt und mit 450 µl PBS oder Bisbenzimid 33258 (Hoechst 33258) (1/100 verdünnt in PBS) beschichtet. Zur Vitalitätskontrolle der Zellen und zur besseren Fokussierung der Zellmembranen wurde während der Aufnahmen ein Tropfen (ca. 50 µl) Trypanblaulösung (0,5 %, w/v) direkt auf die Zellen pipettiert. Die konfokalen Laserscanning Mikroskopie (KLSM) Untersuchungen wurden mit einem LSM 510 META konfokalen Laserscanning Mikroskop (Zeiss, Deutschland) und einem Plan-Neofluar 100x/1.3 Öl-Objektiv durchgeführt. Calcein markierte Zellen wurden mit einem 200 mW Argon-Laser (488 nm) bei 10 % Intensität angeregt und die Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines BP505–530 Emissionsfilter mit einem Photomultiplier Tube (PMT) detektiert. Die Anregung der DAPI markierten Zellkerne erfolgte mit einem 15 mW Helium-Neon-Laser (543 nm) bei 10 % Intensität und die Detektion der Fluoreszenz unter Verwendung eines LP560 Emissionsfilter. Die Trypanblau-Färbung wurde mit einem 15 mW Helium-Neon-Laser (633 nm) angeregt mit einer Intensität von 30 %. Das davon ausgehende Fluoreszenzlicht wurde mit einem LP650 Emissionsfilter selektiert und über einem PMT detektiert. Dadurch wurden mikroskopische Aufnahmen in mehreren Lichtkanälen (Durchlicht, GFP: grün, DAPI: blau und Cy3: rot) erhalten. Die Lochblende (Pinhole) war für alle Aufnahmen auf 300 µm eingestellt und die Anregung der verschiedenen Fluorophore erfolgte sequenziell, um eine mögliche Fluoreszenzüberlagerung zu unterbinden.



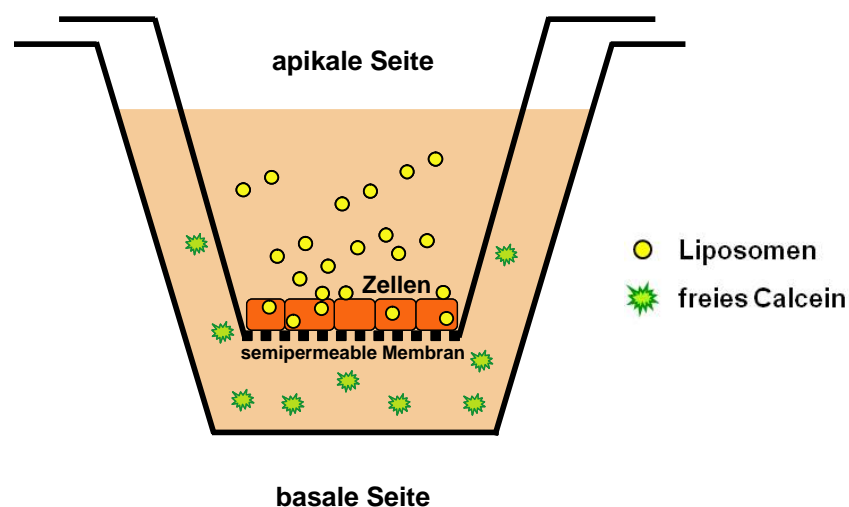
### 3.9. Fluoreszenzmikroskopie

24 h vor Beginn des Experimentes wurden  $5 \cdot 10^5$  MDCK Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen in 6 Well-Platten ausplattiert. Nach dem Anheften der Zellen erfolgte eine Inkubation mit 3 ml Liposomensuspension (75 nmol TL/ml in SfM; PBS und 0,05mM Calcein) für 2 h bei 37 °C, die wie unter 3.1.1. a) und b) beschrieben hergestellt wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläschen entnommen, mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit MitoTracker® Orange (Cy3 markiert die Mitochondrienfärbung) sowie Bisbenzimid 33258 (Hoechst 33258) (1/100 verdünnt in PBS; DAPI markiert die Kernfärbung) und  $\beta$ -Actin (1/500 verdünnt in PBS; Sekundärantikörper: goat anti-mouse, 1/800 in PBS; GFP markiert die Färbung des Zytoskeletts) angefärbt. Die Anfertigung der mikroskopischen Aufnahmen der Zellen erfolgte in mehreren Lichtkanälen (siehe 3.8) mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40 (Zeiss, Deutschland).

### 3.10. Transzytose-Experimente

$1 \cdot 10^5$  MDCK oder bEnd.3 Zellen wurden auf einen Zellkultureinsatz (Transwell) in 24 Well-Mikrotiterplatten ausplattiert (Abb.11). Dieser enthielt eine mit Kollagen beschichtete, semipermeable Membran (Millipore, Deutschland; 0,2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser; 0,6  $\text{cm}^2$  Filterfläche; 0,2 % Kollagenbeschichtung). Vor Beginn dieser experimentalen Reihe musste sichergestellt werden, dass das verwendete zelluläre Schrankenmodell, bestehend aus einem dichten MDCK bzw. bEnd.3 Zell-Monolayer, den geforderten Standards entspricht [206].

Die Funktionsfähigkeit dieser zellulären Barriere wurde durch drei experimentelle Methoden nachgewiesen.



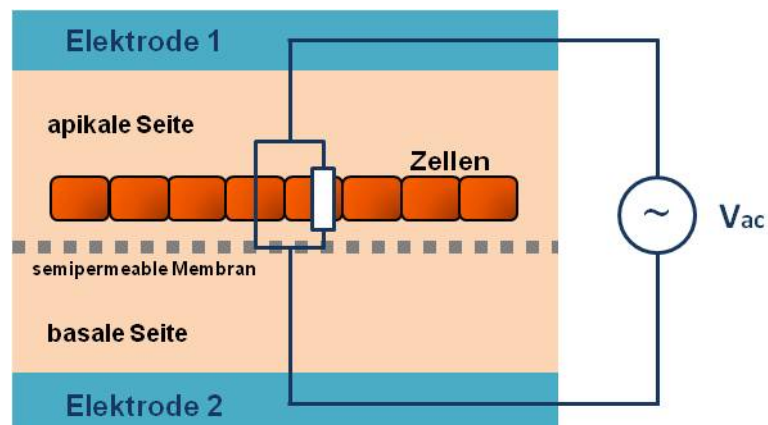
**Abb.11: Schematische Darstellung eines dualen Filtersystems (Transwell) für die Durchführung von Transzytose-Experimenten.**

### 3.10.1. Optische Prüfung

Die optische Prüfung der Konfluenz des Zell-Monolayers wurde mittels Lichtmikroskop (Zeiss, Deutschland) durchgeführt. Nur bei vollständiger Konfluenz der Zellen wurden weitere Prüfungen vorgenommen.

### 3.10.2. Transzelluläre elektrische Widerstandsmessung

Die Widerstandsmessung (transcellular electrical resistance = TER) der Zellbarriere erfolgte jeweils vor und nach jedem Experiment mit einem Millicell® ERS Volt-Ohm-Meter (Millipore, Deutschland) durch die Bestimmung des vertikalen Ionenstroms zwischen zwei flüssigkeitsgefüllten Kompartimenten direkt im Medium (Abb.12). Alle in dieser Arbeit angegebenen TER-Werte [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ] sind auf  $1 \text{ cm}^2$  normalisiert worden, nachdem der Grundwiderstand der leeren, beschichteten Filtermembran ( $\sim 170 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) abgezogen wurde. Ein Zell-Monolayer wurde nur dann für ein Experiment verwendet, wenn einen Widerstand von mindestens  $220 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erreicht wurde.



**Abb.12:** Schematische Darstellung der TER Messung in einem Transwell-Filterssystem.

Eine Epithel- oder Endothelzellschicht kultiviert auf einer semipermeablen Membran bildet einen Widerstand zwischen zwei mit Medium gefüllten Kompartimenten aus, während eine Wechselspannung ( $V_{ac}$ ) an den Elektroden angelegt wird.

### 3.10.3. Mannitolbehandlung

Die Behandlung eines dichten Zellmonolayers mit einer hyperosmolaren Zuckerlösung erfolgte durch die Inkubation mit einer 1 M Mannitol Lösung in SfM für 15' bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nach Ablauf der Zeit wurde das Mannitol wieder von den Zellen entfernt und diese mit frischem Medium bedeckt. Eine TER-Messung im Versuchsansatz erfolgte vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung (Regenerationszeit). Mit einer zusätzlichen FITC-Dextran Messung, wie im nächsten Abschnitt (3.10.4.) beschrieben, wurde die Durchlässigkeit des Zellmodells mit und ohne Mannitoleinfluss getestet.

#### 3.10.4. Durchlässigkeitsmessung mit FITC-Dextran

Für die Durchlässigkeitsmessung einer FITC-Dextran Lösung (10 kDa) wurden die Zellen sowie ein Transwell-Filter ohne Zellen mit 20 µg/ml FITC-Dextran in SfM für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 100 µl Aliquote aus dem apikalen und basalen Medium entnommen und als Doppelbestimmung fluorimetrisch ( $F_{ex}$  490 nm und  $F_{em}$  520 nm), wie unter 3.2.4. beschrieben vermessen. Die Berechnung der gemessenen FITC-Dextran Konzentration (µg/ml) erfolgte über eine Standardkurve der Stammlösung von freiem FITC-Dextran in PBS.

#### 3.10.5. Quantifizierung der Transzytose-Rate

Die Quantifizierung der Transzytose-Rate von liposomal verkapseltem Calcein erfolgte in Anlehnung an Garberg [207]. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben (3.10.) kultiviert und die konfluenten Zellmonolayer wurden nur dann für die Transzytose-Experimente verwendet, wenn die optischen und elektrochemischen Parameter erfüllt waren (nach 3-5 Tagen). Die Zellen auf der apikalen Seite des Transwell-Systems wurden mit 400 µl Liposomen enthaltendem Medium (75 nmol TL/ml in SfM) für 24 h bei 37 °C inkubiert (Abb.11). Die Liposomen wurden, wie unter 3.1.1. b) beschrieben mit 50 mM Calcein hergestellt. Nach der Inkubationszeit wurden aus dem basalen Kompartiment je 100 µl Aliquote zur fluorimetrischen Vermessung der Calceinkonzentration, wie unter 3.2.4. beschrieben entnommen. Des Weiteren wurden die Zellen auf der apikalen Seite des Kammersystems mit PBS gewaschen, mit RIPA-Puffer lysiert und ebenfalls im Photometer vermessen. Die Durchführung aller drei Experimente erfolgte unabhängig voneinander und wurde jeweils als Doppelbestimmung gemessen.

#### 3.11. Zytotoxizitätstest

Verschiedene Zelllinien (MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3) wurden in einer Zahl von  $3 \cdot 10^3$  Zellen pro Well in 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach einer Anheftzeit von 24 h wurden die Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, mit einer seriellen Verdünnungsreihe (10 bis 0,001 µg/ml, in SfM) der zu testenden, Mitoxantron enthaltenden Liposomen (**L1**<sub>MTO</sub>, **L4**<sub>MTO</sub>, **L1**<sub>MTO-LG</sub> und **L4**<sub>MTO-LG</sub>) sowie des freien Wirkstoffs und PBS enthaltenden Liposomen (**L4**<sub>PBS</sub> = Negativkontrolle) für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 20 µl 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT-Reagenz, 5 g/ml in SfM) pro Well für weitere 4 h bei 37 °C. Abschließend wurde der Zellüberstand abgesaugt und das entstandene, blauviolette und wasserunlösliche Formazansalz in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Quantifizierung des farbigen DMSO-Komplexes erfolgte photometrisch im Tecan infinite M200 Plattenreader (TECAN GmbH, Deutschland) bei 530 nm. Zur Kalkulation der Mitoxantron Konzentration (µg/ml), die zu einer 50 %igen Wachstumshemmung ( $IC_{50}$ ) führte, wurde die Wachstumshemmung der behandelten Zellen

zum Wachstum der, unter gleichen experimentellen Bedingungen unbehandelten Kontrolle in Korrelation gesetzt. Alle vier Experimente wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 3.12. Metastasenmodelle *in vivo*

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Zustimmung der Behörden von zertifiziertem Personal durchgeführt.

Die ausgewachsenen weiblichen NMRI:nu/nu Mäuse wurden bei Taconic Europe (Dänemark) gekauft. Die Haltung der Tiere erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in einzeln ventilierten Käfigen und im standardisierten Raumklima (22 °C, 50 ± 10 % relative Luftfeuchtigkeit, 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus). Sie erhielten autoklavierte Einstreu und Standardfutter (Ssniff, Deutschland) sowie angesäuertes Trinkwasser (pH 4,0) *ad libitum*.

Für die Therapieveruche wurden humane Brustkrebszellen (MT-3) transplantiert. Jedem Tier wurden  $5 \cdot 10^3$  Zellen intrazerebral (i.c.) sowie  $5 \cdot 10^6$  Zellen subkutan (s.c.) in die linke Flanke appliziert. Drei Tage nach Zellgabe wurden die Tiere randomisiert und zu je 10 Mäusen pro Gruppe (Kontrollgruppe 16 Tiere) zusammengefasst. Die intravenöse (i.v.) Behandlung der Tiere mit einer Dosis von 4 mg MTO/kg mit Mitoxantron enthaltenen Liposomen (**L1<sub>MTO</sub>**, **L4<sub>MTO</sub>**, **L1<sub>MTO-LG</sub>** und **L4<sub>MTO-LG</sub>**), mit dem freien Wirkstoff Mitoxantron und mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) begann am gleichen Tag (d3). Weitere Behandlungen erfolgten am Tag 7 und 10. Es wurde aus ethischen Gründen auf die Testung von Leerliposomen als weitere Kontrolle verzichtet, da die Formulierungen **L1<sub>PBS</sub>** und **L4<sub>PBS</sub>** im Zytotoxizitätstest keine Toxizität gegenüber endothelialen Zellen (bEnd.3), epithelialen Zellen (MDCK) sowie Tumorzellen (MT-3, U373 MG) zeigten. Während des gesamten Experimentes wurde täglich der Gesundheitsstatus der Tiere kontrolliert. Ein wichtiger Kontrollparameter für die körperliche Verfassung der Mäuse war das Körpergewicht, das zweimal wöchentlich bestimmt wurde. Des Weiteren wurde von jedem Tier ein Blutbild am Tag 5 und 22 aufgenommen.

Die Größenmessung des s.c. implantierten Tumors erfolgte zweimal wöchentlich. Das Tumolvolumen, das annähernd einer ellipsoiden Form entsprechen soll, wurde nach folgender Formel (vereinfachte Volumenberechnung für Ellipsoide) berechnet:

$$V = \frac{(\text{Tumorlänge} * (\text{Tumorbreite})^2)}{2}$$

Zur Berechnung des relativen Tumolvolumens (RTV) wurden die Einzelmessungen auf die erste Messung bezogen. Am Tag 22 wurden die Tiere schmerzfrei getötet. Die Gehirne der Tiere wurden präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von den gefrorenen Präparaten wurden Gefrierschnitte angefertigt, welche anschließend in einem histochemischen Prozess mit Cresylviolett

angefärbt wurden (Färbung der Zellkerne: Blaufärbung der Tumorfläche). Zur Bestimmung der Tumorfläche wurde von jedem Gehirn das Schnittpräparat mit dem größten Tumordurchmesser ausgewählt und mikroskopisch (Zeiss Axioskop mit einer 3CCD Sony Power HAD Videokamera) eingescannt. Mit der Software IQ Easy Measure® (Version 1.4.1) konnte die jeweilige individuelle Hirntumorfläche kalkuliert werden.

### 3.13. Pharmakokinetische Studien

Zur Durchführung der pharmakokinetischen Studien wurde das gleiche Xenograft-Modell mit humanen MT-3 Zellen, wie unter 3.12 beschrieben verwendet. Die Applikation von  $1 \cdot 10^7$  Zellen erfolgte hierbei bei jedem Tier s.c. in die linke Flanke. Das Körpergewicht und das Volumen des s.c. Tumors der Tiere wurden zweimal wöchentlich gemessen. Zwei Wochen nach der Zellapplikation wurden die Tiere zu Gruppen mit je 3 Mäusen randomisiert. Die i.v. Behandlung der Tiere mit Mitoxantron enthaltenen Liposomen (**L<sub>4</sub><sub>MTO</sub>** und **L<sub>4</sub><sub>MTO-LG</sub>**) oder mit dem freien Wirkstoff Mitoxantron, jeweils in einer Dosis von 5 mg MTO/kg, erfolgte einmalig am gleichen Tag. Zu definierten Zeitpunkten (5', 15', 30', 1 h, 2 h, 4 h, und 48 h) wurde den Tieren Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Anschließend wurden die Tiere schmerzfrei getötet. Es erfolgte die Präparation von Tumor, Gehirn, Leber, Milz, Lunge, Herz und Nieren, die gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Das Plasma und die Organe wurden, wie bei Johnson [208] beschrieben aufgearbeitet (Plasma innerhalb von 24 h) und das in den Lysaten enthaltenen MTO mittels HPLC (LC Serie 1200; Agilent, USA) mit einer NUCLEOSIL® C<sub>18</sub> Säule (250 mm, Ø 4 mm, Partikelgröße 5 µm; Macherey Nagel GmbH & Co.KG, Deutschland) und einem Diodenarraydetektor (Serie 1200, Detektion bei 610 nm) gemessen. Als isokratische mobile Phase wurde ein Gemisch aus Acetonitril : Ammoniumformiat (160 mM) und Hexansulfonsäure (25 mM) (33:67, v:v) verwendet, das mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 2,7 eingestellt wurde. Die Berechnung der in den Organen enthaltenen Mitoxantron Konzentration [mg/kg Organ] erfolgte über eine Standardkurve des freien Wirkstoffes.

Die Validierung des Messbereiches der verwendeten HPLC Methode erfolgte mit der Software DINTEST (Version 2005, Universitätsklinikum Heidelberg). Hierfür wurde die Kalibriergerade von MTO nach DIN 32645 ausgewertet, mit der die Konzentrationen der Proben oberhalb der berechneten Bestimmungsgrenze ermittelt wurden. Die ermittelten Kenndaten von MTO-Kalibrierung sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengestellt. Die dazugehörige lineare Kalibriergerade ist in Abbildung 13 dargestellt. Zur weiteren Validierung der HPLC Methode wurde die Wiederfindungsrate (Reproduzierbarkeit der Methode) von MTO nach der Aufarbeitung aus biologischen Proben bestimmt.

Kenndaten	Steigung (a)	Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (r)	Anzahl der unabhängigen Messreihen
MTO	190261,158	-281,259	0,9911	4

Tab.9: Kenndaten zur Kalibriergeraden von MTO.

Analytische Grenzwerte nach DIN 32645	Nachweisgrenze [mg/ml]	Erfassungsgrenze [mg/ml]	Bestimmungsgrenze [mg/ml]
MTO	0,005	0,011	0,015

Tab.10: Analytische Grenzwerte für den Messbereich der verwendeten HPLC Methode zur Bestimmung von MTO nach DIN 32645.

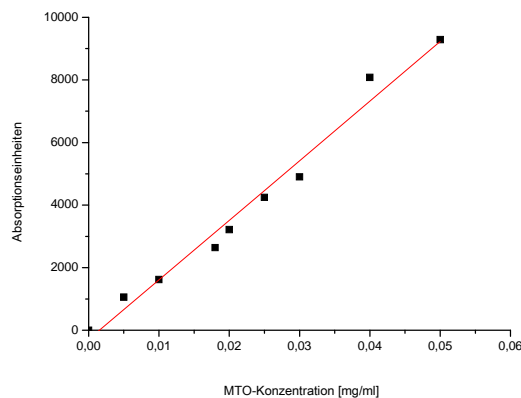


Abb.13: Kalibriergerade der MTO-Bestimmung nach DIN 32645.

Dargestellt ist die mit der Software DINTEST (Version 2005) berechnete lineare Kalibriergerade aus dem MTO-Standard für den Messbereich von 0 - 0,05 mg/ml, aus der die Konzentrationen für die zu bestimmenden Proben ermittelt wurden.

Die pharmakokinetische Auswertungen der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve AUC [mg\*h\*l<sup>-1</sup>], die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  [h], das Verteilungsvolumen Vd [l], die Clearance Cl [l/h] und die mittlere Verweildauer im Körper MRT [h] wurden mit dem Program WinNonLin (Version 1.1) kalkuliert, wobei WinNonLin-Modelle für i.v. Bolus-Applikationen verwendet wurden. Zur Auswahl des passenden Kompartiment-Modells wurde ein statistisches Gütekriterium, das Akaike Informationskriterium (AIC) herangezogen, welches für alle vorhandenen Datensätze nach folgender Formel berechnet wurde:

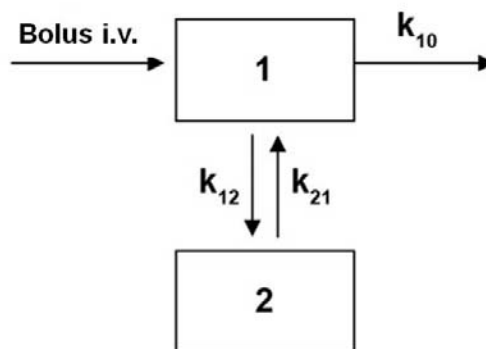
$$AIC = N * \ln \left( \sum_{i=1}^N W_i * (\hat{c}_i - c_i)^2 \right) + 2 * P$$

$N$	Anzahl der Messpunkte
$P$	Anzahl der Modellparameter
$c_i$	gemessene Konzentration
$\hat{c}_i$	Konzentration mit Modell berechnet
$W_i$	Gewichtsfaktor.

Aufgrund der berechneten AIC Werte wurden die Daten dieser pharmakokinetischen Studie nach einem i.v. Bolus 2-Kompartiment-Modell ausgewertet (Abb.14), das nach folgender Formel berechnet wurde:

$$c(t) = C_1 * e^{(-\lambda_1 * t)} + C_2 * e^{(-\lambda_2 * t)}$$

$c(t)$	Plasmaspiegel zum Zeitpunkt t
$C_1$	Ordinatenabschnitt 1
$C_2$	Ordinatenabschnitt 2
$\lambda_1$	Geschwindigkeitskonstante (vorwiegend für Verteilungsvorgänge)
$\lambda_2$	Geschwindigkeitskonstante (vorwiegend für Eliminationsvorgänge).



**Abb.14: Darstellung eines 2-Kompartiment-Modells mit einer i.v. Bolus-Applikation zur Auswertung pharmakokinetischer Studien.**

Bei einer i.v.-Applikation gibt es keine lag-Phase, da der Arzneistoff direkt in das Blutsystem gegeben wird; Diffusionskonstante ( $k_{12}$  &  $k_{21}$ ), Eliminationskonstante ( $k_{10}$ ).

### **3.14. Statistik**

Alle Messwerte in dieser Arbeit sind, im Fall von Mehrfachbestimmungen, als Mittelwerte mit Standardabweichungen (S.D.) aus wenigstens 3 unabhängig voneinander durchgeführten Einzelversuchen angegeben. Die Signifikanzprüfung der *in vitro* Versuche erfolgte über den Student's t-Test für gepaarte Daten. Alle *in vivo* Daten wurden unter Verwendung des Whitney-Mann-U-Testes auf statistische Signifikanz getestet. Als signifikant wurde ein Unterschied bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $p < 0,05$ ) war. Ist bei einem Datensatz eine Signifikanz erreicht worden, gab dies den Hinweis auf einen Unterschied an. Alle Daten wurden mit der Software STATISTICA 6 ausgewertet.





## IV. Ergebnisse und Diskussion

Zum Schutz vor schwankenden Milieubedingungen und im Blut zirkulierenden Krankheitserregern und Toxinen sind verschiedene Bereiche des Körpers vom Kapillarsystem durch physiologische Barrieren wie z.B. die BHS, die Blut-Liquor-Schranke oder die Plazentaschranke abgetrennt. Diese Barrieren verhindern gleichzeitig einen effektiven und gezielten Transport von Arzneistoffen in diese Bereiche. Daher ist die Suche nach effektiven Möglichkeiten, erwünschte Pharmaka in diese „geschützten“ Bereiche zu bringen von großer Bedeutung.

Aufgrund der verschiedenen Möglichkeiten Substanzen oder Moleküle an Liposomen zu binden ergeben sich für diese Transportmittel vielseitige pharmazeutische Anwendungsmöglichkeiten. Liposomen werden als Trägersystem für Arzneistoffe schon seit mehr als 20 Jahren genutzt (Pevaryl®-Lipogel, 1988), um einen verbesserten und gezielten Wirkstofftransport in bestimmte Organe oder Gewebe zu erreichen [207] wobei sich die parenteralen Arzneiformen erst vor 16 Jahren in der klinischen Anwendung etablierten (AmBisome®, 1991) [208]. Besonders im Bereich der Tumorthherapie fanden einzelne liposomale Formulierungen Anwendung (Caelyx®, Myocet®, Doxil® und DaunoXome®), da diese Vesikel nicht nur passiv im Tumorgewebe akkumulieren, sondern auch einen verbesserten Arzneistofftransport über zelluläre Barrieren ermöglichen können. Das Ziel ist eine verbesserte Wirksamkeit der Arzneistoffe mit einem erhöhten therapeutischen Effekt. Der Einsatz solcher liposomaler Systeme könnte auch bei der Behandlung von primären Tumoren oder Metastasen im Gehirn zum Einsatz kommen, da die Therapie dieser zerebralen Krebsformen mit konventionellen Therapeutika durch die sehr effektive BHS stark eingeschränkt ist [11]. Experimentell wurden bereits einige vielversprechende liposomale Vektorformulierungen zur zielgerichteten Therapie von ZNS Erkrankungen gefunden [149,150] (Tab.3), die auch als Trägersystem für Zytostatika verwendet werden könnten. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften und ihrer vesikulären Form ist es liposomalen Trägersystemen möglich, zelluläre Barrieren durch intrazelluläre Diffusion (passiv) oder durch ein aktives Targeting, das einen endozytotischen Aufnahmeprozess auslöst (aktiv) zu überwinden [17], was eine starke Bindung an die Zellmembran voraussetzt. Durch die Interaktion der Liposomen mit der luminalen Zellmembran kann es zu einer Fusion der beiden Lipiddoppelschichten oder zu einer Bindung mit vesikulärer Aufnahme in Endosomen kommen. Beide Aufnahmemechanismen transportieren die Liposomen oder deren Inhalt ins Zytosol. Der transzelluläre Transport der Vesikel in Endosomen kann zur Transzytose mit anschließender Freisetzung der Liposomen oder deren Inhalt an der abluminalen Zellmembran führen.

Ausgehend von den beschriebenen Möglichkeiten für liposomale Trägersysteme, zelluläre Barrieren zu überwinden, sind die vesikulären Eigenschaften und im Besonderen die Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht der entscheidende Faktor für die Aufnahme und Transzytose von Liposomen

durch Zellen. Um eine optimale Zusammensetzung für Liposomen zu entwickeln, sind umfassende Untersuchungen von Formulierungen mit unterschiedlichen Membraneigenschaften wie veränderte Fluidität bzw. Rigidität, Ladung und sterischer Stabilisierung durchgeführt worden [131]. Auch die Kopplung von Liganden an die Membranoberfläche von Liposomen, die eine aktive Aufnahme von Vesikeln in Zellen fördern [43; 209], wurde ausführlich untersucht, um einen verbesserten Arzneistofftransport über zelluläre Barrieren zu erreichen.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Charakterisierung der liposomalen Membraneigenschaften der verschieden aufgebauten Trägersysteme und deren Einfluss auf die passive Überwindung (Aufnahme und Transzytose) eines *in vitro* Schrankenmodells. Darauf aufbauend wurden oberflächenmodifizierte Liposomen (Trojan Horse Liposomen, THL) hergestellt, die mit einem Liganden für ein aktives Targeting ausgestattet waren. Der Einfluss dieser Trägersysteme wurde ebenfalls *in vitro* (Schrankenmodell) charakterisiert. Abschließend wurden das therapeutische Potential, die Verträglichkeit und die pharmakologische Eignung dieser liposomalen Wirkstoffsysteme *in vivo* an einem Hirnmetastasen-Modell untersucht.

#### **4.1. Herstellungsverfahren liposomaler Nanocarrier**

Insgesamt wurden mehr als 25 verschiedene Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung hergestellt (*Tabelle A*, Anhang), in denen die grundlegenden Komponenten wie Basislipide, Ladung, Helferlipide und sterische Stabilisatoren systematisch variiert wurden, um die Polarität, die Fluidität bzw. Rigidität sowie die Hydrophilie der Doppelschichtmembranen zu modifizieren. Nachfolgend werden fünf ausgewählte, repräsentative Formulierungen beschrieben (Tab.5). Hierzu gehören eine positiv geladene Formulierung (**L2**), eine negativ geladene Formulierung, die das Helferlipid DOPE enthält (**L3**) und negativ geladene Liposomen, die eine Kombination der Helferlipide DOPE und OPP enthalten (**L4**). Zusätzlich wurden noch eine Kontrollformulierung (**L1**) mit der Standardzusammensetzung PC/CH/DCP im molaren Verhältnis 70:30:10 und eine mit PEG-PE sterisch stabilisierte Formulierung (**L5**) zur Prüfung der Auswirkungen der Stabilisierung auf die Aufnahme und Transzytose in Zellen untersucht.

##### **4.1.1. Etablierung und Standardisierung von Herstellungs- und Beladungsverfahren für Liposomen**

Die liposomalen Trägersysteme wurden in einem mehrstufigen Verfahren hergestellt. Die Beladung der Vesikel hing von den physikochemischen Eigenschaften des zu verkapselnden Stoffes ab. Somit wurden hydrophile Substanzen im wässrigen Innenraum eingeschlossen und amphiphile oder geladene Moleküle an der Membran adsorbiert oder im Kern inkorporiert (je nach Herstellungsmethode). Je nachdem welche Lipide zur Herstellung der Liposomen benutzt wurden und

welche Größe und Lamellenzahl die endgültigen Vesikel aufwiesen, könnte der Grad der Beladung variieren.

Die Gesamtlipidkonzentration, die für PBS oder Calcein enthaltenden Formulierungen eingesetzt wurde, lag zwischen 11 und 12 mM. Für die Liposomen, die in den *in vivo* Experimenten eingesetzt werden sollten, war es von größter Bedeutung, dass eine ausreichende Menge an Wirkstoff eingeschlossen werden konnte. Um eine entsprechende Verkapselungsrate mit MTO zu gewährleisten, musste eine Gesamtlipidkonzentration von mindestens 5 mM erreicht werden. Da die MTO enthaltenden Formulierungen während des Herstellungsprozesses vielen Verdünnungsschritten unterlagen waren, wurde bei den Vesikeln, die mittels PIT eine MTO Beladung erhielten, eine Ausgangskonzentration von 22-24 mM TL eingesetzt. Die Herstellung multilamellarer Vesikel (MLV) erfolgte durch die Lipidfilm-Hydratationsmethode, die durch anschließende Extrusion in LUV mit einheitlicher Größenverteilung überführt wurden.

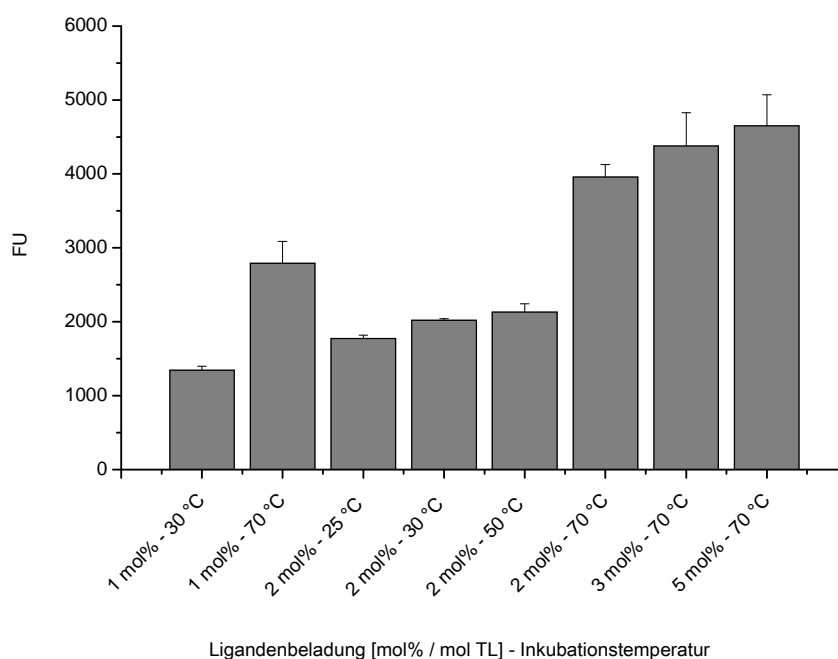
Die Beladung der Vesikel mit MTO, die *in vivo* eingesetzt werden sollten, erfolgte mittels Ionengradienten-Technik [198]. Diese Beladungstechnologie ist ein sehr effizientes Verfahren zur Verkapselung von schwach amphiphilen Basen [210] wie Doxorubicin [198], MTO [211], Irinotecan [211] oder Vincristin [212]. Das Prinzip dieser Beladungsmethode beruht auf einem Ionen- bzw. pH-Gradienten, der durch einen in der wässrigen Phase enthaltenden Puffer (Ammoniumcitrat-, Ammoniumsulfat- oder Natriumhydrogenphosphatpuffer) erzeugt wird, weil die Ionenkonzentration innerhalb der Liposomen deutlich höher ist, als die im umgebenden Medium. Beim Mischen der pufferbeladenen Liposomen mit dem Wirkstoff kommt es zur Einschleusung in den Kern. Durch die Protonierung des Wirkstoffes im Inneren der Liposomen ändert sich dessen Lipophilie und ein Austreten aus dem Kern wird somit verhindert. Aufgrund dieses Beladungsprinzips ist davon auszugehen, dass sich der Wirkstoff vorwiegend im wässrigen Kern der Liposomen befindet. Diese Begebenheit ist für Doxorubicin ausführlich von Bolotin beschrieben worden [213], der belegen konnte, dass der Wirkstoff im Kern der Liposomen eingeschlossen wird. Da sich die lipophilen Eigenschaften von Doxorubicin (LogP<sub>3</sub>-Wert: 1,3) und MTO (LogP<sub>3</sub>-Wert: 1,0) sehr ähneln wird angenommen, dass sich MTO bei einem „remote loading“ Verfahren ebenso verhält wie Doxorubicin. Die technologischen Bedingungen für diese Beladungstechnik wurden mit einigen Veränderungen von Fritze [198] übernommen (siehe 3.1.2.). Die so veränderte Methode ermöglichte Verkapselungsraten mittlerer MTO Konzentrationen von bis zu 74 %.

#### 4.1.2. Etablierung und Optimierung der Post Insertions Technologie

Im letzten Herstellungsschritt wurde die Oberfläche der Formulierungen **L1** und **L4** mit dem Liganden 19-mer-Peptid **1** modifiziert (**L<sub>x</sub>-LG**, Tab.4). Der Gruppe von Béliveau [62; 193; 196] ist es gelungen, eine Reihe von Peptid-Liganden (Angiopep-Derivate) zu etablieren, die sich vom physiologischen Aprotinin ableiten und Substrate für den Rezeptor LRP-1 sind. Durch die Konjugation von Angiopep-2 an das Zytostatikum Paclitaxel (ANG1005) [194] konnte experimentell eine größere Aufnahme des Wirkstoffes im Vergleich zum freien Zytostatikum im Gehirn und damit ein verbesserter therapeutischer Effekt erzielt werden. Ausgehend von diesen Forschungsergebnissen wurde in dieser Arbeit eine Peptidsequenz (19-mer-Peptid **1**) als Ligand für die liposomalen Trägersysteme benutzt, die sich speziell von Angiopep-2 dieser Peptid-Liganden Reihe ableitet. Durch die Bindung des Liganden an LRP-1 wird eine rezeptorvermittelte Endozytose mit einem anschließenden vesikulären Transport in die Zelle induziert. LRP-1 ist ein membranständiger Oberflächenrezeptor und wird u.a. an kapillaren Endothelzellen im Gehirn exprimiert [216].

Die Kopplung des Liganden an die Oberfläche der Lipiddoppelschicht erfolgte über einen Cholesterolanke. Dieser lipophile Anker wurde durch eine Modifizierung der Aminosäuresequenz mit dem Peptid-Liganden verknüpft. Das Ankermolekül wurde durch die Post Insertion Technologie (PIT), wie von Gantert [199] beschrieben, in die Liposomenmembran eingebettet. Die sehr schonende Methode der PIT wurde verwendet, um Schäden an den Liposomen oder dem Liganden zu vermeiden. Um die besten experimentellen Bedingungen für die Herstellung oberflächenmodifizierter Liposomen (**L<sub>x</sub>-LG**) mit den Liganden 19-mer-Peptid **1** zu erhalten, wurden Optimierungsexperimente mit der speziell dafür synthetisierten und fluoreszenzmarkierten Modellsubstanz **3** (Chol-5-Fluo-Derivat) durchgeführt (Tab.4). Der Anteil an gebundenem Ligand an der Oberfläche der Liposomen wurde nach einer chromatographischen Säulenaufreinigung photometrisch über Fluoreszenzmessung bestimmt. Da der Modell-Ligand **3** mit vergleichbarer Polarität und Molekulargröße wie das 19-mer-Peptid **1** synthetisiert wurde, ist davon auszugehen, dass sich das Ankermolekül **3** beim Einbau in die Membran genauso verhält wie das Peptid **1**. Es wurden verschiedenen Molmassenverhältnisse des Cholesterol-Ankers zum TL der Liposomen (1-5 mol%), Inkubationstemperaturen (25 °C, 30 °C, 50 °C, 70 °C) und Inkubationszeiten (15', 30', 60', 12 h) getestet. Eine optimale Beladung der Oberfläche wird durch die Verwendung von 2 mol% des Peptids erreicht, da eine höhere Konzentration des Liganden (3 oder 5 mol%) zu keiner höheren Bindung der Membran führte (Abb.15). Die Auswahl der idealen Inkubationstemperatur war sehr aufwändig, da sich die Bindungsmenge des Liganden an die Membran mit ansteigender Temperatur zwar erhöhte (Abb.15), die Liposomen bei diesen Bedingungen aber stark beschädigt wurden. Daher wurde die Temperatur von 70 °C, bei der die höchste Ligandenbindung gemessen wurde, für die PIT

des Liganden **1** nicht ausgewählt, sondern eine Inkubationstemperatur von 28 °C mit einer langen Inkubationszeit von 12 h zum Ausgleich des Temperaturverlustes verwendet. Mit dieser Inkubationstemperatur und Inkubationszeit konnte eine gute Ligandenbindung mit 17 mmol Ankerligand **3** / mol Gesamtlipidgehalt an die Liposomenoberfläche erreicht werden. Das entspricht einer Kopplungsrate von 84 % der Konzentration des Ausgangsliganden (2 mol%). Die optimalen Bedingungen, die diese Experimente ergaben, wurden auf die PIT mit dem 19-mer-Peptid **1** übertragen.



**Abb.15:** Einfluss der eingesetzten Ligandenkonzentration und der Inkubationstemperatur auf die Bindungseffizienz an der Oberfläche von Liposomen.

Liposomale Formulierungen wurden mit 1-5 mol% des fluoreszenzmarkierten Ankerliganden **3** bei 25 °C, 30 °C, 50 °C und 70 °C für 30' inkubiert. Die Fluoreszenz der Liposomen wurde bei  $F_{ex}$  485 nm und  $F_{em}$  517 nm gemessen. Im Diagramm sind die  $MW \pm S.D.$  der Fluoreszenzeinheiten (FU) von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in einer Dreifachbestimmung angefertigt wurden, dargestellt.

#### 4.2. Liposomencharakterisierung

Die Liposomen wurden hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Größenverteilung, Gesamtlipidgehalt, Verkapselungskapazität des Fluoreszenzmarkers Calcein bzw. des Zytostatikums MTO sowie der Stabilität in PBS und in Serum charakterisiert. Alle hergestellten Liposomenchargen wurden vor der experimentellen Verwendung *in vitro* bzw. *in vivo* auf ihre Stabilität geprüft. Es wurden nur Chargen verwendet, die eine stabile Größe und Größenverteilung sowie Stabilität in PBS aufwiesen. Der komplette Datensatz mit der Lipidzusammensetzung (*Tab.A*) und den physikochemischen Eigenschaften (*Tab.B*) aller liposomalen Präparationen (25) ist im Anhang zu finden. Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf die fünf ausgewählte Formulierungen **L1-L5** (*Tab.5*).

#### 4.2.1. Prüfung der Größe, der Größenverteilung, des Gesamtlipidgehaltes, des Zeta-Potentials und der Beladung

Die Größe von liposomalen Trägersystemen spielt bei der *in vivo* Anwendung eine bedeutende Rolle, da eine möglichst lange Zirkulationszeit des Wirkstoffträgers erreicht werden soll. Eine verminderte Elimination der Liposomen durch das monozytäre, phagozytierende System kann nur erreicht werden, wenn die Formulierungen eine Größe von 200 nm nicht überschreiten oder mit PEG-Ketten abgeschirmt sind [128]. Eine einheitliche Größenverteilung der Vesikel ist für die Reproduzierbarkeit der Formulierungen und somit zur Kontrolle der angewandten Herstellungstechniken sowie zur Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Experimente entscheidend.

Bei der Herstellung der unterschiedlichen Formulierungen mittels Lipidfilm-Hydrations Technik entstanden erwartungsgemäß MLV mit einer sehr heterogenen Größenverteilung. Anschließend konnten mittels Extrusion durch Polycarbonatfilter definierter Porengröße unilamellare Vesikel mit monodisperser Größenverteilung erzeugt werden. LUV, die durch anschließende PIT mit einem Liganden modifiziert wurden, neigten zu einer Aggregatbildung, die sich in einer sehr heterogenen Größenverteilung widerspiegelte. Aus diesem Grund wurden diese Formulierungen (**LX-LG**) zusätzlich noch durch einen Polykarbonat-Filter mit 400 nm Porengröße gegeben, wodurch sich die Zahl der Aggregate deutlich verringern ließ und die Liposomen wieder eine homogene Größenverteilung zeigten. Durch Photonenkorrelationsspektroskopie wurden der unimodale Durchmesser und der Polydispersitätsindex (PI), welcher ein Maß für die Größenverteilung einer Population ist bestimmt. Die Durchmesser der Liposomen lagen zwischen 100 nm und 180 nm (Tab.11). Bei allen Formulierungen konnte ein PI zwischen 0,13 und 0,27 bestimmt werden, was erfahrungsgemäß eine unimodale, monodisperse Größenverteilung der Vesikel beschreibt.

Die Gesamtlipidkonzentration der einzelnen Liposomen wurde jeweils über die Basislipide PC oder CH mit einer validierten HPTLC Methode mit externer Kalibrierung und anschließender Kalkulation des Gehaltes aller enthaltenen Lipide, auf der Basis der initialen molaren Zusammensetzung und unter der Annahme, dass diese Zusammensetzung konstant bleibt, bestimmt [201]. Der Anteil an TL lag in den untersuchten Formulierungen zwischen 5,0 und 13,0  $\mu\text{mol/ml}$  (Tab.11).

Das Zeta-Potential (elektrokinetische Potential) ist die für die elektrostatische Stabilisierung disperser Systeme (z.B. Liposomensuspensionen) entscheidende Größe [217]. Es ist das Volta-Potential, das an der Grenzfläche zwischen der mit dem Vesikel wandernden und der ruhenden äußeren Phase herrscht. Je höher das Zeta Potential ist, desto stabiler ist eine Dispersion in wässriger Lösung. Des Weiteren gibt es Auskunft über die Ladung der einzelnen Formulierungen, die durch die Helferlipide DCP (negative Ladung) und DDAB (positive Ladung) bestimmt wird (Tab.5). Wie Tabelle 11 zeigt, hat

die Formulierung **L1<sub>Calcein</sub>** mit -60,4 V ein sehr hohes elektrokinetisches Potential, was darauf schließen lässt, dass diese Liposomen eine spannungsfreie Membran haben und daher lagerstabil sind. Die Formulierungen **L3<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>**, die beide das Helferlipid DOPE enthalten, zeigen mit rund -45 V fast gleichgroße Zeta-Potentiale und weisen damit eine geringere Lagerstabilität als **L1<sub>Calcein</sub>** auf. Die Liposomen **L2<sub>Calcein</sub>** sind durch das Helferlipid DDAB positiv geladen und zeigen mit einem Zeta-Potential von +21,2 V nur eine mäßige elektrostatische Stabilität. Da Liposomen mit positiver Ladung sehr schnell mit negativen Plasmaproteinen (z.B. Albumin) oder mit negativ geladenen Zellwänden aggregieren, was zu einer Verringerung der Plasmahalbwertszeit und eventuell zu einer unspezifischen Anreicherung in Geweben oder Organen (Leben, Milz) führt, werden vorwiegend negativ oder neutral geladene Liposomen verwendet. Um diese Aussagen vergleichend zu untersuchen, wurde eine positiv geladene Formulierung (**L2<sub>Calcein</sub>**) mitgeführt.

Nr.	Gesamtlipid		Größe		PI		Zeta-Potential		Beladungskonzentration	
	MW ± S.D. [μmol/ml]	MW ± S.D. [nm]	MW ± S.D. [nm]	MW ± S.D. [nm]	MW ± S.D. [V]	MW ± S.D. [V]	Calcein [mmol/mol TL]	Mitoxantron [μg/ml]	Calcein [mmol/mol TL]	Mitoxantron [μg/ml]
<b>L1<sub>Calcein</sub></b>	10,5 ± 1,0	128 ± 6	0,17 ± 0,11	0,17 ± 0,11	-60,4 ± 1,2	-60,4 ± 1,2	98,4 ± 5,1	—	98,4 ± 5,1	—
<b>L1<sub>Calcein</sub>-LG</b>	13,0 ± 0,5	139 ± 2	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,03	—	—	66,4 ± 1,8	—	66,4 ± 1,8	—
<b>L1<sub>MTO</sub></b>	7,6 ± 1,3	109 ± 2	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03	—	—	—	712,1 ± 42,7	—	712,1 ± 42,7
<b>L1<sub>MTO</sub>-LG</b>	5,0 ± 0,5	111 ± 1	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,07	—	—	—	551,4 ± 18,1	—	551,4 ± 18,1
<b>L2<sub>Calcein</sub></b>	7,0 ± 0,2	181 ± 1	0,25 ± 0,06	0,25 ± 0,06	+21,2 ± 1,3	+21,2 ± 1,3	63,4 ± 0,9	—	63,4 ± 0,9	—
<b>L3<sub>Calcein</sub></b>	8,6 ± 0,3	142 ± 1	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	-46,9 ± 1,9	-46,9 ± 1,9	56,2 ± 0,1	—	56,2 ± 0,1	—
<b>L4<sub>Calcein</sub></b>	12,4 ± 0,6	125 ± 2	0,22 ± 0,09	0,22 ± 0,09	-43,6 ± 1,9	-43,6 ± 1,9	82,6 ± 2,3	—	82,6 ± 2,3	—
<b>L4<sub>Calcein</sub>-LG</b>	11,2 ± 0,0	122 ± 4	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	—	—	73,7 ± 2,6	—	73,7 ± 2,6	—
<b>L4<sub>MTO</sub></b>	8,4 ± 1,2	103 ± 1	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,05	—	—	—	739,1 ± 56,9	—	739,1 ± 56,9
<b>L4<sub>MTO</sub>-LG</b>	5,6 ± 0,1	103 ± 0	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,03	—	—	—	602,9 ± 65,1	—	602,9 ± 65,1
<b>L5<sub>Calcein</sub></b>	9,2 ± 0,3	101 ± 1	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,05	-16,0 ± 0,3	-16,0 ± 0,3	42,3 ± 1,0	—	42,3 ± 1,0	—

**Abkürzungen:** **MW:** Mittelwert      **S.D.:** Standardabweichung      **PI:** Polydispersitätsindex

**Tab.11: Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften der verwendeten liposomalen Formulierungen.**



Die Quantifizierung zellulärer Aufnahme- und Transportprozesse erfolgte indirekt über einen nicht zytotoxischen, gut wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff, der in die Liposomen verkapselt und photometrisch bestimmt wurde. Die Verwendung des Fluorescein-Derivates Calcein (Abb.16) erlaubt aufgrund von fluoreszenzlöschenden Eigenschaften (Self-Quenching) einen sehr sensitiven quantitativen Nachweis von zellulär aufgenommenen bzw. durch die Zellbarriere hindurch transportierten Liposomen. Des Weiteren ist die Stabilitätsbestimmung von Liposomen sowohl während der Lagerung als auch im Serum leicht durchzuführen. Eine Fluoreszenzlöschung von mehr als 95 % wird bei Fluorescein-Derivaten ab einer Konzentration oberhalb von 100 mM beobachtet. Hierbei kommt es zur Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Fluorophores ohne dass der Fluorophor dabei zerstört wird. Calcein ist daher für diese Versuche (Differenzierung zwischen eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Marker) durch seine selbstlöschende Fluoreszenz in hohen Konzentrationen hervorragend geeignet und wurde deshalb als hydrophiler Marker eingesetzt. Die Beladungskonzentration der Liposomen mit dem hydrophilen Fluoreszenzmarker Calcein wurde über Fluoreszenzmessung ermittelt. Der Gehalt, der in den einzelnen Formulierungen verkapselt wurde, ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Die erreichte Beladungskonzentration der Liposomen lag zwischen 42 und 98 mmol/mol TL eingeschlossenem Calcein.

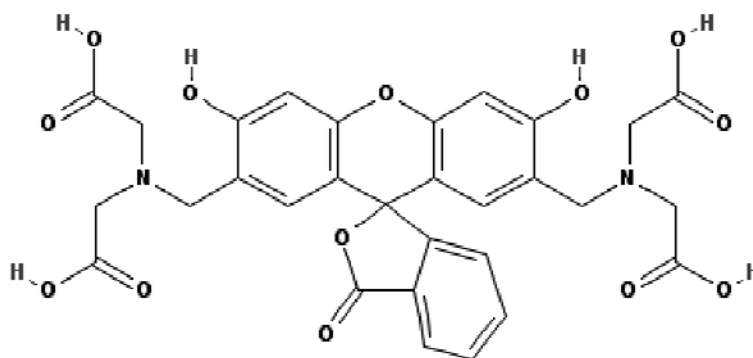
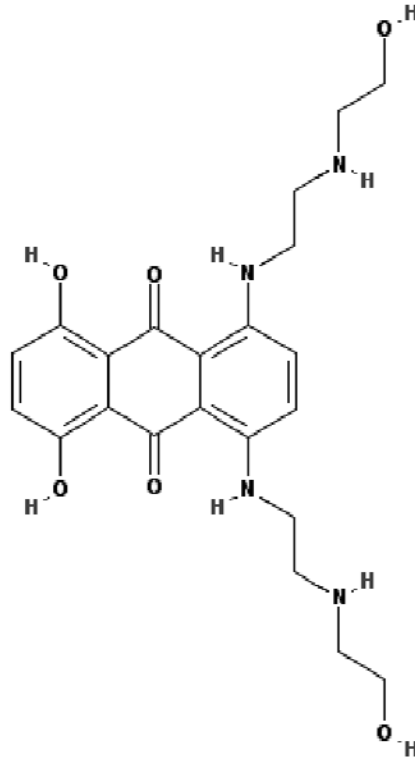


Abb.16: Strukturformel des Fluorescein-Derivates Calcein.

MTO (Abb.17) wurde für den Therapiever such sowie für die PK-Studie verwendet, da dieser Wirkstoff auch klinisch bei der Behandlung von Brustkrebs bzw. Brustkrebsmetastasen eingesetzt wird und das verwendete MT-3 Modell sehr gut auf MTO anspricht. Die Verkapselung des Zytostatikums MTO erfolgte mit der Ionengradienten-Technik in ausgewählte Formulierungen für die *in vivo* Versuche. Diese Beladungstechnik ist, wie oben bereits ausführlich beschrieben, besonders für schwache Basen und Säuren geeignet und ermöglicht bei der Verwendung von MTO Verkapselungsraten von mehr als 98 % [214]. Die photometrisch ermittelten MTO Konzentrationen (Tab.11), die nach dem Herstellungsverfahren von Fritze erreicht wurden, lagen mit 551 und 739  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingeschlossenem

MTO zwischen 55 und 74 %. Diese Beladungskonzentrationen der Liposomen waren aber für die *in vivo* Anwendung gut geeignet, da die Tiere mit einer Konzentration von 4 mg/kg und einer maximal i.v. zu applizierenden Menge von 200 µl je 20 g Körpergewicht behandelt werden sollten [215].



**Abb.17: Strukturformel des Topoisomerase II-Hemmers Mitoxantron.**

Zusammenfassend ist zur Liposomencharakterisierung zu sagen, dass kein Zusammenhang zwischen der Liposomenzusammensetzung, dem Gesamtlipidgehalt, der Verkapselungskapazität und der Größe der Liposomen festgestellt werden konnte. Lediglich die Ladung der Vesikel wirkte sich auf die Größe, jedoch nicht auf die Verkapselungsrate aus.

#### **4.2.2. Prüfung der Lagerstabilität und der Stabilität im Serum**

Für die Erstellung der Langzeitstabilitätsprüfung und der Serumfreisetzung wurden Beispielchargen von Calcein und MTO beladenen Liposomen verwendet.

Zur Bestimmung der Lagerstabilität der Liposomen in PBS bei 4 °C, die sowohl Calcein als auch MTO verkapselt hatten, wurde die Größenänderung (unimodaler Durchmesser und Größenverteilung) der Vesikel über die Zeit bestimmt. Die PCS Messungen ergaben für die meisten Liposomen eine gute Lagerstabilität über den angegebenen Zeitraum. Die Größenveränderung wurde durch die Steigung der Ausgleichsgeraden (Größenveränderungskoeffizient) im Diagramm des unimodalen

Durchmessers gegen die Zeit sowie die Größenzunahme in % für die jeweiligen Formulierung charakterisiert und ist in den Tabellen 12 und 13 dargestellt. Die graphische Darstellung der Liposomengrößen in nm über die Zeit (120 Tage bzw. 194 Tage; Abb.18, links) zeigt, dass Formulierungen mit einem hohen PC Anteil (**L1<sub>Calcein</sub>**, **L2<sub>Calcein</sub>**), Vesikel die OPP enthalten (**L4<sub>Calcein</sub>**) sowie die mit PEG stabilisierten Liposomen (**L5<sub>Calcein</sub>**) kaum einer Größenveränderung unterliegen, was sich in einem geringen Anstieg von  $\leq 0,04$  widerspiegelt, d.h. einem Zuwachs des Durchmessers von rund 4 % im untersuchten Zeitraum entspricht. Die Formulierung **L3<sub>Calcein</sub>**, mit dem geringsten PC Anteil, neigt dagegen zu einer Zunahme der Größe von bis zu 30 %, was an der Bildung von Aggregaten liegen könnte und damit eine Instabilität der Vesikel während der Lagerung aufzeigt. Die Erhöhung der Vesikelgröße von **L3<sub>Calcein</sub>** wurde zusätzlich von einer Verschlechterung der Größenverteilung um mehr als 100 % über diese Zeit begleitet. PC ist als Basislipid ein wichtiger Bestandteil bei der Ausbildung von Liposomen. Somit kann es bei einem geringen PC Anteil in der Lipidmembran zu Strukturveränderungen kommen, die eine Bildung von Agglomeraten fördern. Auch der erhöhte DOPE Anteil in dieser Formulierung trägt nicht zur Stabilisation der Membran bei.

Bezeichnung	L1 <sub>Calcein</sub>	L2 <sub>Calcein</sub>	L3 <sub>Calcein</sub>	L4 <sub>Calcein</sub>	L5 <sub>Calcein</sub>
Größenzunahme [%]	2	4	27	1	3
Anstiegskoeffizient	0,0138	0,0323	0,2821	0,0033	0,0358

**Tab.12: Lagerstabilität von Calcein-enthaltenden Liposomen.**

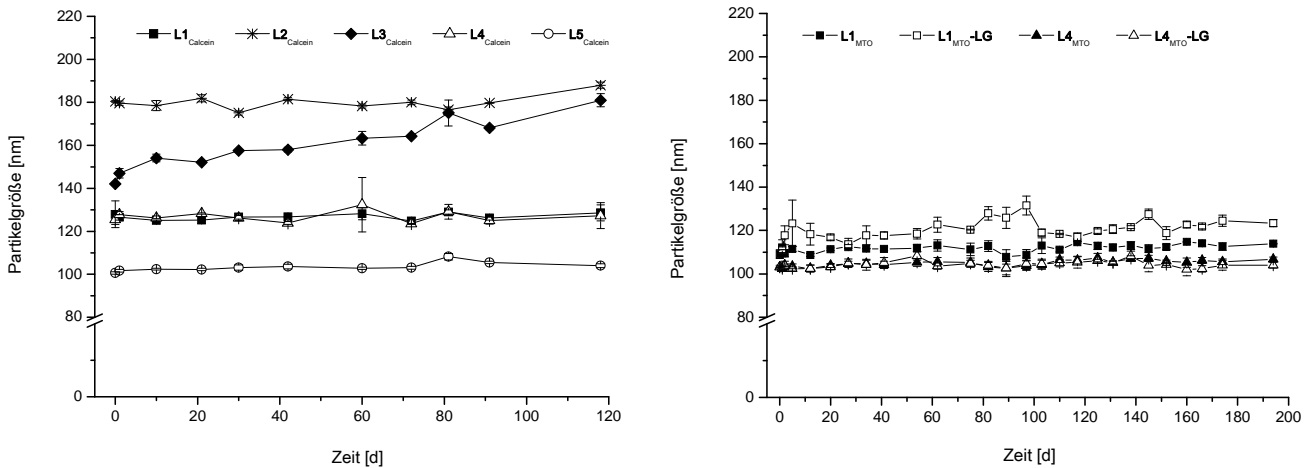
Die Größenveränderung von Calcein-enthaltenden Liposomen während der Lagerung in PBS bei 4 °C wurde über 120 d gemessen.

Bezeichnung	L1 <sub>MTO</sub>	L1 <sub>MTO-LG</sub>	L4 <sub>MTO</sub>	L4 <sub>MTO-LG</sub>
Größenzunahme [%]	4	11	3	1
Anstiegskoeffizient	0,0158	0,0394	0,0176	0,0047

**Tab.13: Lagerstabilität von MTO-enthaltenden Liposomen.**

Die Größenveränderung von MTO-enthaltenden Liposomen während der Lagerung in PBS bei 4 °C wurde über 194 d gemessen.

Weiterhin kann aufgrund des geringen Größenzuwachses bei der Langzeitlagerung der Vesikel **L1<sub>MTO-LG</sub>** und **L4<sub>MTO-LG</sub>** von rund 200 Tagen davon ausgegangen werden, dass eine Modifizierung der Oberfläche mit einem Angiopep-Liganden die Stabilität der Liposomen nicht beeinflusst (Abb.18, rechts).

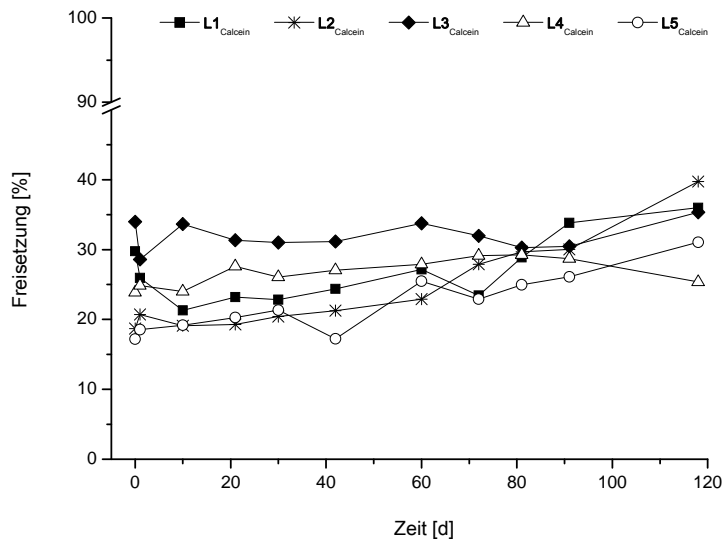


**Abb.18: Lagerstabilität der Liposomenpräparationen über die Zeit während der Lagerung in PBS bei 4 °C.**

Im linken Diagramm sind die Liposomen dargestellt, die Calcein verkapselt haben. Die MTO enthaltenden Vesikel ohne und mit Oberflächenmodifizierung, die auch in den *in vivo* Versuchen eingesetzt wurden, sind in der rechten Abbildung gezeigt. Dargestellt ist der MW der Partikelgrößen  $\pm$  S.D. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Einzelmessungen.

Ein weiteres Kriterium für die Anwendbarkeit von liposomalen Trägersystemen ist die Stabilität und Substanzfreisetzung während der Lagerung, was für eine spätere klinische Anwendung von großer Bedeutung ist. Zur Prüfung der Langzeitstabilität wurden die verschiedenen Formulierungen in PBS bei 4 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. Die freigesetzte Menge an Calcein aus den Liposomen wurde über Fluoreszenzmessung bestimmt. Die Experimente zur Lagerstabilität zeigten keinen oder nur einen geringen Austritt (6-21 %) von Calcein aus den Vesikeln. In Abbildung 19 ist die prozentuale Freisetzung von Calcein aus den Liposomen zu sehen.

Alle Formulierungen zeigten eine herstellungsbedingte Anfangskonzentration an freiem Calcein von 17 bis 26 %. Dieser relativ hohe Austritt des Calceins ist durch das entstandene Konzentrationsgleichgewicht, das sich nach der Abtrennung des freien Calceins nach der Säulenaufreinigung einstellt, zu erklären. Diese initiale Freisetzung des Calceins lässt aber keine Rückschlüsse auf die Stabilität der jeweiligen Formulierung zu. Bei den Liposomen  $L3_{Calcein}$ ,  $L4_{Calcein}$  und  $L5_{Calcein}$  kommt es zu keinem weiteren Calceinaustritt während des gesamten Messzeitraums, was eine hohe Lagerstabilität anzeigt. Dagegen zeigt die Formulierung  $L1_{Calcein}$  eine Zunahme des Markers im Puffer von rund 10 %. Auch bei den positiv geladenen Vesikeln  $L2_{Calcein}$  kommt es mit 23 % zu einem verstärkten Austritt des Calceins. Da diese Vesikel jedoch über den Zeitraum von 120 Tagen keine Größenänderung zeigten, scheint die Membran der Formulierung nicht zur Agglomeration oder zum Zerfall zu neigen, sondern bildet möglicherweise während der Lagerung kleine Poren, durch die der Marker entweichen kann.



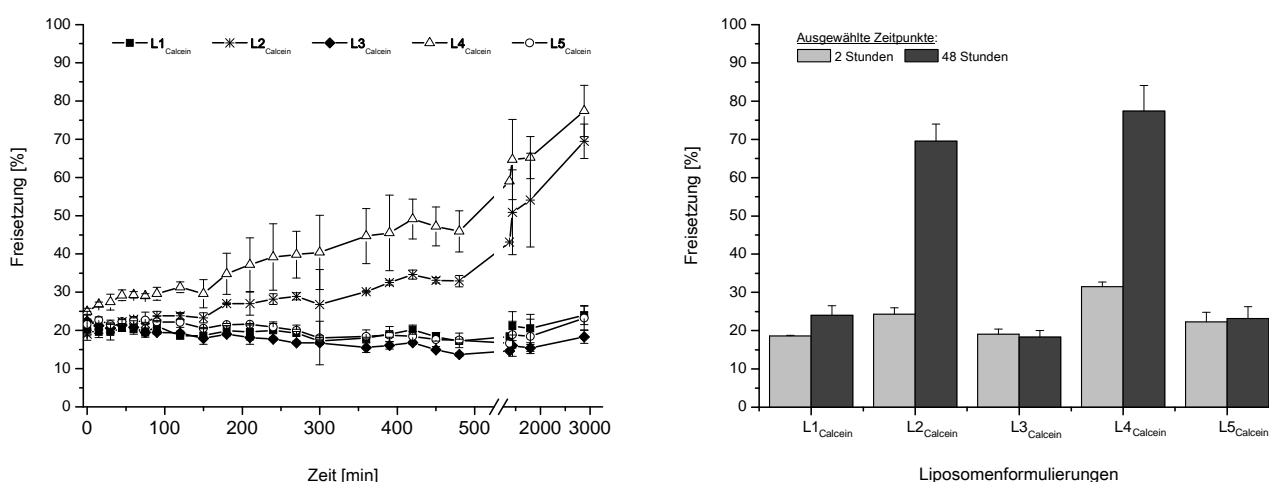
**Abb.19: Freisetzung des Fluoreszenzmarkers Calcein über die Zeit während der Lagerung in PBS bei 4 °C.**

Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und die Calceinkonzentrationen der einzelnen Formulierungen photometrisch, wie in 3.2.4. beschrieben bestimmt. Im Diagramm ist die Substanzmenge in % dargestellt, die aus den Liposomen ausgetreten ist.

Liposomale Formulierungen sollten, wenn sie für *in vivo* Versuche verwendet werden, nicht nur eine ausreichende Lagerstabilität haben, sondern auch in serumhaltigem Milieu ein bestimmtes Freisetzungverhalten aufweisen. Aus diesen Freisetzungsexperimenten können Aussagen über die Wirkstofffreisetzung von Liposomen im Blutkreislauf nach i.v. Applikation abgeleitet werden. In der klinischen Anwendung ist eine gleichmäßige Freisetzung des Wirkstoffes über die Zeit, also eine sogenannte Depotwirkung („slow release“ Effekt) erwünscht. Kommt es zu einer sehr schnellen Freisetzung des Arzneistoffes, treten Peak-Blutplasmaspiegel auf, die zu unerwünschten Nebenwirkungen führen können. Aber auch der gegenteilige Effekt, eine zu geringe oder keine Freisetzung von Wirkstoffen, führt zu einer Unterdosierung am Wirkungsort und damit zu einem verminderten therapeutischen Effekt.

Bei der Verwendung eines Targeting-Systems sollen die Vesikel nicht nur spezifisch am Zielort angereichert werden, sondern den enthaltenen Wirkstoff auch freisetzen. Da die Freisetzung aber nicht so genau gesteuert werden kann, dass sie erst nach der spezifischen Anreicherung durch das Targeting am Tumor ausgelöst wird, muss ein Kompromiss für die Wirkstofffreisetzung gefunden werden. Aufgrund der allgemein relativ geringen Zirkulation von Liposomen in Blutkreislauf ist ein „slow release“ Effekt, im Gegensatz zu den beiden anderen Möglichkeiten (schnelle Freisetzung, keine Freisetzung), der günstigste Freisetzungsverlauf, da es hierdurch am Wirkungsort auch noch zu einer verlängerten Konzentrationsanreicherung kommen könnte. Somit ist die Freisetzung im Serum ein wichtiges Kriterium für die Anwendbarkeit von Liposomen.

Zur Testung der Serumstabilität der Liposomen wurde ein Fluoreszenzmarker in die Vesikel eingeschlossen. Das Fluorescein-Derivat Calcein ermöglicht durch seine selbstlöschenden Eigenschaften eine sehr gute Differenzierung zwischen eingeschlossener und freigesetzter Substanz. Die mit Calcein erhaltenen Ergebnisse können allerdings nicht direkt auf das Freisetzungsverhalten von MTO aus den Liposomen übertragen werden, da sich beide Substanzen in ihrer Lipophilie, ihrer Größe und ihrem sterischem Aufbau unterscheiden. Dennoch können auch Aussagen zur Membranstabilität der mit Wirkstoff beladenen Vesikel  $L1_{MTO}$  und  $L4_{MTO}$  gemacht werden, da beide Substanzen in der wässrigen Phase der Liposomen enthalten sind und bei Instabilität oder Beschädigung der Lipiddoppelschicht freigesetzt werden. So wurden die Formulierungen  $L1_{Calcein}$  -  $L5_{Calcein}$  für 48 h bei 25 °C im serumhaltigen Puffer (1:1, v/v) unter Rühren inkubiert und das freigesetzte Calcein zu definierten Zeitpunkten gemessen. Die Freisetzung des Markers erfolgte in mehreren Phasen. In der ersten Phase, der s.g. Bolusphase, wird unmittelbar nach der Zugabe ein Teil des eingeschlossenen Calceins bei allen Formulierungen schnell freigesetzt (Abb.20).



**Abb.20: Stabilität von Calcein-enthaltenden Liposomen während 48-stündiger Inkubation in serumhaltigem Puffer bei 25 °C.**

Die Liposomen wurden mit Calcein in einer selbstlöschenden Konzentration von 50 mM verkapselt. Kommt es serumbedingt zum Austritt des Calceins aus den Vesikeln, wird die Selbstlöschung durch die Verdünnung im Serum aufgehoben und es ist ein Fluoreszenzsignal messbar. In der linken Abbildung ist die Freisetzung von Calcein aus den Liposomen  $L1_{Calcein}$ - $L5_{Calcein}$  dargestellt. Zur Verdeutlichung des Freisetzungsprozesses wurden beispielhaft die Raten für die Zeitpunkte 2 h und 48 h als Balkendiagramm (rechts) abgebildet. Alle Werte geben den MW  $\pm$  S.D. für zwei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen wieder.

Nach achtstündiger Inkubation der Liposomen wurde, in der sich anschließenden zweiten Phase (Plateauphase), nur noch eine geringe Freisetzung ( $L2_{Calcein}$  und  $L4_{Calcein}$ ) bzw. keine weitere Freisetzung ( $L1_{Calcein}$ ,  $L3_{Calcein}$  und  $L5_{Calcein}$ ) des Markers gemessen. Diese Plateauphase hält für die Formulierungen  $L1_{Calcein}$ ,  $L3_{Calcein}$  und  $L5_{Calcein}$  über die gesamte Versuchsdauer von 48 h an, was darauf schließen lässt, dass diese Vesikel sehr stabil sind und es keine Veränderungen oder Beschädigungen

an der Membran (z.B. Porenbildung) gibt. Im Gegensatz dazu kam es bei den Formulierungen **L2<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>** zu einer gleichmäßigen Freisetzung des Calceins über die Zeit. Nach 48 h waren  $69,5 \pm 4,5$  % des verkapselten Calceins aus den Liposomen **L2<sub>Calcein</sub>** und  $77,4 \pm 6,7$  % aus **L4<sub>Calcein</sub>** freigesetzt (Abb.20). Somit zeigten die Formulierungen **L2<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>** eine dem oben beschriebenen Kompromiss entsprechende Serumstabilität für die vorgesehene therapeutische Anwendung. Die Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>**, **L3<sub>Calcein</sub>** und **L5<sub>Calcein</sub>** wiesen dagegen eine zu stabile Membran auf, wodurch eine Freisetzung des Markers bzw. des Wirkstoffes in den späteren *in vivo* Versuchen möglicherweise verzögert wird.

Vergleicht man die Freisetzungsraten der einzelnen Formulierungen miteinander, kann keine Korrelation zwischen dem Austritt von Calcein in PBS und im Serum festgestellt werden. Die unterschiedlichen Freisetzungsraten beruhten auf der Zusammensetzung der Liposomen, wobei vorwiegend die Ladung (DDAB und DCP) und der Anteil der Helferlipiden (DOPE, OPP und PEG) eine wichtige Rolle spielte. Zum Beispiel könnten die positiv geladene Formulierung **L2<sub>Calcein</sub>** im Serum mit Plasmaproteinen interagieren, was zu einer Beschädigung der Membran (Porenbildung) oder zu Agglomeraten führen könnte, denn in PBS waren diese Vesikel über einen ausreichenden Zeitraum stabil und zeigten keine Membranveränderungen. Diese Wechselwirkungen würden dann zu einer gleichmäßigen Freisetzung des Markers im Serum führen. Bei den negativ geladenen Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** ist von einem anderen Freisetzungsmechanismus ausgegangen worden. Diese Formulierung enthielt eine Kombination der Helferlipide DOPE und OPP, die die Membranorganisation störten und bei höheren Temperaturen (25 °C) zu einem Anstieg der Membranfluidität führten [218] (siehe 4.3.). Das wiederum bewirkte, aufgrund der ungeordneten Struktur der Lipide, eine Durchlässigkeit der Membran, was zu einer gleichmäßigen Freisetzung des Calceins über die Zeit führen könnte. Auch diese Formulierung war in PBS bei 4 °C stabil. Eine Beschichtung der Liposomen mit PEG hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung weder in PBS noch in Serum.

### **4.3. Strukturanalyse von Liposomen mittels elektronenparamagnetischer Resonanzmessung**

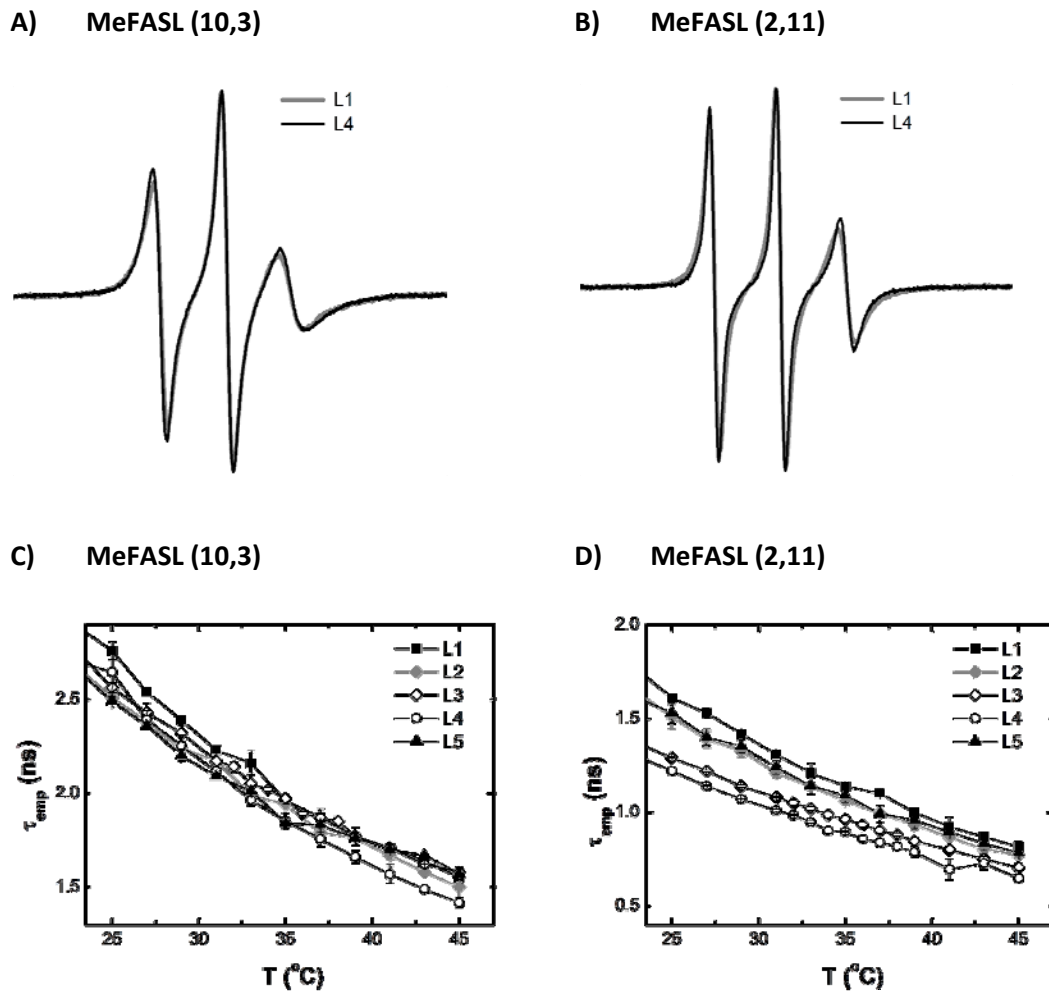
Die strukturellen Eigenschaften der Doppellipidmembranen der Liposomen konnten durch EPR Messungen charakterisiert werden. Hierzu wurden die unterschiedlichen Membranbereiche mit den Spin-Sonden MeFASL (10,3) und MeFASL (2,11) markiert, welche Doxylderivate des Palmeylsäuremethylesters sind und eine Nitrogruppe am Kohlenstoffatom 5 und 13 der Alkylphospholipidkette (gezählt von der Methylgruppe) haben. Die so vorbereiteten Proben wurden mit einem X-Band ERP Spektrometer vermessen und EPR Spektren für jede Probe aufgezeichnet (Abb.21 A und B). Aus diesen Spektren konnte die empirische Korrelationszeit  $T_{emp}$  für die Spin-

Sonden MeFASL (10,3) und MeFASL (2,11) in den Formulierungen kalkuliert werden (Abb.21 C und D). Die empirische Korrelationszeit ( $T_{emp}$ ) vermittelt Informationen über die Mikroviskosität des die Spin-Sonden umgebenden Mediums (Lipide) und verläuft indirekt proportional zur durchschnittlichen Membranfluidität, d.h. mit fallender  $T_{emp}$  nimmt die Membranfluidität zu. Die Berechnungen von  $T_{emp}$  aus den EPR Spektren ergaben höhere  $T_{emp}$  Werte für die Spin-Sonde MeFASL (10,3), die die Ordnung und Dynamik von Membranlipiden im oberen, nah an der Oberfläche liegenden Teil der Membranbereich widerspiegelt. Die Spin-Sonde MeFASL (2,11) wiederum charakterisiert die Membraneigenschaften im inneren Teil der Lipiddoppelschicht, wo ein geringerer Ordnungszustand herrscht, weil die Dynamik der Alkylketten höher ist.

Die Messwerte für  $T_{emp}$  ergaben (Abb.21 C und D), dass für beide Spin-Proben die Liposomen **L1<sub>PBS</sub>** mit der höchsten Korrelationszeit am rigidesten von allen Formulierungen waren. Dagegen waren die Vesikel **L4<sub>PBS</sub>**, die die Helferlipide DOPE und OPP enthalten, über den gesamten Temperaturbereich am fluidesten wie die Messung mit MeFASL (2,11) zeigte. Mit der Spin-Sonde MeFASL (10,3) änderte sich dieses Verhalten dagegen aber bei Temperaturen unter 35 °C (Abb.21 C). Diese Ergebnisse sind auf das Helferlipid DOPE zurückzuführen, da es in tieferen Regionen der Liposomenmembran die Ordnung der Lipide durch seine Doppelbindungen der Alkylketten stört und somit zu einer größeren Dynamik dieser Membranschicht führt [220]. An den oberflächennahen Membranbereichen ist die Auswirkung des DOPE dagegen nicht mehr so stark ausgeprägt bzw. kann durch den erhöhten Anteil von Cholesterol, der zu einer Stabilisierung der Membran führt, ausgeglichen werden [219]. Es ist bekannt, dass DOPE die fusogenen Eigenschaften von Membranen fördert. Dieser Eigenschaft bedient man sich auch in der Molekularbiologie bei der nichtviralen Gentransfektion mit Liposomen. Hierbei kann DOPE eine Fusion zwischen Lipoplex und Endosomenmembran vermitteln [220-221]. Dieser Effekt entsteht durch den Übergang von einer lamellaren in eine nichtlamellare Phase, wenn sich der Platzbedarf durch den entgegengesetzten Einbau der kegelförmig aufgebauten Lipide (z.B. Cholesterol) ändert [222].

Einen weiteren Einfluss auf die oben beschriebenen Ergebnisse kann auch das Helferlipid OPP (Perfusine) haben, das strukturell zu den Alkylphospholipiden gehört. OPP stört wie DOPE die Organisation der Lipiddoppelschicht und fördert Interaktionen von Membran zu Membran, denn beide Lipide haben einen ähnlichen molekularen Raumbedarf (kegelförmige Lipidstruktur) [218]. Basierend auf den vorgestellten Ergebnissen und den bisherigen Erkenntnissen zur Mikroorganisation von Alkylphospholipid enthaltenden liposomalen Membranen [223], ist zusammenzufassen, dass die Kombination der beiden, in Formulierung **L4<sub>PBS</sub>** enthaltenen Lipide DOPE und OPP, die Organisation der Membran mehr beeinflusst als die Einzelkomponenten.





**Abb.21:** EPR-Spektren und die daraus kalkulierte Korrelationszeit  $\tau_{emp}$  von PBS-haltigen Liposomen über einen Temperaturbereich von 25 °C bis 45 °C.

Die Membranfluidität von unterschiedlich zusammengesetzten Liposomen kann mittels EPR nach Einbau von Spin-Sonden gemessen werden. **A** zeigt ein Beispiel EPR-Spektrum der Formulierungen **L1**<sub>PBS</sub> und **L4**<sub>PBS</sub>, die mit MeFASL (10,3) markiert wurden. **B** zeigt ein Beispiel-EPR Spektrum von den Formulierungen **L1**<sub>PBS</sub> und **L4**<sub>PBS</sub>, die mit MeFASL (2,11) markiert wurden. Beide Spektren sind bei 37 °C aufgenommen worden. Aus allen gemessenen EPR-Spektren wurden die unter **C** und **D** abgebildeten Diagramme für die Korrelationszeiten  $\tau_{emp}$  über ein Temperaturspektrum von 25 °C bis 45 °C korreliert.

Spin-Sonden: MeFASL (10,3) gibt die Eigenschaften des äußeren Membranbereiches, nahe der Oberfläche, wieder (**A** und **C**);

MeFASL (2,11) gibt die Fluidität der Membran im mittleren Bereich an (**B** und **D**). Alle Werte geben die gemittelten  $\tau_{emp} \pm$  S.D. von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Einzelmessungen für jede liposomale Formulierung wieder.

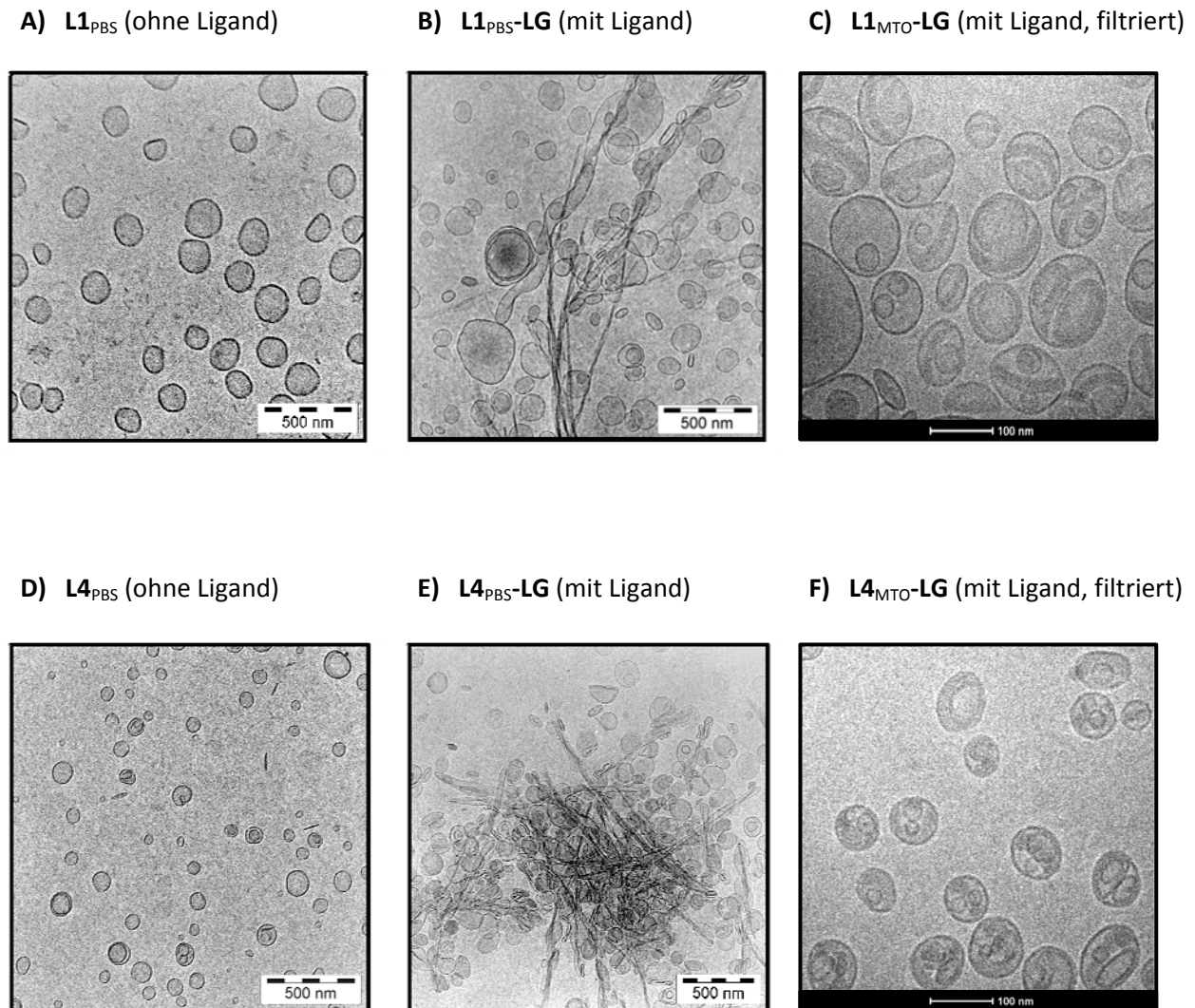
Beim Vergleich der Korrelationszeiten anderer Formulierungen für die beiden Spin-Sonden fällt auf, dass die Aussagen zur Fluidität der Membranen die mit MeFASL (2,11) gemessen wurden, nicht mit denen von MeFASL (10,3) korrelieren. Es zeigte sich bei den Messungen mit MeFASL (10,3), dass die DOPE/OPP-haltigen Liposomen **L4**<sub>PBS</sub> und die positiv geladene Formulierung **L2**<sub>PBS</sub> im Vergleich zu den anderen drei Formulierungen am fluidesten in den oberen, oberflächennahen Membranbereichen

waren, was sich in einer sehr geringen  $T_{emp}$  widerspiegelte (Abb.21 C). Bei den Messungen mit der Spin-Sonde MeFASL (2,11), die Auskunft über den inneren Teil der Lipiddoppelschicht gibt, konnte ebenfalls für **L4<sub>PBS</sub>** die geringste  $T_{emp}$  gefunden werden. Etwas niedriger war die Korrelationszeit für **L3<sub>PBS</sub>**, was auch eine hohe Beweglichkeit der Lipide bestätigte, während die Formulierungen **L2<sub>PBS</sub>** (positiv geladen), **L5<sub>PBS</sub>** (sterisch stabilisiert mit PEG) und **L1<sub>PBS</sub>** (Basiszusammensetzung) eine hohe  $T_{emp}$  und damit starre Alkylketten aufwiesen (Abb.21 D).

#### 4.4. Strukturanalyse von Liposomen mittels kryogener Transmissionselektronenmikroskopie

Die morphologische Struktur der liposomalen Formulierungen **L1<sub>PBS</sub>** und **L4<sub>PBS</sub>**, der oberflächenmodifizierten Vesikel **L1<sub>PBS</sub>-LG** und **L4<sub>PBS</sub>-LG** (ohne Extrusion) sowie **L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** (mit Extrusion durch 400 nm Filter) wurden durch kryogene Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) untersucht. Hierzu wurden die Formulierungen **L1** und **L4** mit PBS bzw. mit MTO beladen und die Liposomen **L1<sub>PBS</sub>-LG** und **L4<sub>PBS</sub>-LG** sowie **L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** durch eine Oberflächenmodifizierung mit dem Liganden 19-mer-Peptid **1** bestückt. Die Cryo-TEM-Aufnahmen (Abb.22) zeigen die Struktur der entstandenen LUV und OLV Dispersionen.

Die Formulierung **L1<sub>PBS</sub>** ohne Ligand (Abb.22 A) zeigen unilamellare Vesikel mit einer einheitlichen Größenverteilung. Bei den Aufnahmen der Liposomen **L4<sub>PBS</sub>** ohne Ligand (Abb.22 D) ist ein Gemisch aus LUV und OLV zu sehen, die aber auch eine einheitliche Größenverteilung zeigen. Die Einführung eines Liganden mittels PIT führte dagegen deutlich zu strukturellen Veränderungen der Liposomendispersion. In der Abbildung 22 B und E ist eine Mischung aus LUV und OLV (**L1<sub>PBS</sub>-LG** und **L4<sub>PBS</sub>-LG**) zu sehen, die im Bild als kreisförmige Strukturen dargestellt sind sowie Fremdstrukturen (länglichen Strukturen), die auf Interaktionen der einzelnen Vesikel mit den Peptiden schließen lassen. Diese strukturellen Veränderungen der Liposomendispersion waren auch sehr gut über die Größenbestimmung mittels PCS nachweisbar. Hierbei kam es zu einer Erhöhung des unimodalen Durchmessers von rund 125 nm auf über 220 nm mit einer sehr inhomogenen Größenverteilung ( $PI > 0,9$ ) (nicht in Tab.11 gezeigt). Aufgrund dieser Veränderungen war es notwendig, die Liposomen nach der Kopplung des Liganden an der Vesikeloberfläche durch anschließende Extrusion (Polykarbonat-Filter,  $\varnothing$  400 nm) zu homogenisieren (**L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG**; Abb.22 C und F, Partikelgrößen in Tab.11). Besonders vor dem Gebrauch der Liposomen in den *in vivo* Untersuchungen war dieser Schritt sehr wichtig, um eine Aggregation mit möglicher Thrombusbildung bei der Injektion zu verhindern. Nach dieser zusätzlichen Extrusion blieben die Liposomen auch über 190 Tage bei 4 °C in PBS gelagert in ihrer Größe stabil und zeigten keine weitere Aggregatbildung (Tab.12-13, Abb.18, Abb.22 E und F). Des Weiteren wurde keine bemerkenswerte Freisetzung des Markers bzw. des Wirkstoffes aus den ligandentragenden Formulierungen beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abb.22: Strukturelle Charakterisierung von liposomalen Dispersionen mit Cryo-TEM.**

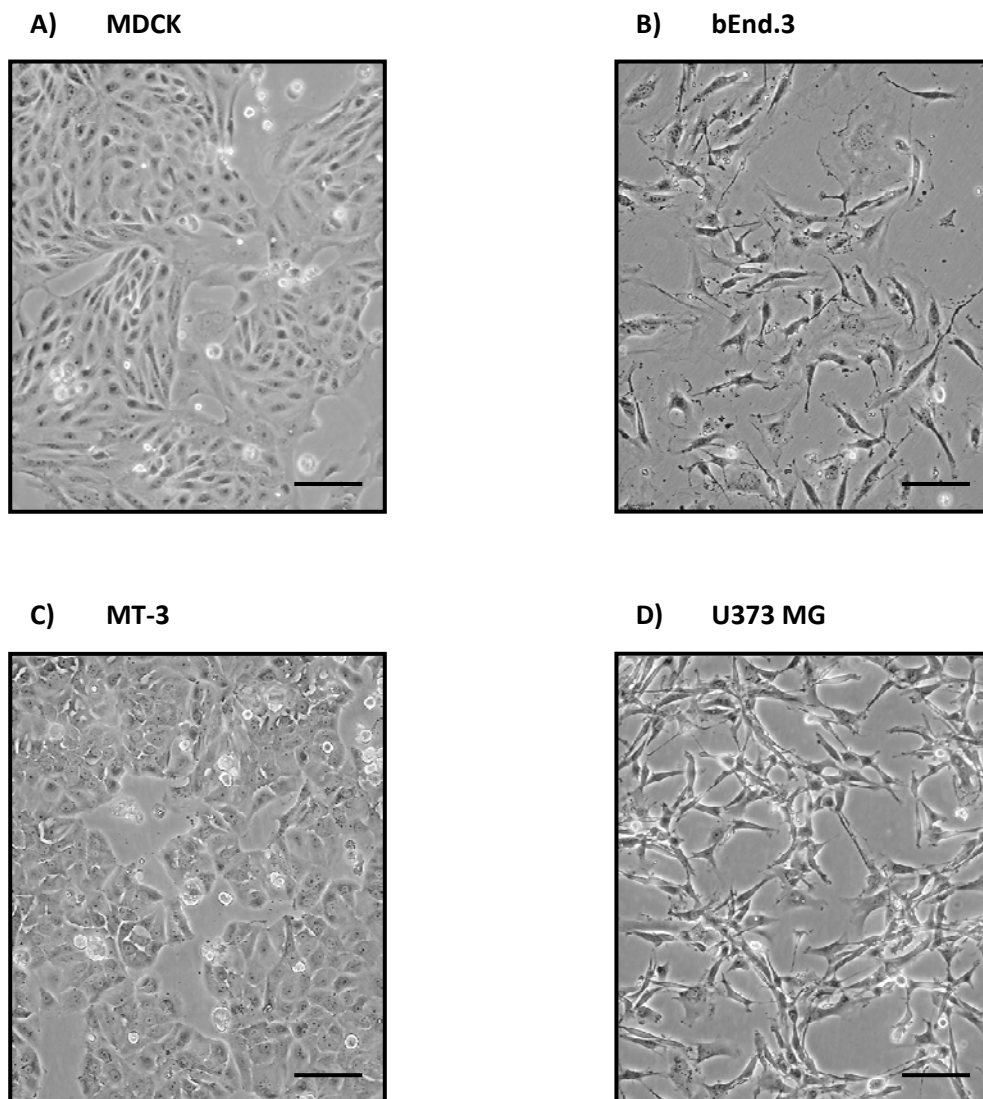
Zur Durchführung der Cryo-TEM wurden PBS und MTO enthaltende Liposomen (**L1** und **L4**) hergestellt und mittels PIT mit dem Liganden 19-mer-Peptid **1** gekoppelt. Die Aufnahmen zeigen die liposomalen Strukturen von Liposomen ohne Ligand (**L1<sub>PBS</sub>**, **A** und **L4<sub>PBS</sub>**, **D**), nach der Oberflächenmodifizierung mit Ligand ohne weitere Nachbearbeitung (**L1<sub>PBS</sub>-LG**, **B** und **L4<sub>PBS</sub>-LG**, **E**) und mit einer Nachbearbeitung mittels Extrusion durch einen 400 nm Filter (**L1<sub>MTO</sub>-LG**, **C** und **L4<sub>MTO</sub>-LG**, **F**).

#### 4.5. Etablierung und Charakterisierung verschiedener Zelllinien

Zur Untersuchung der Penetration und Permeation von Arzneistoffen und Trägersystemen werden hauptsächlich Zellkulturmodelle eingesetzt. Zum Beispiel wird bei Studien zum Stofftransport durch intestinales Epithel häufig das Caco-2-Modell eingesetzt. Die Permeabilität der BHS kann auch an geeigneten Modellen untersucht werden [204; 205].

Aus verschiedenen Zelllinien wurden hierfür die epithelialen Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen ausgewählt, deren Eigenschaften gut charakterisiert sind [224]. MDCK Zellen bilden gut wachsende und sehr dichte Monolayer aus, weshalb sie ein häufig verwendetes und bereits gut in

der Forschung etabliertes Zellmodell für Penetrations- und Permeationsstudien sind [204; 240]. Weiterhin wurden die murinen endothelialen bEnd.3 Zellen etabliert und deren Wachstumsbedingungen charakterisiert. Diese Zelllinie bildet ebenfalls sehr dichte Monolayer aus. Damit standen zwei gut handhabbare Zelllinien für die weiteren Versuche zur Verfügung. Des Weiteren wurde eine humane Mammakarzinomzelllinie (MT-3) und humane Glioblastomzellen (U373 MG) mit einbezogen, die in den *in vivo* Experimenten als Xenografts eingesetzt werden sollten. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wachsen in Kultur sehr stabil und konstant. Abbildung 23 zeigt mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien im proliferierenden Zustand.



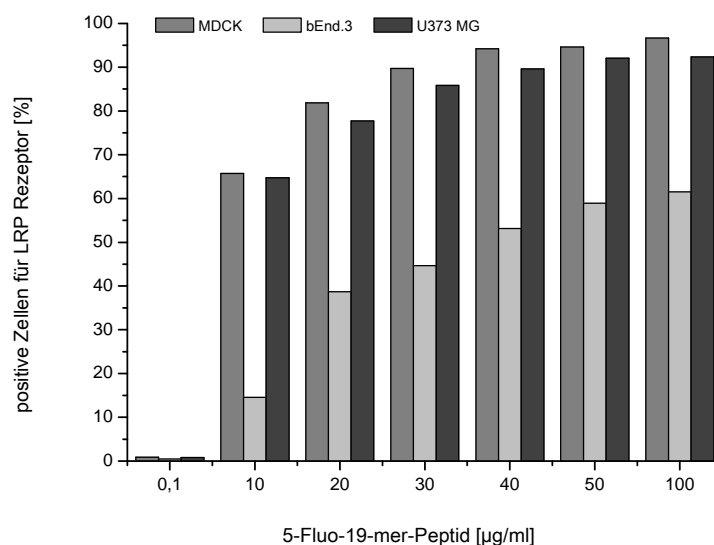
**Abb.23: Mikroskopische Darstellung von adhären wachsenden Zellen.**

Die Abbildungen zeigen MDCK (A), bEnd.3 (B), MT-3 (C) und U373 MG (D) Zellen, die noch keinen dichten Monolayer ausgebildet haben, sondern sich noch im proliferierenden Zustand befinden.

Der Größenbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6. *in vitro* Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie

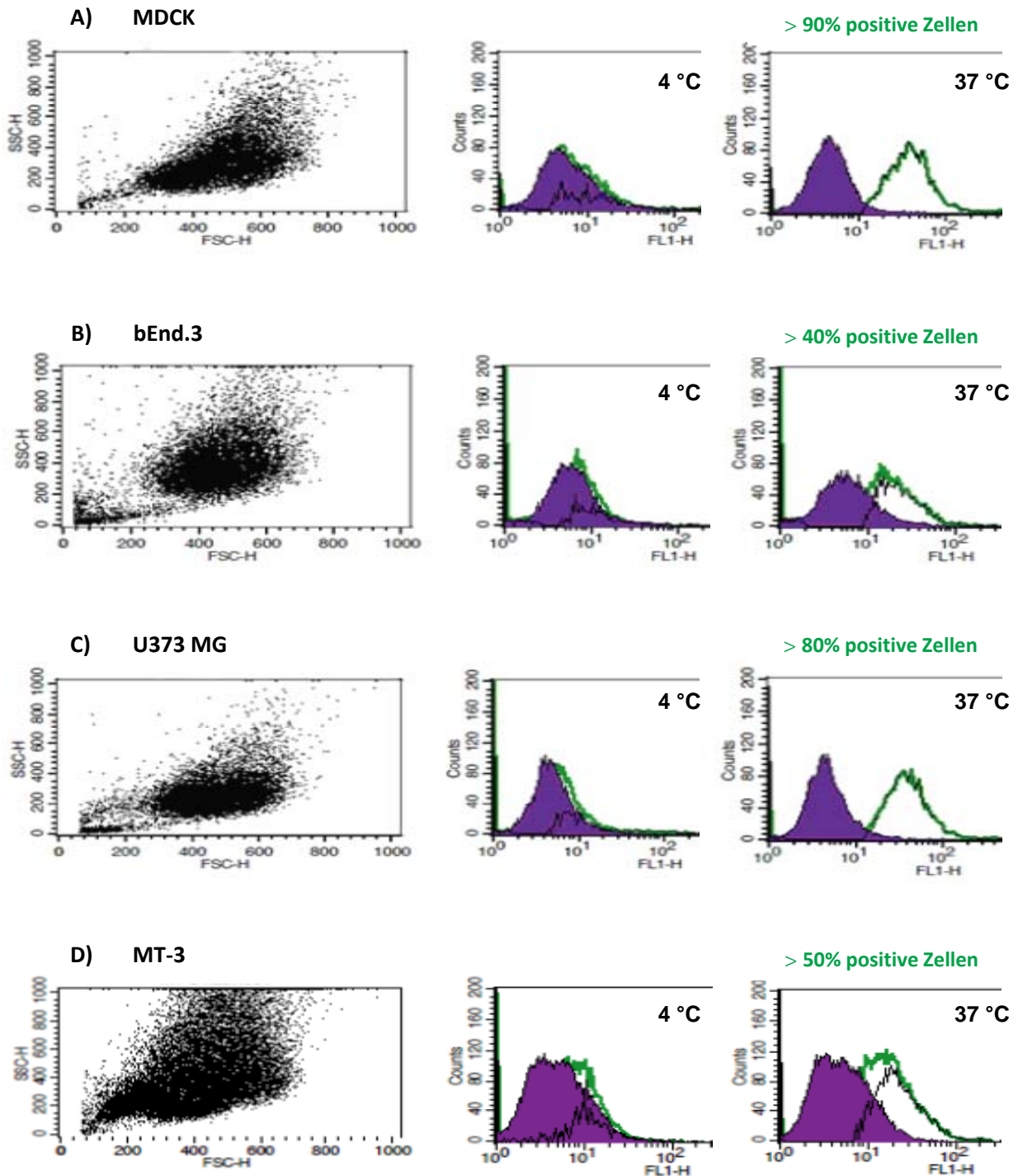
Die Charakterisierung der Rezeptorausstattung von „Low density lipoprotein Rezeptor-related Protein“ (LRP1) an der Zellmembranoberfläche der Zelllinien MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS). Zur Validierung dieser Methode wurde das fluoreszenzmarkierte Peptid **2** (5-Fluo-19-mer-Peptid) eingesetzt. Ein Schwerpunkt der Verfahrensoptimierung war die Untersuchung des Einflusses der eingesetzten Ligandenkonzentration auf die Bindungssättigung an der Zellmembranoberfläche. Das Ergebnis dieser Optimierung in Abbildung 24 zeigt, dass eine Sättigung der Rezeptoren auf den Zellen erreicht wurde, wenn 50 µg oder mehr Substrat (Peptid **2**) eingesetzt wurden.



**Abb.24: LRP Rezeptorausstattung der Zellmembranoberflächen von MDCK, bEnd.3 und U373 MG Zellen in Abhängigkeit von der Menge des zugesetzten 5-Fluo-19-mer-Peptids.**

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des fluoreszenzmarkierten Peptids **2** bei 37 °C für 60' inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, abgelöst und 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) vermessen. Dargestellt ist die Anzahl LRP Rezeptor positiver Zellen in %, basierend auf den mittleren Fluoreszenzintensitäten (mFI) des Histogrammplots. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

Unter diesen optimierten Bedingungen ließ sich die Rezeptorausstattung des LRP quantitativ nachweisen. Die Zellpopulationen zeigten in der FACS Analyse nur eine geringe Streuung der Zelleigenschaften, die im Streulichthistogramm (SSC / FSC: Seitwärtsstreulicht / Vorwärtsstreulicht) der FACS Messung als eine Wolke dargestellt sind. Die Messung einer einheitlichen Zellpopulation ist für die quantitative Auswertung von FACS Analysen von großer Bedeutung (Abb.25).



**Abb.25: Graphische Darstellung der FACS Ergebnisse der LRP Rezeptorausstattung von MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 Zellen.**

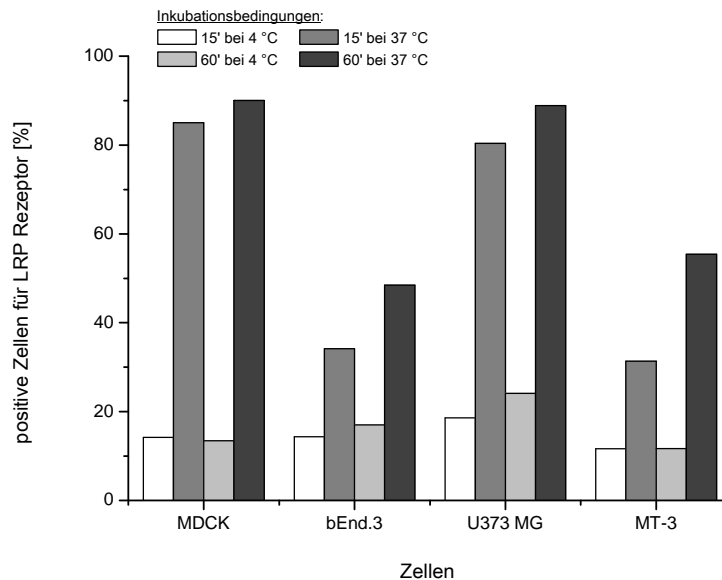
FACS Diagramm für MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit 50  $\mu\text{g}$  fluoreszenzmarkiertem 5-Fluo-19-mer-Peptids 2 bei 4 °C und 37 °C zum Nachweis der LRP Ausstattung. Dargestellt sind die Messungen im Streulichtkanal SSC/FSC und im Fluoreszenzkanal 1 (FL1-H).

*Links:* Darstellung der gesamten Zellpopulation (10.000 Zellen) im Streulichtkanal.

*Mitte und Rechts:* Dargestellt ist ein FACS-Histogramm im Fluoreszenzkanal 1; blaue Fläche: native Kontrollzellen, Histogrammfläche unter der grünen Linie: Zellen nach Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Liganden (LRP positive Zellen).

Die Ergebnisse der FACS Messungen ergaben, dass alle Zelllinien den LRP auf ihrer Zellmembranoberfläche exprimieren (Abb.25 und 26). Mehr als 90 % der gemessenen MDCK Zellen waren unter Sättigungsbedingungen, der Inkubation von 50 µg/ml des Peptids **2**, LRP Rezeptor positiv. Von den bEnd.3 Zellen sind dagegen nur 48 % der Zellen LRP positiv, bei gleichen Inkubationsbedingungen. Überraschend war, dass auch die Tumorzellen U373 MG mit 89 % und MT-3 mit 55 % positiven Zellen eine hohe Expression des LRP aufwiesen. Somit kann der an der Liposomenoberfläche gebundene Ligand nicht nur für ein Targeting der BHS sondern gleichzeitig für ein Targeting der Tumorzelle eingesetzt werden, was den therapeutischen Effekt zusätzlich begünstigen könnte. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die Liposomen den Tumor intakt erreichen. Kommt es zu einer vorzeitigen Wirkstofffreisetzung, geht dieser Effekt verloren.

Um eine unspezifische Bindung des Liganden **2** an der Zellmembranoberfläche ausschließen zu können, wurden die Bindungsexperimente unter gleichen experimentellen Bedingungen (50 µg/ml von Peptid **2**) auch bei 4 °C durchgeführt. Es wurden jedoch keine oder kaum Fluoreszenzsignale im FACS gemessen. Zur Quantifizierung der LRP Ausstattung der Zelllinien wurden die Fluoreszenzsignale der unspezifischen Bindungen von den Daten der Messungen bei 37 °C abgezogen.



**Abb.26: FACS Messungsergebnisse der LRP Rezeptorausstattung von MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 Zellen.**

Die Zellen wurden mit 50 µg/ml fluoreszenzmarkiertem 5-Fluo-19-mer-Peptids **2** bei 4 °C und 37 °C für 15' bzw. 60' inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, abgelöst und 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) vermessen. Dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen für den LRP Rezeptor in %, basierend auf den mittleren Fluoreszenzintensitäten (mFI) des Histogrammplots. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

#### 4.7. *in vitro* Quantifizierung der Aufnahme rate vom Liposomen

Die Aufnahme liposomaler Formulierungen in Zellen hängt von den Eigenschaften der Vesikel ab [225], die wiederum durch das Herstellungsverfahren und die Lipidzusammensetzung bestimmt werden [226]. Es ist bekannt, dass die Größe [128; 227], die Ladung [228-230], die Fluidität und Rigidität [128] sowie eine Oberflächenmodifizierung durch sterische Stabilisatoren oder Vektoren eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Liposomen durch Tumorzellen und Makrophagen spielen. Die Aufnahme von liposomalen Vesikeln durch Endothel- oder Epithelzellen wurde dagegen bislang noch nicht so ausführlich untersucht [231-233].

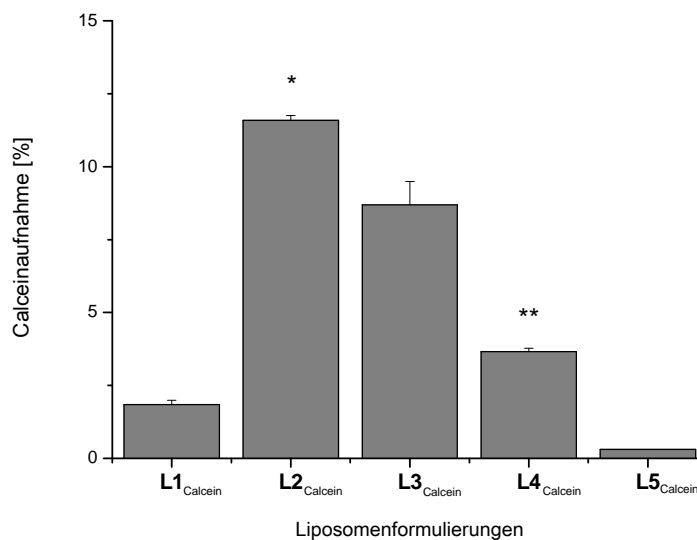
Die zelluläre Aufnahme wurde von allen 25 hergestellten Formulierungen *in vitro* bestimmt (*Tabelle B*, Anhang). Hierfür wurden epitheliale MDCK Zellen verwendet, da diese gut wachsende Zelllinie einen dichten Monolayer ausbildet und sich bereits bei Studien zur Penetration und Permeation von Arzneistoffen und Trägersystemen bewährt hat [204; 240]. Weiterhin wurden die endothelialen bEnd.3 Zellen sowie die Tumorzelllinien U373 MG und MT-3 untersucht.

Es zeigte sich, dass die Liposomen aufgrund ihrer Zusammensetzung sehr unterschiedlich von den Zellen aufgenommen wurden. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf die fünf ausgewählten Formulierungen (**L1<sub>Calcein</sub>**-**L5<sub>Calcein</sub>**), die entweder die höchste Aufnahme rate in den Zellen zeigten oder als Kontrollformulierung eingesetzt wurden (Tab.5). Zur Bestimmung der Aufnahme rate wurden der Fluoreszenzmarker Calcein in den Liposomen **L1<sub>Calcein</sub>**, **L2<sub>Calcein</sub>**, **L3<sub>Calcein</sub>**, **L4<sub>Calcein</sub>** und **L5<sub>Calcein</sub>** verkapselt. Durch die selbstlöschenden Eigenschaften des Fluorescein-Derivates ist eine sehr gute Differenzierung zwischen zellulär aufgenommenem und noch liposomal verkapseltem Calcein möglich.

Die zellulären Aufnahmen lagen zwischen 11,6 %, für die positiv geladenen Liposomen **L2<sub>Calcein</sub>**, und 0,3 % für die sterisch stabilisierten Vesikel **L5<sub>Calcein</sub>** (Abb.27). Vergleicht man die Ergebnisse der Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>** und **L2<sub>Calcein</sub>**, die sich in ihrer Zusammensetzung nur in der Ladung unterscheiden (**L1** negativ: DCP, **L2** positiv: DDAB), ergibt sich eine sechsfach höhere prozentuale Aufnahme rate für die positiv geladenen Vesikel. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die positiv geladene Formulierung **L2<sub>Calcein</sub>** vermutlich zu starken Interaktionen mit der negativ geladenen Zellmembran der MDCK Zellen führt, was eine verbesserte Aufnahme durch ladungsvermittelte Endozytose bedingen könnte [235]. Eine weitere Erklärung für diese hohen Messwerte könnte eine vermehrte Anlagerung der Vesikel an die negativen Zellmembranen sein, ohne dass es zu einer endozytotischen Aufnahme in die Zellen kommt. Um diesen Sachverhalt aufzuklären, wurden die Zellen genauer untersucht. Mit der konfokalen Laserscanning Mikroskopie konnten die Interaktionen, die sich zwischen den unterschiedlichen Liposomen und den Zellen abspielten, charakterisiert werden (siehe nächstes Kapitel). Die DOPE enthaltenen negativ geladenen Liposomen **L3<sub>Calcein</sub>** wurden



ebenfalls mit 8,7 % gut von den Zellen aufgenommen (Abb.27), während ähnlich zusammengesetzte Liposomen ohne DOPE (**L1**<sub>Calcein</sub>) jedoch nur schwach aufgenommen wurden. Das verdeutlicht, dass das Helferlipid DOPE eine wichtige Rolle in der Membraninteraktion von Zellen und Liposomen spielt. Wie schon durch die EPR Messungen (siehe 4.3.) gezeigt werden konnte, stört DOPE in den tieferen Regionen der Liposomenmembran die Ordnung der Lipide, was zu einer größeren Dynamik dieser Membranschicht führt [236]. Diese erhöhte Beweglichkeit der Liposomenmembran kann eine zelluläre Aufnahme durch Fusion der Lipidschichten oder durch endozytotische Prozesse fördern [220]. Die zelluläre Aufnahme der Formulierung **L4**<sub>Calcein</sub>, die ebenfalls DOPE enthält, verhält sich dagegen konträr zum Aufnahmeverhalten von **L3**<sub>Calcein</sub>. In den Zellen wurde für die Liposomen **L4**<sub>Calcein</sub> eine Calceinaufnahme von 3,7 % gemessen. Damit wurden sie deutlich schlechter aufgenommen als **L3**<sub>Calcein</sub>, hatten aber dennoch eine höhere Aufnahmerate als **L1**<sub>Calcein</sub> mit 1,8 % (Abb.27).



**Abb.27: Zellulär aufgenommene Menge an Calcein in MDCK Zellen in Abhängigkeit von der liposomalen Formulierung.**

Die MDCK Zellen wurden mit 600 µl Calcein beladenen Liposomen (75 nmol TL/ml) bei 37 °C für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden nicht aufgenommene Liposomen abgewaschen, die Zellen lysiert und der Calceingehalt fluorimetrisch ( $F_{ex}$  485 nm und  $F_{em}$  538 nm) gemessen. Die Daten repräsentieren den relativen Anteil von Calcein in % von vier unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen, jedes als Doppelbestimmung, und sind als Mittelwerte  $\pm$  S.D. angegeben.

\* signifikant verschieden zu den Formulierungen **L1**<sub>Calcein</sub>, **L4**<sub>Calcein</sub> und **L5**<sub>Calcein</sub> ( $p < 0,05$ );

\*\* signifikant verschieden zu den Formulierungen **L2**<sub>Calcein</sub>, **L3**<sub>Calcein</sub> und **L5**<sub>Calcein</sub> ( $p < 0,05$ ).

Zu erklären ist dieses Ergebnis durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Formulierung **L3**<sub>Calcein</sub> und **L4**<sub>Calcein</sub>, wobei **L4**<sub>Calcein</sub> einen geringeren DOPE und einen höheren PC Gehalt aufweist (Tab.5). Somit ist die Auswirkung des DOPE an den oberflächennahen Membranbereichen nicht mehr so stark ausgeprägt bzw. kann durch den erhöhten Anteil von PC, durch Stabilisierung der Membran,

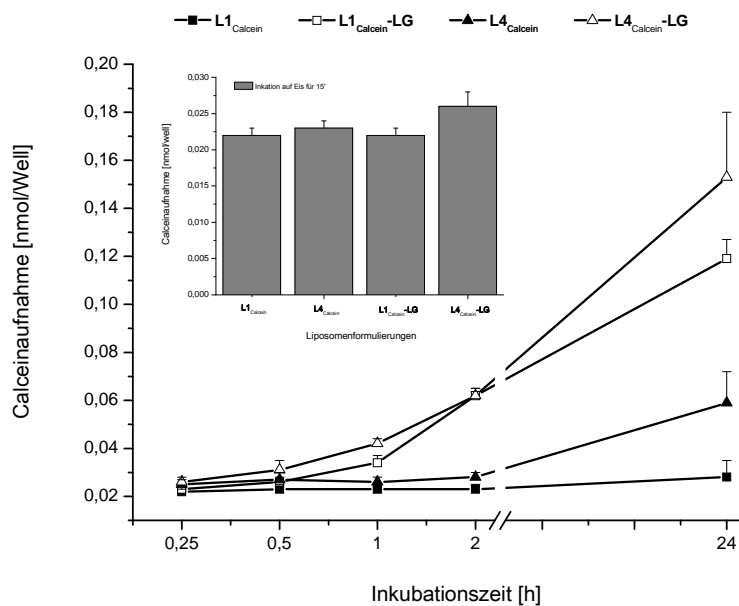
ausgeglichen werden. Dies könnte eine eingeschränkte Interaktion zwischen der Zellmembran und den Vesikeln zur Folge haben, was wiederum zu einer geringeren Aufnahme führen würde. Im Gegensatz dazu konnte jedoch in verschiedenen Versuchen bereits gezeigt werden, dass ein erhöhter Gehalt des Helferlipids OPP wie in der Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>** vorhanden zu einer verbesserten Interaktion der Vesikel mit der Zellmembran führt und eine Fusion fördert [236]. Wäre dies der Fall, müssten die Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** ähnlich gut von den Zellen aufgenommen werden wie **L3<sub>Calcein</sub>**. Da OPP die Fusogenität der Vesikeln erhöht, würden die Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** mit der Zellmembran verschmelzen und ihren Inhalt freigeben. Dadurch würde Calcein frei im Zytosol vorliegen und durch die, in der Zellmembran enthaltenen Effluxpumpen schnell wieder aus der Zelle entfernt werden. Dieser Aufnahme- und gleichzeitig Ausschleusungsmechanismus wäre eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Aufnahmeraten der beiden Formulierungen **L3<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>**.

Am schlechtesten wurde die Formulierung **L5<sub>Calcein</sub>** von den MDCK Zellen aufgenommen, was aller Wahrscheinlichkeit nach durch die sterische Stabilisierung durch PEG<sub>2000</sub>-PE begründet ist. Die Vesikel wurden durch die langen PEG-Ketten, die sich an der Oberfläche der Liposomen befinden, von den Zellen abgeschirmt. Aus diesem Grund kam es zu einer Verringerung der Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und der Lipiddoppelschicht, was wiederum zu sehr niedrigen Messwerten der zellulären Aufnahme dieser Liposomen führte. Das gleiche hier beschriebene System der Abschirmung der Liposomen durch eine sterische Stabilisierung wird auch genutzt, damit die Vesikel weniger schnell von Zellen des Immunsystems (MPS) erkannt werden und länger im Blutkreislauf zirkulieren können.

Um den Einfluss der Ligandenkonjugation zu bestimmen, wurden die negativ geladenen Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>** (rigide) und **L4<sub>Calcein</sub>** (fluide) ausgewählt, mit dem 19-mer-Peptid **1** konjugiert (**L1<sub>Calcein</sub>-LG** und **L4<sub>Calcein</sub>-LG**) und die zelluläre Aufnahme über 24 h bei 37 °C verfolgt. Die Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>** wurde verwendet, um den im oberen Teil beschriebenen Kombinationseffekt der Helferlipide DOPE und OPP in Verbindung mit einem Liganden zu untersuchen. **L1<sub>Calcein</sub>** wurde als neutrale Kontrollformulierung in den nachfolgend beschriebenen Experimenten eingesetzt. In Abbildung 28 ist der zeitliche Verlauf der zellulären Aufnahme in MDCK Zellen für die beschriebenen Vesikel dargestellt. Alle Formulierungen zeigten eine ansteigende Aufnahme über die Zeit. Dieser Prozess war auch so zu erwarten, da mit längerer Inkubationszeit auch mehr von den Zellen aufgenommen werden konnte. Weiterhin zeigt der stetige Anstieg der intrazellulären Calceinkonzentration, dass eine Ausschleusung durch Effluxpumpen zu vernachlässigen war.

Erwartungsgemäß wurden die ligandentragenden Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>-LG** (0,119 nmol/Well $\pm$  0,008) und **L4<sub>Calcein</sub>-LG** (0,153 nmol/Well $\pm$ 0,027) signifikant besser von den Zellen

aufgenommen als die Vesikel  $L1_{\text{Calcein}}$  ( $0,028 \text{ nmol/Well} \pm 0,007$ ) und  $L4_{\text{Calcein}}$  ( $0,059 \text{ nmol/Well} \pm 0,013$ ). Da die MDCK Zellen wie durch die FACS Messungen belegt eine gute Rezeptorausstattung für LRP aufwiesen, kann von einem aktiven, rezeptorvermittelten Transportprozess (z.B. Endozytose) ausgegangen werden. Das eingesetzte Diagramm in Abbildung 28 stellt die unspezifische Bindung der Liposomen  $L1_{\text{Calcein}}$ ,  $L4_{\text{Calcein}}$ ,  $L1_{\text{Calcein-LG}}$  und  $L4_{\text{Calcein-LG}}$  bei  $4^\circ\text{C}$  dar, die zwischen  $0,023$  und  $0,026 \text{ nmol/Well}$  liegen und die von den erhaltenen Aufnahmeergebnissen bei  $37^\circ\text{C}$  abgezogen wurden. Bei diesen unspezifischen Bindungsprozessen verhielten sich alle Formulierungen gleich.



**Abb.28: Zellulär aufgenommene Menge an Calcein in MDCK Zellen über die Zeit.**

Die MDCK Zellen wurden mit  $600 \mu\text{l}$  der Liposomen  $L1_{\text{Calcein}}$ ,  $L1_{\text{Calcein-LG}}$ ,  $L4_{\text{Calcein}}$  und  $L4_{\text{Calcein-LG}}$  mit  $75 \text{ nmol TL/ml}$  bei  $37^\circ\text{C}$  für  $24 \text{ h}$  inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen gewaschen, lysiert und der Calceingehalt fluorimetrisch ( $F_{\text{ex}} 485 \text{ nm}$  und  $F_{\text{em}} 538 \text{ nm}$ ) gemessen. Die Werte wurden um die unspezifischen Bindungen korrigiert. Der Graph zeigt die aufgenommene Menge an Calcein in  $\text{nmol/Well}$ . Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  S.D. aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

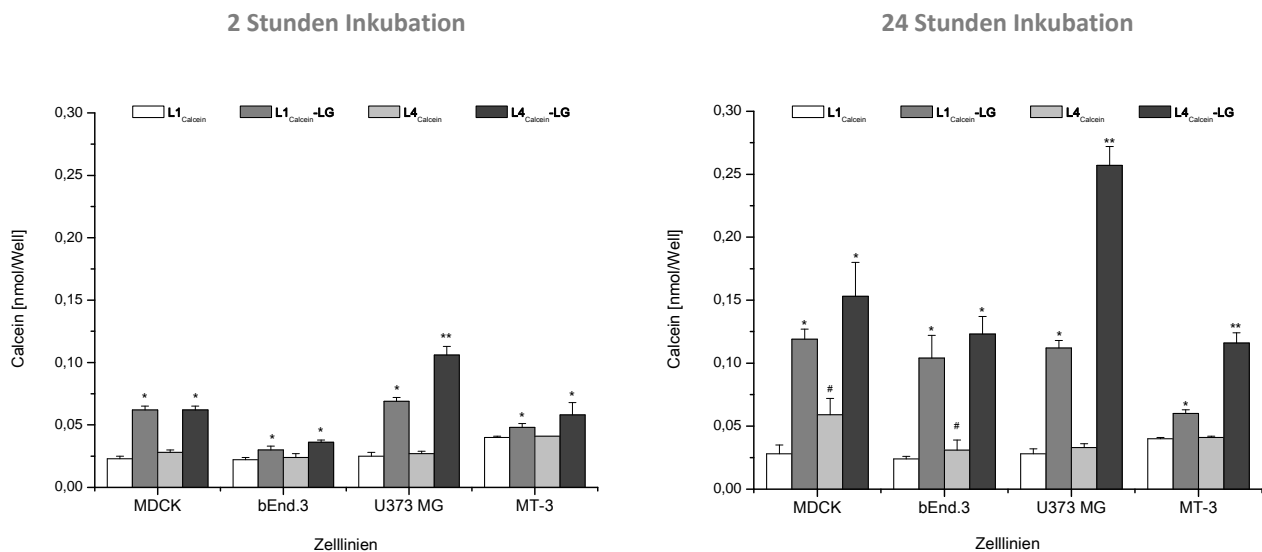
Das eingesetzte Diagramm stellt die Calceinaufnahme ( $\text{nmol/Well}$ ) der MDCK Zellen für die Formulierungen  $L1_{\text{Calcein}}$ ,  $L1_{\text{Calcein-LG}}$ ,  $L4_{\text{Calcein}}$  und  $L4_{\text{Calcein-LG}}$  mit  $75 \text{ nmol TL/ml}$  bei  $4^\circ\text{C}$  dar.

\* signifikant verschieden zu den Formulierungen  $L1_{\text{Calcein}}$  und  $L4_{\text{Calcein}}$  ( $p < 0,05$ ).

Des Weiteren war für die Zielstellung dieser Arbeit interessant, ob bei den Tumorzellen U373 MG und MT-3 eine ähnliche zelluläre Aufnahme von Liposomen zu sehen ist wie bei Endothel- oder Epithelzellen. Hierfür wurden die Formulierungen  $L1_{\text{Calcein}}$ ,  $L4_{\text{Calcein}}$ ,  $L1_{\text{Calcein-LG}}$  und  $L4_{\text{Calcein-LG}}$  über  $24 \text{ h}$  bei  $37^\circ\text{C}$  mit U373 MG und MT-3 Zellen sowie zum Vergleich mit nicht malignen Zellen (MDCK, bEnd.3 Zellen) inkubiert.

In einer Studie von Koklič et al. konnte gezeigt werden, dass OPP in Liposomen zu einer verbesserten Aufnahme in Tumorzellen führte [236], was für eine erneute Testung des zusätzlichen Effektes von

OPP bei der Formulierung  $L4_{\text{Calcein}}$  sprach. Es wurde für alle genannten Zelllinien eine Verlaufskinetik für die zelluläre Aufnahme der vier Formulierungen angefertigt. Wie bei den MDCK Zellen beobachtet, kam es auch hier zu einem Anstieg der Aufnahme über die Zeit, wobei sich die Zelllinien voneinander unterschieden. Nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen mit den nicht modifizierten Liposomen konnten keine Unterschiede in den Aufnahmeraten für die Formulierungen  $L1_{\text{Calcein}}$  und  $L4_{\text{Calcein}}$  gemessen werden. Erst nach einer Inkubation von 24 h zeigten die MDCK und bEnd.3 Zellen eine signifikant bessere Aufnahme der Vesikel  $L4_{\text{Calcein}}$  im Vergleich zu der Kontrollformulierung  $L1_{\text{Calcein}}$ . Hierbei war die Aufnahmerate der MDCK Zellen für die Liposomen  $L4_{\text{Calcein}}$  doppelt so hoch wie für  $L1_{\text{Calcein}}$ . Bei der Inkubation mit den ligandentragenden Formulierungen  $L1_{\text{Calcein-LG}}$  und  $L4_{\text{Calcein-LG}}$  konnte bereits nach zwei Stunden in den Glioblastomzellen eine signifikant höhere Aufnahme von 64 % bzw. 75 % gegenüber den nicht modifizierten Liposomen gemessen werden, was vergleichbar mit den MDCK Zellen war (Abb.29). Die Mammakarzinomzellen MT-3 sowie die Endothelzellen bEnd.3 zeigten für die unterschiedlichen Liposomen (ohne und mit Ligand) ähnlich hohe Aufnahmeraten, wobei die MT-3 Zellen eine etwas höhere Aufnahme als die bEnd.3 Zellen zeigten (Abb.29).



**Abb.29: Zellulär aufgenommene Menge an Calcein in Abhängigkeit von der liposomalen Formulierung und dem eingesetzten Zelltyp.**

Die MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 Zellen wurden mit 600  $\mu\text{l}$  der Liposomen  $L1_{\text{Calcein}}$ ,  $L1_{\text{Calcein-LG}}$ ,  $L4_{\text{Calcein}}$  und  $L4_{\text{Calcein-LG}}$  mit 75 nmol TL/ml bei 37 °C für 24 h inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen gewaschen, lysiert und der Calceingehalt fluorimetrisch ( $F_{\text{ex}}$  485 nm und  $F_{\text{em}}$  538 nm) gemessen. Die Werte wurden um die unspezifischen Bindungen korrigiert. Die Graphen zeigen die aufgenommene Menge an Calcein in nmol/Well nach 2 h (links) und nach 24 h (rechts). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  S.D. aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

\* signifikant verschieden zu den Formulierungen  $L1_{\text{Calcein}}$  und  $L4_{\text{Calcein}}$  ( $p < 0,05$ );

\*\* signifikant verschieden zu den Formulierungen  $L1_{\text{Calcein}}$ ,  $L4_{\text{Calcein}}$  und  $L1_{\text{Calcein-LG}}$  ( $p < 0,001$ );

# signifikant verschieden zur Formulierung  $L1_{\text{Calcein}}$  ( $p < 0,05$ ).

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Vesikel **L1<sub>Calcein</sub>-LG** und **L4<sub>Calcein</sub>-LG** von allen Zelllinien deutlich besser aufgenommen als die nicht modifizierten Liposomen, wobei es keine Korrelation zwischen der LRP Ausstattung der Zelllinie und der gemessenen Aufnahme rate gab. Hierbei war auch ein Unterschied zwischen der Kontrollformulierung und den DOPE/OPP haltigen Liposomen zu beobachten, die von den Tumorzellen signifikant besser aufgenommen wurden. Die MDCK und bEnd.3 Zellen zeigten auch eine höhere Aufnahmetendenz für die Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>-LG**. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Oberflächenmodifizierung als auch die Membranzusammensetzung einen entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Aufnahme ausüben. Während die Bindung des Liganden an den Rezeptor dafür sorgt, dass eine rezeptorvermittelte Endozytose der Vesikel erfolgen kann, könnte die fluide Membran der Liposomen zusätzlich eine Interaktion zwischen den Vesikeln und der Zellmembran fördern. Durch diese Annäherung kann es ebenfalls zu einem erleichterten Transportprozess wie Fusion, absorptive Endozytose oder Flip/Flop-Austausch kommen. Nur ein synergistischer oder additiver Effekt dieser zwei Aufnahmemechanismen würde die hohe Aufnahme der ligandentragenden Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>-LG** plausibel erklären.

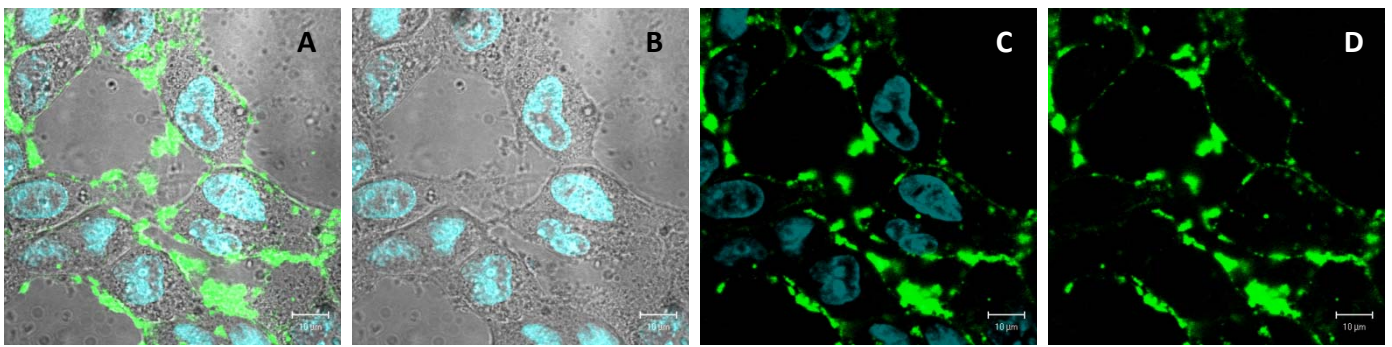
#### **4.8. Charakterisierung der zellulären Aufnahme von Liposomen mittels konfokaler**

##### **Laserscanning Mikroskopie**

Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie (KLSM) konnte die zelluläre Aufnahme der verschiedenen liposomalen Formulierungen optisch dargestellt werden. Damit die KLSM mit dem Fluoreszenzmarker Calcein durchgeführt werden konnte, wurde Calcein in einer verdünnten Konzentration von 0,05 mM verkapselt, um die Fluoreszenzselbstlöschung des Markers zu umgehen. Zur Darstellung der Zellen in einer mittleren Ebene wurde der blau gefärbte Zellkern (DAPI-Färbung) fokussiert. Die so ermittelte innere Ebene wurde für die nachfolgenden Messungen verwendet, um sicher zu gehen, dass die Aufnahmen das Zellinnere abbilden und nicht die Zelloberfläche. Zur besseren Visualisierung der intakten Zellmembran wurde eine Trypanblau-Färbung eingesetzt.

Die Aufnahmen mittels KLSM zeigen, dass die Liposomen in die Zellen aufgenommen wurden. Die Trypanblaufärbung in den Abbildungen 30 I, J und L bestätigt die Vitalität der Zellen. Bei den positiv geladenen Liposomen **L2<sub>Calcein</sub>** ist zu sehen, dass sich die grünen Fluoreszenzsignale vorwiegend an der äußeren und inneren Zellmembran befinden (Abb.30 A, C-D). Hier akkumulieren die Liposomen sehr stark an beiden Seiten der Zellmembran und sind nur teilweise im Zytosol zu finden, was auf eine adsorptive, ladungsvermittelte Endozytose hindeutet. Bei diesem Aufnahmemechanismus werden die Liposomen komplett von der Zellmembran umhüllt und sind in punktförmigen Lichtsignalen im Zytosol zu sehen. Aufgrund der ladungsbedingten Wechselwirkungen ist es somit nicht überraschend, dass sich starke Bindungen zwischen den positiv geladenen Liposomen **L2<sub>Calcein</sub>** und den Zellmembranoberflächen (negatives Potential) ausbilden.

**Liposomen L2<sub>Calcein</sub>**

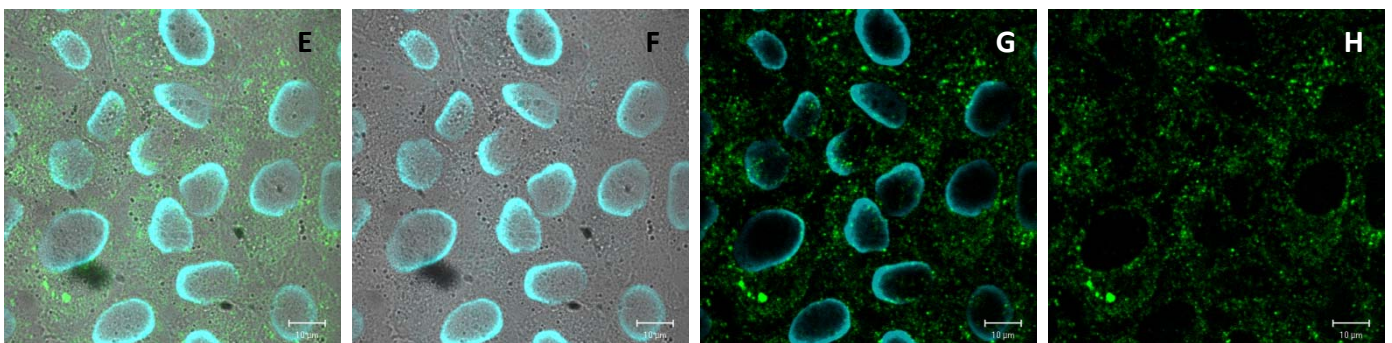


Overlay von B-D

Zellen im Durchlicht

Zellen im Fluoreszenzkanal

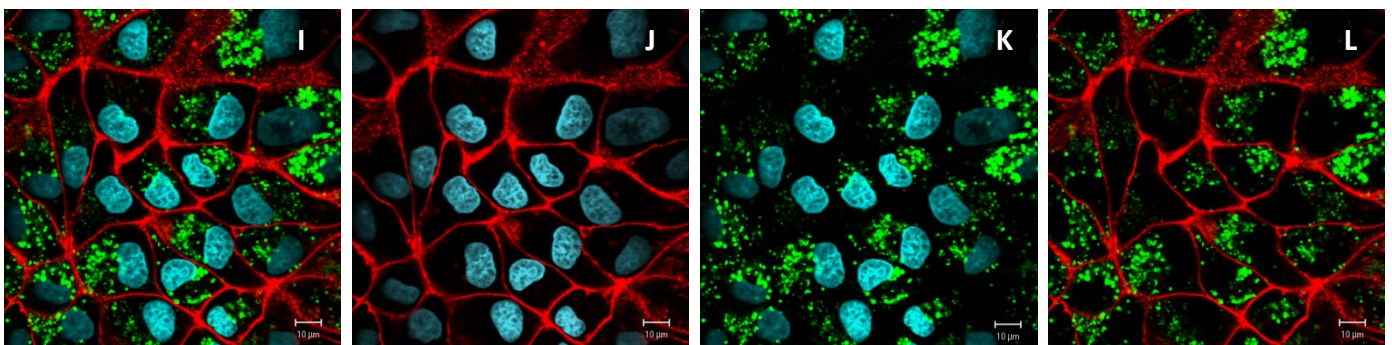
**Liposomen L4<sub>Calcein</sub>**



Overlay von F-H

Zellen im Durchlicht

Zellen im Fluoreszenzkanal



Overlay von J-L

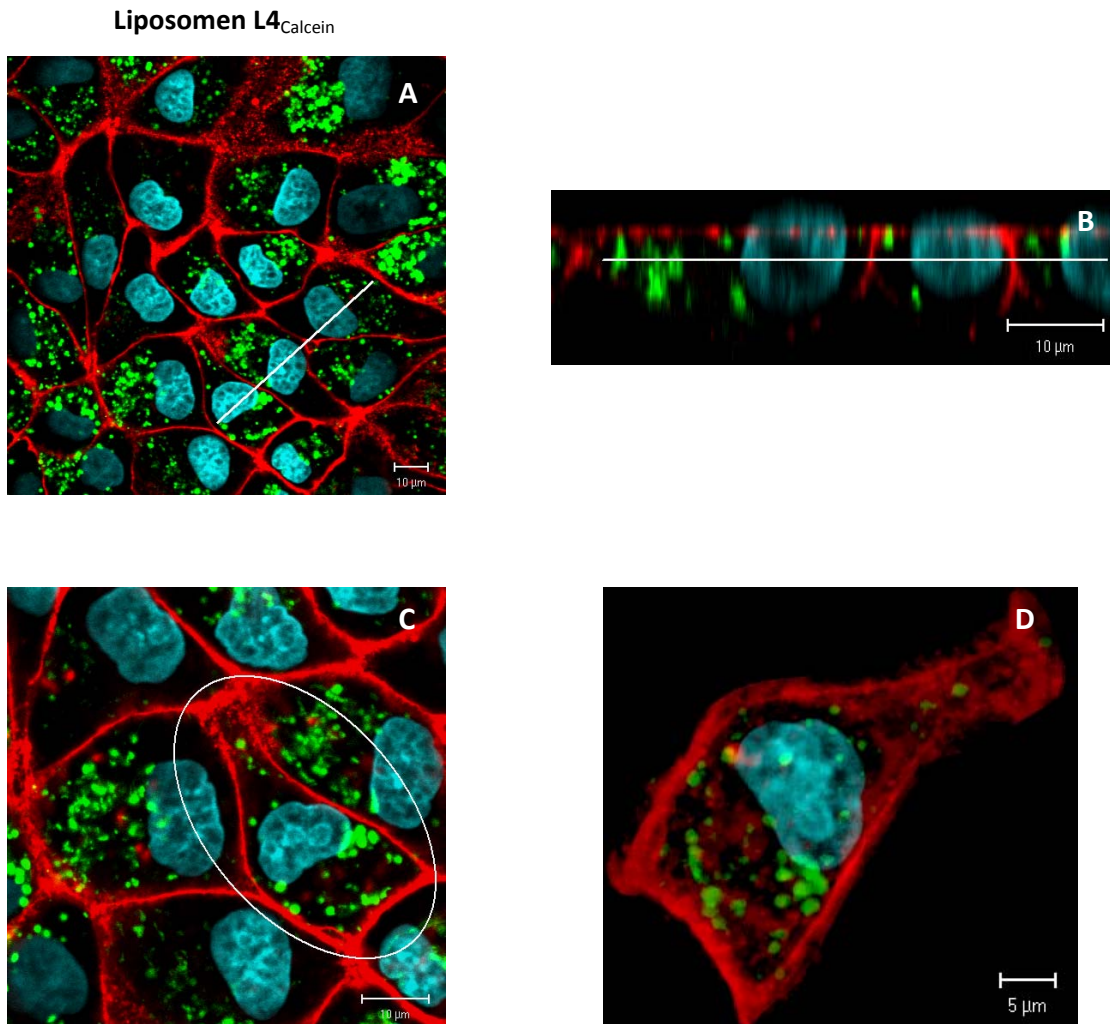
Zellen mit und ohne Trypanblau im Fluoreszenzkanal

**Abb.30: Lokalisation von liposomalem Calcein in MDCK Zellen dargestellt mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie.**

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde durchgeführt, um die mit Calcein beladenen Liposomen in MDCK Zellen bzw. an deren Zellmembran lokalisieren zu können. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C mit den verschiedenen Formulierungen inkubiert und für die Detektion im Mikroskop spezifisch gefärbt. In den Abbildungen sind die Zellen im Durchlicht (A, B, E, F) und in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen (siehe 3.8.) abgebildet (C, D, G, H, I-L). Die Abbildungen A, E und I stellen die Überlagerung der übrigen Fotos dar. Die Zellkerne erscheinen blau (Bisbenzimid 33258), die Membranen fluoreszieren rot (Trypanblau) und der Calcein Marker ist grün dargestellt (Eigenfluoreszenz). A-D zeigt MDCK Zellen, die mit positiv geladenen Liposomen L2<sub>Calcein</sub> inkubiert wurden. In den Abbildung E-H sowie I-L, wurden die Zellen mit der negativen Formulierung L4<sub>Calcein</sub> inkubiert. Zur besseren Visualisierung der Zellen in den Fluoreszenzkanälen sowie zur Kontrolle einer intakten Zellmembran wurden diese mit Trypanblau angefärbt (I, J, L).

Der Größenbalken entspricht 10 µm.





**Abb.31: Lokalisation von liposomalem Calcein im Zytosol von MDCK Zellen dargestellt mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie.**

In der Abbildung **A** wurden die Zellen mit den negativ geladenen Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** inkubiert. Um zu belegen, dass die grünen Lichtsignale aus dem Zellinneren kommen, ist an der mit einem weißen Balken markierten Stelle ein optischer Schnitt entlang der  $y$ -Achse angefertigt worden (**B**). Die Vergrößerung einer Zelle aus Abbildung **A** ist in **C** dargestellt. Von dieser Zelle (weiße Markierung in **C**) wurde eine 3D Ansicht in  $y$ -Richtung berechnet und dargestellt (**D**).

Der Größenbalken entspricht in Abbildung **A-C** 10  $\mu\text{m}$  und in Abbildung **D** 5  $\mu\text{m}$ .

Ein komplett anderes Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale zeigt sich bei der Inkubation der Zellen mit der Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>** (Abb.30 E, G-H und I, K-L). Die Lichtsignale des Markers waren hier gleichmäßig und punktförmig im Zytosol verteilt (Abb.31). Die negativ geladenen Vesikel **L1<sub>Calcein</sub>**, **L3<sub>Calcein</sub>** und **L5<sub>Calcein</sub>** verhielten sich ähnlich wie die Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** und zeigten das gleiche Verteilungsmuster in den Zellen (Abbildungen nicht gezeigt). Wegen der unterschiedlichen zellulären Aufnahme der einzelnen Formulierungen, die sich auch in den zuvor diskutierten Ergebnissen der Aufnahmeversuche (siehe 4.7.) widerspiegeln, kann von unterschiedlichen Aufnahmeprozessen in den Zellen, je nach liposomaler Zusammensetzung, ausgegangen werden. Ein möglicher

Aufnahmemechanismus in die Zellen wäre die Fusion der Liposomen mit der Zellmembran, da die Vesikel aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften zellulären Membranen ähneln und Helferlipide wie OPP die Fusogenität von Liposomen zusätzlich unterstützen können (**L4<sub>Calcein</sub>**). Eine weitere Möglichkeit wäre, wie oben geschildert, die adsorptive, ladungsvermittelte Endozytose (**L2<sub>Calcein</sub>**). Die Aufnahme über eine transporter- oder rezeptorvermittelte Endozytose ist eher unwahrscheinlich, da kein Targeting an den Formulierungen vorliegt, das diese Prozesse aktivieren könnte.

#### **4.9. Charakterisierung der zellulären Aufnahme von Liposomen mittels Fluoreszenz- mikroskopie**

Für weitere strukturelle Untersuchungen zur Anreicherung von liposomalen Calcein im Zytosol der MDCK Zellen sowie an deren Zellmembranen wurden histochemische Versuche durchgeführt. Mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen von Zellorganellen konnte die Lokalisation des Markers spezifisch bestimmt werden. Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen wurden im Durchlicht und in mehreren Fluoreszenzkanälen aufgenommen.

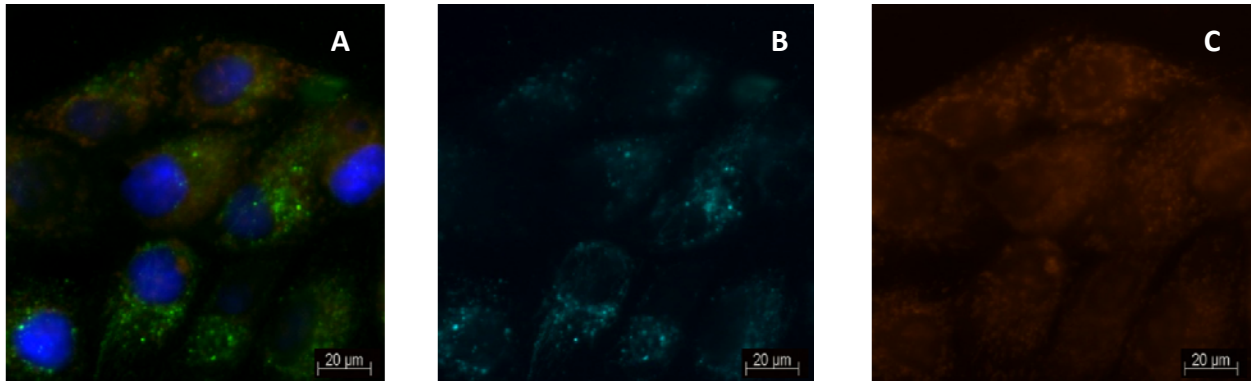
Wie schon bei der KLSM zeigten sich bei den Fluoreszenzmessungen von Zellen, die mit den DOPE enthaltenen, negativ geladenen Liposomen **L3<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>** inkubiert worden waren, gleichmäßig im Zytosol verteilte punktförmige Lichtsignale, die vom Calcein ausgestrahlt wurden (Abb.32). Eine ähnliche Verteilung war auch für die negativ geladenen Liposomen **L1<sub>Calcein</sub>** und **L5<sub>Calcein</sub>** zu finden. Im Gegensatz dazu waren die positiv geladenen Vesikel **L2<sub>Calcein</sub>** wie auch schon bei den Aufnahmen der KLSM gezeigt wurde hauptsächlich an der inneren und äußeren Zellmembran lokalisiert (Abbildungen nicht gezeigt). Diese Beobachtungen deuten wiederum auf einen ladungsbedingten Aufnahmeprozess hin, der durch das unterschiedliche Potential zwischen der Zellmembran und den Vesikeln entsteht.

Die Ladung der Liposomen spielt somit eine große Rolle für den Aufnahmemechanismus in die Zellen. Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale der einzelnen Formulierungen lassen darauf schließen, dass neben der Ladung auch die einzelne Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran einen Einfluss auf die Aufnahme in die Zelle und die Verteilung im Zytosol hat. Somit zeigten die Fluoreszenzsignale, die nach der Behandlung mit den **L3<sub>Calcein</sub>** Vesikeln detektiert wurden, eine stärkere Lokalisation an den Zellmembranen und am Zytoskelett, das durch die linearen Strukturen im Zytosol (grüne Fluoreszenz) dargestellt wurde (Abb.32 A-C). Dagegen wurde die Fluoreszenz nach Inkubation mit den Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** gleichmäßiger verteilt im Zytosol gefunden. Die fluoreszierenden Stellen erwiesen sich als vielfach identisch mit den Mitochondrien (Abb.32 D). Somit kann auf eine wahrscheinliche Anreicherung von Calcein in den Mitochondrien der Zellen geschlossen werden. Es ist bekannt, dass sich intrazelluläres Calcein sehr schnell in Mitochondrien



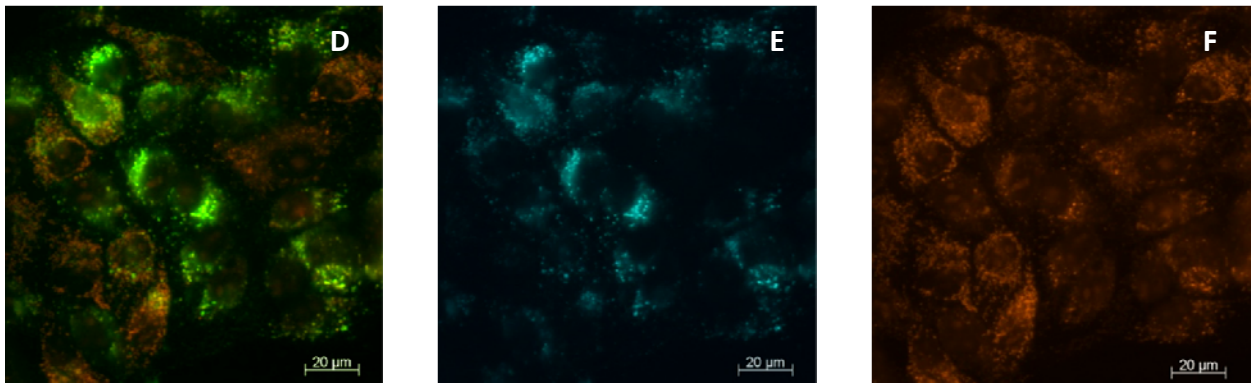
einlagert [237]. Die eher gleichmäßige Verteilung des Markers im Zytosol legt nahe, dass er aus den Liposomen  $L4_{\text{Calcein}}$  freigesetzt wurde, was entweder während einer Fusion mit der Zellmembran oder aber nach endosomalem Abbau der Vesikel erfolgte. Die Calceinlösung breitete sich jedoch nicht als gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm im Inneren der Zelle aus, sondern akkumulierte in den Mitochondrien [238].

#### Liposomen $L3_{\text{Calcein}}$



Overlay von B und C

#### Liposomen $L4_{\text{Calcein}}$



Overlay von E und F

#### Abb.32: Lokalisation von liposomalem Calcein in MDCK Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisation der Calcein enthaltenden Liposomen  $L3_{\text{Calcein}}$  und  $L4_{\text{Calcein}}$  in MDCK Zellen darzustellen. Die Zellen wurden für 2 h bei 37 °C mit den Liposomen inkubiert und zur Detektion im Mikroskop spezifisch gefärbt. In den Abbildungen sind die Zellen in verschiedenen Fluoreszenzkanälen abgebildet. Die Zellkerne erscheinen blau (Bisbenzimid 33258), die Mitochondrien orange-braun (MitoTracker® Orange; C und F), das Zytoskelett grün ( $\beta$ -Actin; A und B) und der Calcein-Marker ebenfalls grün (Eigenfluoreszenz; B und E). A-C zeigt MDCK Zellen, die mit den negativ geladenen Liposomen  $L3_{\text{Calcein}}$  inkubiert wurden. In den Abbildungen D-F wurden die Zellen mit den negativ geladenen Liposomen  $L4_{\text{Calcein}}$  inkubiert.

Der Größenbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.10. *in vitro* Untersuchungen zum Durchtritt von Liposomen durch Zellbarrieren**

Zur Testung der transzellulären Transporteffizienz (Schrankengängigkeit) für Substanzen/Pharmaka stehen verschiedene Zellmodelle zur Verfügung. Das einfachste *in vitro* Schrankenmodell ist das Monokultur-Modell, in dem nur ein endothelialer oder epithelialer Zelltyp als Monokultur auf einem Transwell-Filtereinsatz kultiviert wird. Hierfür werden vorwiegend kontinuierlich wachsende, immortalisierte Zelllinien wie z.B. MDCK- oder CaCo-Zellen verwendet. Dieses Modell kann für einfache pharmakologische Versuche eingesetzt werden. Es ist ein häufig verwendetes und bereits gut in der Forschung etabliertes Schrankenmodell [205; 239-240], das dazu noch zeit- und kostengünstig ist und sich sehr gut reproduzieren lässt. Die Verwendung von primären Zellen ist aufgrund des großen arbeitstechnischen Aufwandes eher selten.

Ein komplexeres Schrankenmodell, das Kokultur-Modell, besteht aus mehreren Zelltypen. Hierbei wird ein endothelialer Zelltyp, vorwiegend aus Primärkulturen gewonnen, mit einem oder mehreren für eine Kokultur geeigneten Zelltypen kultiviert, z.B. Astrozyten, Perizyten oder neuronale Zellen bei einem BHS-Modell. Durch den Austausch von Wachstumsfaktoren, Chemotaxen, etc. durch die Poren eines Transwell-Filters kommt es zur Ausbildung einer dichten Zellschranke. Mit diesem physiologisch ähnlichen Zellsystem können Aussagen über das pharmakodynamische und -kinetische Verhalten von Substanzen gemacht werden. Es ist jedoch aufgrund der Primärzellkultur sowie der schwierigen Kokulturbedingungen mit einem erheblichen Zeit- und Materialaufwand verbunden und schwerer zu reproduzieren.

In einem dreidimensionalen physiologischen Schrankenmodell wie in gefäßähnlichen Strukturen oder Hautmodellen, können komplexe biologische Zusammenhänge realitätsnah untersucht werden. Diese Modelle bestehen aus mehreren Zellschichten die aus Primärkulturen gewonnen werden und die in einer Kokultur gehalten werden müssen. Diese 3D-Modelle sind von allen beschriebenen Schrankenmodellen am aufwendigsten zu etablieren und somit nicht für Penetrations- oder Permeationsstudien geeignet.

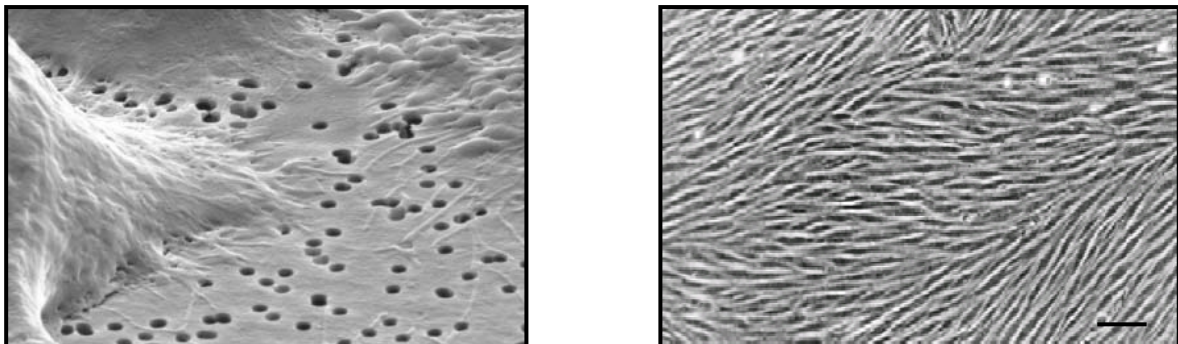
Um den Durchtritt von liposomalen Trägersystemen durch eine zelluläre Barriere untersuchen zu können, musste ein geeignetes *in vitro* Modell etabliert werden. Hierzu wurden endotheliale bEnd.3 bzw. epitheliale MDCK Zellen auf einen mit Kollagen beschichteten Zellkultureinsatz (Transwell) ausplattiert und in einer 24 Well Mikrotiterplatte kultiviert. Durch die poröse Membran des Transwells hatten die Zellen Kontakt zur apikalen (oberes Kompartiment) und basalen (unteres Kompartiment) Seite des Kultursystems (Abb12). Um die Funktionsfähigkeit dieses Barrieremodells zu testen, wurden vor Beginn der Transzytose-Versuche Kontrollexperimente durchgeführt.

#### 4.10.1. Etablierung und Standardisierung der Funktionsfähigkeitsprüfung eines *in vitro*

##### Schrankenmodells

Zur Prüfung der Vitalität sowie der Funktionsfähigkeit des *in vitro* Schrankenmodells wurden eine optische Prüfung, eine Widerstandsmessung, eine Mannitolbehandlung und eine Durchlässigkeitsprüfung der Zellbarriere durchgeführt. Um ein intaktes Schrankenmodell zu erhalten, müssen die verwendeten vitalen Zellen einen dichten Monolayer (100 % Konfluenz) auf der gesamten Fläche des Transwells ausbilden, was schon durch eine lichtmikroskopische Untersuchung sehr gut zu beurteilen war.

Abbildung 33 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von einer vereinzelt MDCK Zelle und eine lichtmikroskopische Aufnahmen von einem konfluenten Monolayer auf einem Filtereinsatz. In der linken Abbildung ist zu sehen, dass die Zelle Ausläufer gebildet hat, die durch die Poren des Filters gelangen und somit einen Kontakt zum basalen Kompartiment des Kultursystems herstellen konnten. Rechts ist ein 100 % konfluenter Zell Monolayer zu sehen, der eine zelluläre Barriere ausbildete, da die Zell-Zell Kontakte sehr dicht zusammenliegen.



**Abb.33: Mikroskopische Aufnahmen von MDCK Zellen auf einem Filtereinsatz eines Transwell- Filtersystems.**

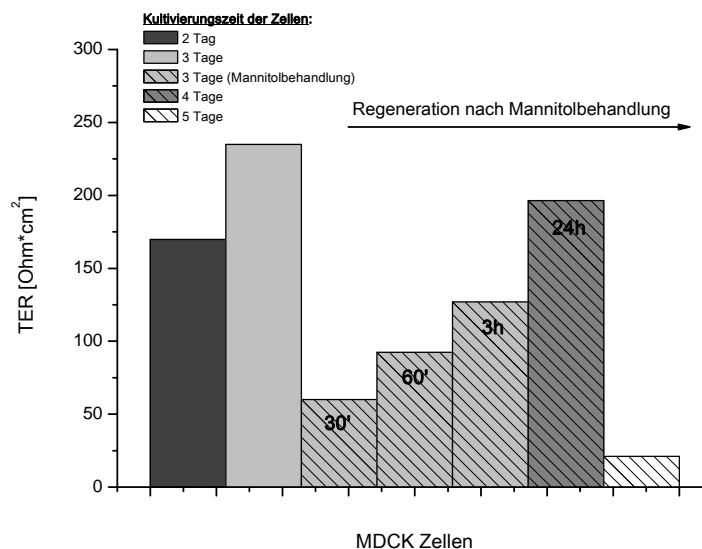
$1 \cdot 10^5$  MDCK Zellen wurden auf ein Filtersystem ausplattiert und bei 37 °C kultiviert. Die linke elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt eine vereinzelt MDCK Zelle auf einem Filtereinsatz einige Stunden nach der Einsaat (© nanoAnalytics GmbH). Im rechten Bild ist ein 100 % konfluenter MDCK Zellen Monolayer abgebildet (d 3-5).

Der Größenbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Konnte mikroskopisch ein dichter Monolayer der MDCK bzw. bEnd.3 Zellen festgestellt werden, wurde der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) zwischen dem apikalen und basalen Kompartiment im Zellkultursystem mit einem Volt-Ohm-Meter gemessen. Die Bestimmung des vertikalen Ionenstroms zwischen diesen flüssigkeitsgefüllten Bereichen gibt Auskunft über die Dichtigkeit der Zellbarriere. Alle angegebenen TER-Werte sind auf 1  $\text{cm}^2$  normalisiert worden [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ], nachdem der Grundwiderstand der leeren, beschichteten Filtermembran ( $\sim 170 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) abgezogen

wurde. Ein Zell-Monolayer wurde nur dann für ein Experiment verwendet, wenn der gemessene Widerstand mindestens  $220 \Omega \cdot \text{cm}^2$  aufwies. Gemäß Arbeiten anderer Gruppen [241], kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem TER Wert eine dichte Zellbarriere vorliegt. Bei den TER-Messungen konfluenter bEnd.3 Zellen wurde festgestellt, dass sich keine dichte Barriere zwischen den Zellen ausbildete, da der Widerstand eines dichten Monolayers kaum höher war als der Widerstand des leeren Filtereinsatzes. Aus diesem Grund wurde auf die Verwendung von bEnd.3 Zellen für Transzytose-Experimente komplett verzichtet. Die MDCK Zellen dagegen bildeten nach 3-5 Tagen eine dichte Zellbarriere mit einem maximalen Widerstand von  $225\text{-}245 \Omega \cdot \text{cm}^2$  aus, was in guter Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur war [205; 239-240].

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde die Funktionalität eines intakten MDCK Barrieremodells mit dichten Zell-Zell-Kontakten über die Messung des transepithelialen Widerstandes nach osmotischer Öffnung der Zellbarriere kontrolliert. Hierfür wurde ein dichter Zellmonolayer mit Mannitol-Lösung inkubiert. Der TER Wert der Zellen wurde direkt nach der Mannitolbehandlung sowie nach einer Regenerationszeit gemessen (Abb.34).



**Abb.34: Änderung des transzellulären Widerstandes von MDCK Zellen über die Zeit vor und nach einer Behandlung mit Mannitol.**

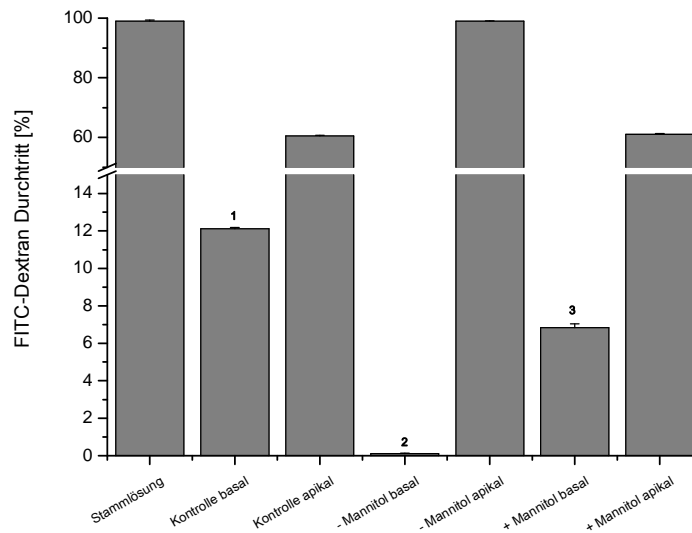
$1 \cdot 10^5$  MDCK Zellen wurden auf ein Filtersystem ausplattiert. Nach drei Tagen Kultivierung bei  $37^\circ \text{C}$  wurde der maximale TER Wert erreicht und die Zellen mit  $1 \text{ M}$  Mannitol für  $15'$  inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Medium bedeckt. Der Graph zeigt die TER Werte in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , die an den verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurden. Die schraffierten Balken geben die TER-Werte an, die  $30'$ ,  $60'$ ,  $3 \text{ h}$ ,  $24 \text{ h}$  und  $48 \text{ h}$  nach der Behandlung mit Mannitol gemessen wurden.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Zellbarriere mit Mannitol durch einen osmotischen Effekt wie er auch in der Klinik zur Öffnung der BHS benutzt wird [49] öffnen ließ, was an der deutlichen Reduktion

des TER Wertes nach 30 min. zu sehen war (Abb.34). Nach einer Regenerationszeit von 60 min. konnte bereits wieder ein Anstieg des TER Wertes beobachtet werden, was darauf zurückzuführen war, dass der osmotische Effekt des Mannitols nachließ und sich die Zellbarriere wieder schloss. Nach 24 h war der Zell-Zell-Kontakt wieder komplett hergestellt. Aufgrund des Stresses, dem die Zellen ausgesetzt waren und des Alterungsprozesses konnte der Ausgangswert von  $230 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , der am Tag 3 vor der Mannitolbehandlung gemessen wurde, nicht mehr ganz erreicht werden. Die Zellen wurden durch die Mannitolbehandlung schwer beschädigt, so dass die Barrierefunktion am Tag 5 zusammenbrach und die Zellen abstarben. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass die Öffnung der BHS *in vivo* mit Mannitol hohe Risiken birgt, da es zu irreversiblen Schäden der Zellen kommen kann, die die Funktion der Zellbarriere beeinträchtigt oder es sogar zu einem kompletten Ausfall der Schrankenfunktion kommen kann [13; 52].

Weiterhin kann die Dichtheit eines zellulären Schrankenmodells durch die Messung des transzellulären Transportes einer FITC-Dextran Lösung überprüft werden, da Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 500 Da wie es dieses Molekül mit 10 kDa hat nicht über eine intakte und dichte Zellbarriere (z.B. die BHS) transportiert werden [13; 52]. Für diesen Versuch wurden konfluente MDCK Zellen ( $\text{TER} > 220 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) sowie ein Kontrollfilter ohne Zellen mit FITC-Dextran Lösung inkubiert. Da nur 0,1 % FITC-Dextran aus dem apikalen in das basale Kompartiment gelangten, wurde davon ausgegangen, dass die Barriere aus MDCK Zellen dicht war und somit ein unspezifischer Stofftransport (parazellulärer Transport) verhindert wurde. Der Kontrollfilter ohne Zellen ermöglichte dagegen einen Durchtritt von 12 %. Durch ein Öffnen der dichten Zellbarriere mit Mannitol wie oben beschrieben wurde im basalen Kompartiment eine 43-fach höhere Konzentration an FITC-Dextran (6,5 %) im Vergleich zur intakten Barriere aus MDCK Zellen gefunden (Abb.35).

Nachdem die Bedingungen zur Überprüfung der Dichte eines MDCK Zell-Monolayers etabliert wurden, konnten sie für die Kultivierung eines *in vitro* Barrieremodells genau definiert und für die Transzytose-Experimente angewendet werden.



**Abb.35: Zellulärer Transport von FITC-Dextran mit und ohne Öffnung der Zellbarriere durch Mannitol.**

Ein dichter MDCK Monolayer wurde ohne und mit Mannitolvorbehandlung mit 20 µg/ml FITC-Dextran (10 kDa) für 3 h bei 37 °C inkubiert und der Anteil an Dextran, der die Zellbarriere passiert hatte, photometrisch ( $F_{ex}$  490 nm und  $F_{em}$  520 nm) bestimmt. Zusätzlich wurde ein Transwell-Filter ohne Zellen (Kontrolle) unter gleichen experimentellen Bedingungen behandelt und gemessen. Der Graph zeigt die Menge an FITC-Dextran in µg/ml, die jeweils im apikalen und basalen Kompartiment gemessen wurde. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  S.D. aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen.

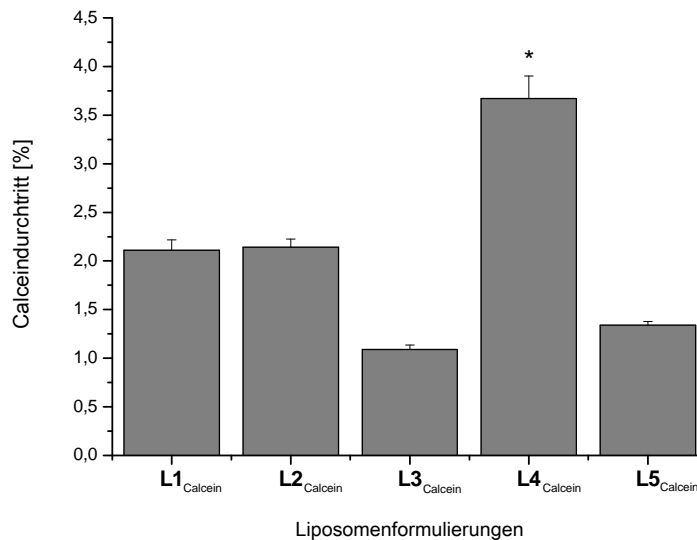
<sup>1</sup> 12 % Durchtritt; <sup>2</sup> 0,1 % Durchtritt; <sup>3</sup> 6,5 % Durchtritt.

#### 4.10.2. *in vitro* Quantifizierung der Permeationsrate

Zur Durchführung der Transzytose-Experimente wurde die kontinuierlich wachsende epitheliale Zelllinie MDCK als Monokultur-Modell verwendet (siehe Modellbeschreibungen 4.10.). MDCK-Zellbarrieren sind als funktionales Schrankenmodell in der Forschung weit verbreitet und gut etabliert [205; 239-240]. Diese Zellen sind in der Lage, innerhalb weniger Tage einen sehr dichten Monolayer auszubilden, ohne dass eine Kokultivierung mit konditioniertem Medium oder anderen Zelltypen notwendig ist. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben (4.10.1.) kultiviert und es wurde mit verschiedenen Methoden (optische Prüfung, Messung des transzellulären Widerstandes) die Funktionsfähigkeit der Zellbarriere untersucht. Waren die optischen und elektrochemischen Parameter des Zellmonolayers erfüllt, wurden die Zellen mit den Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>** - **L5<sub>Calcein</sub>** sowie mit den oberflächenmodifizierten Vesikeln **L1<sub>Calcein</sub>-LG** und **L4<sub>Calcein</sub>-LG** behandelt (Abb.12).

Überraschenderweise korrelierten die ermittelten Daten für die Transzytose-Experimente von **L1<sub>Calcein</sub>** - **L5<sub>Calcein</sub>** nicht mit den Ergebnissen der zellulären Aufnahme. Die Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** zeigten für Calcein im Basalmedium die höchste Transzytoserate (Abb.36). Das Ergebnis dieses Permeations-Versuches entspricht 3,7 % Durchtritt an Calcein, bezogen auf die Menge an liposomalem Calcein, die auf die Zellen gegeben wurde. Im Gegensatz dazu war die zelluläre Aufnahme von den **L4<sub>Calcein</sub>**

Liposomen durch die MDCK Zellen deutlich geringer als z.B. für die DOPE enthaltenen Vesikel **L3<sub>Calcein</sub>** oder für die positiv geladenen Liposomen **L2<sub>Calcein</sub>** (siehe Abb.27). Mit der Formulierung **L2<sub>Calcein</sub>** wurden zwar die besten Aufnahmeergebnisse erzielt, in der Transzytose waren sie jedoch schwächer und es konnte nur eine Rate von 2,1 % gemessen werden. Die negativ geladenen Liposomen **L1<sub>Calcein</sub>** erzielten ebenfalls eine Transzytoserate von 2,1 %. Noch geringer waren die Messwerte für **L3<sub>Calcein</sub>** mit 1,1 % und die sterisch stabilisierten Liposomen **L5<sub>Calcein</sub>** mit 1,3 % (Abb.36).



**Abb.36: Transzytose von liposomalem Calcein durch einen dichten MDCK Monolayer.**

Ein dichter MDCK Monolayer wurde mit den liposomalen Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>** - **L5<sub>Calcein</sub>** für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden Proben aus dem basalen Medium entnommen und der darin enthaltene Anteil an Calcein photometrisch ( $F_{\text{ex}} 485 \text{ nm}$  und  $F_{\text{em}} 538 \text{ nm}$ ) bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden zu der Menge an Calcein in Relation gesetzt, die auf den Zellmonolayer gegeben wurden. Der Graph zeigt die relative Menge an Calcein in %, die die Zellbarriere überwinden konnte. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  S.D. aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen, die in einer Dreifachbestimmung gemessen wurden.

\* signifikant unterschiedlich zu allen anderen Formulierungen ( $p < 0,001$ ).

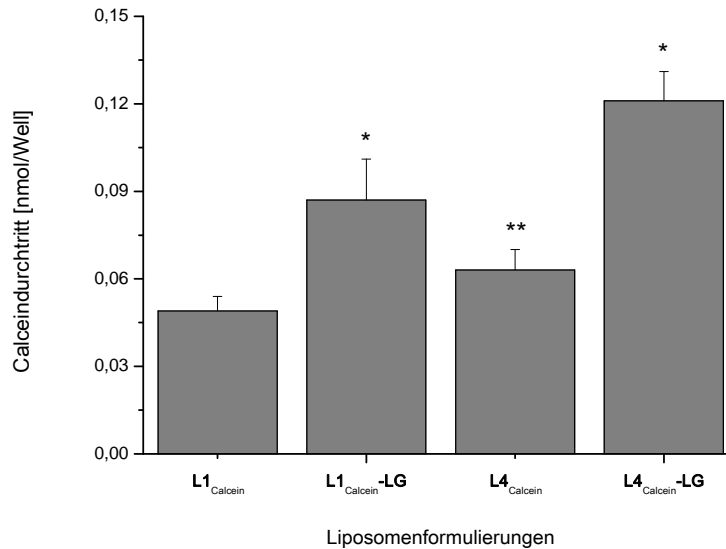
Das zeigt, dass eine hohe zelluläre Aufnahme in MDCK Zellen nicht zwingend mit einer hohen Transzytose korrelieren muss, da die zelluläre Aufnahme für die Formulierungen **L2<sub>Calcein</sub>** und **L3<sub>Calcein</sub>** am höchsten und zudem signifikant unterschiedlich zu den Liposomen **L1<sub>Calcein</sub>**, **L4<sub>Calcein</sub>** und **L5<sub>Calcein</sub>** war. Die signifikant höchste Transzytoserate wurde dagegen mit der Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>** erreicht. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass den Vorgängen der zellulären Aufnahme und der Transzytose unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen, die wiederum sehr stark von den Membraneigenschaften der liposomalen Formulierungen abhängen. Am Beispiel der Liposomen **L3<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>** konnte gezeigt werden, dass der Einbau des Helferlipides DOPE zu einer verbesserten zellulären Aufnahme von Vesikeln führt (**L3<sub>Calcein</sub>**). Das lässt sich über eine Steigerung der Fluidität in den oberflächennahen Membranbereichen erklären, die nicht durch andere Lipide

eingeschränkt wird wie es durch den erhöhten Anteil von PC und der damit einhergehenden Stabilisierung der Membran bei der Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>** eintritt.

Eine andere Erklärung für diese Beobachtungen wäre, dass beide DOPE enthaltene Formulierungen gut von den Zellen aufgenommen werden. Die Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>** ist jedoch, zusammensetzungsbedingt im Vergleich zu **L3<sub>Calcein</sub>** instabiler (siehe Stabilitätsexperimente). Das lässt vermuten, dass das aufgenommene Calcein bereits in der Zelle freigesetzt wurde und dann sofort durch einen aktiven Rücktransport zu beiden Seiten der Zelle (apikal und basal) schnell wieder ausgeschleust wurde [234], wodurch sich die niedrigen Werte für die zelluläre Aufnahme und die höheren Transzytosewerte für **L4<sub>Calcein</sub>** erklären lassen. Doch nicht nur die Fluidität der Membran spielt eine Rolle bei der zellulären Aufnahme und dem Transport von Vesikeln, sondern auch die Ladung der Liposomen, was eindeutig durch die Formulierung **L2<sub>Calcein</sub>** belegt werden konnte. Diese Formulierung zeigte eine sehr starke Akkumulation an der Zellmembran mit vermutlich anschließender Endozytose oder Makropinozytose, wie bei Huth beschrieben [235] und führte daher zu hohen Werten für die zelluläre Aufnahme (siehe Abb.28). Da sich jedoch die Vesikel aufgrund ihrer Ladung höchstwahrscheinlich nur teilweise wieder von der Membran der Zellen lösen (siehe Abb.31), gelangt entsprechend weniger Calcein in das basale Kompartiment. Die negativ geladenen Kontrollliposomen **L1<sub>Calcein</sub>**, ohne eine Modifizierung in der Lipidzusammensetzung, bewirken keinen besonders starken Durchtritt für Calcein. Auch eine sterische Stabilisierung mit PEG<sub>2000</sub>-PE wie sie bei den Vesikeln **L5<sub>Calcein</sub>** angewendet wurde war nachteilig für die Transzytoserate, denn sie führte zu einem sehr geringen Transport des Calceins ins basale Kompartiment. Dieser Effekt lässt sich durch die Abschirmung der Lipidmembran durch die PEG<sub>2000</sub>-PE-Ketten erklären, wodurch es wahrscheinlich zu einer geringeren Interaktion zwischen den Liposomen und der Zellmembran kommt. Aufgrund der vorhandenen Resultate der Aufnahme- und Transzytose-Experimente und der daraus resultierenden Erkenntnisse über das Verhalten der verschiedenen zusammengesetzten Liposomen ist davon auszugehen, dass die Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>**-**L5<sub>Calcein</sub>** vorwiegend durch passive Transportprozesse in bzw. durch die MDCK Zellen gelangten.

Um den Transport durch eine zelluläre Barriere zu verstärken, wurden neben den Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>** die oberflächenmodifizierten Liposomen **L1<sub>Calcein</sub>-LG** und **L4<sub>Calcein</sub>-LG** getestet, die über aktive Transportprozesse zu einer verstärkten Transzytoserate führen sollten. Es wurden diese beiden liposomalen Formulierungen ausgewählt, da die Vesikel **L4<sub>Calcein</sub>** die beste Transzytoserate für Calcein zeigten und **L1<sub>Calcein</sub>** wiederum als Kontrollformulierung eingesetzt wurde. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse dieser Transzytose-Experimente dargestellt.





**Abb.37: Transzytose von liposomalem Calcein durch einen dichten MDCK Monolayer in Abhängigkeit von der liposomalen Formulierung.**

Ein dichter MDCK Monolayer wurde mit den Liposomen **L1<sub>Calcein</sub>**, **L1<sub>Calcein</sub>-LG**, **L4<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>-LG** mit 75 nmol TL/ml bei 37 °C für 24 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden Proben aus dem basalen Medium entnommen und photometrisch ( $F_{\text{ex}}$  485 nm und  $F_{\text{em}}$  538 nm) gemessen. Die Graphik zeigt die Menge an Calcein in nmol/Well, die die Zellbarriere überwinden konnte. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  S.D. aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen, die in Doppelbestimmungen gemessen wurden.

\* signifikant verschieden zu den Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>** und **L4<sub>Calcein</sub>** ( $p < 0,001$ );

\*\* signifikant verschieden zur Formulierung **L1<sub>Calcein</sub>** ( $p < 0,05$ ).

Bei beiden Formulierungen **L1<sub>Calcein</sub>-LG** und **L4<sub>Calcein</sub>-LG** war aufgrund der Oberflächenmodifizierung ein signifikant höherer Durchtritt des Calceins von mehr als 50 % durch die Zellbarriere zu sehen. Des Weiteren kam es durch die nachgewiesene hohe Rezeptorausstattung der MDCK Zellen mit dem LRP zu einer verstärkten Interaktion der ligandenträgenden Liposomen mit der Zellmembran, was zu einer aktiven Aufnahme führen könnte. Aus diesem Grund konnte nicht nur die zelluläre Aufnahme deutlich erhöht werden, sondern auch die Transzytoseeffizienz. Dabei waren die Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>-LG** mit 0,121 nmol/Well deutlich besser als **L1<sub>Calcein</sub>-LG** mit 0,087 nmol/Well (Abb.37). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass bei der Formulierung **L4<sub>Calcein</sub>-LG** sowohl die Fluidität der Liposomenmembran (Kombination der Helferlipide DOPE und OPP) als auch das Targeting einen Effekt auf die verstärkte Aufnahme und Transzytose hatten, während bei den Liposomen **L1<sub>Calcein</sub>-LG** nur der aktive LRP vermittelte Transport zu höheren Aufnahme- und Transzytoseraten führte.

#### 4.11. *in vitro* Prüfung auf Toxizität von verschiedenen Liposomen

In einem Zell-Vitalitäts-Assay (MTT-Assay) wurde die Proliferationshemmung ausgewählter liposomaler Formulierungen (**L1<sub>MTO</sub>**, **L4<sub>MTO</sub>**, **L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG**), die in den *in vivo* Experimenten eingesetzt werden sollten, auf die Zellen MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 bestimmt. Von einer gemessenen Wachstumshemmung der Zellen sollten Rückschlüsse auf das Ansprechen von Tumorzellen auf das liposomal verkapselte Zytostatikum MTO bzw. die zu erwartenden Nebenwirkungen für gesundes Gewebe gezogen werden. Des Weiteren konnte die Toxizität von Membranlipiden (z.B. OPP) bestimmt werden.

Die Sensitivität der Zellen gegenüber liposomal verkapseltem MTO war für die MT-3 Zellen mit einem IC<sub>50</sub>-Wert zwischen 0,004 – 0,010 µg/ml am größten und nahm in der Reihenfolge U373 MG (0,029 – 0,065 µg/ml) > b.End.3 (0,036 – 0,071 µg/ml) > MDCK Zellen (0,035 – 0,077 µg/ml) ab (Tab.14).

Bezeichnung	MTO	L1 <sub>MTO</sub>	L1 <sub>MTO</sub> -LG	L4 <sub>MTO</sub>	L4 <sub>MTO</sub> -LG	L4 <sub>PBS</sub>
MDCK	0,089 ± 0,048	0,061 ± 0,017	0,077 ± 0,034	0,035 ± 0,017	0,065 ± 0,038	3,502 ± 0,928
bEnd.3	0,053 ± 0,025	0,058 ± 0,012	0,071 ± 0,041	0,036 ± 0,002	0,044 ± 0,006	> 10,0
U373 MG	0,040 ± 0,011	0,047 ± 0,009	0,065 ± 0,014	0,029 ± 0,004	0,035 ± 0,011	> 10,0
MT-3	0,005 ± 0,004	0,010 ± 0,004	0,010 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,005 ± 0,002	2,961 ± 1,335

**Tab.14: Wachstumshemmung (IC<sub>50</sub>) verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff.**

Die MTO Konzentration [µg/ml] ± S.D. die zu einer 50 %igen Wachstumshemmung (IC<sub>50</sub>) von MDCK, bEnd.3, U373 MG und MT-3 Zellen mit MTO haltigen Liposomen und freiem Wirkstoff führte, wurde nach einer 4-tägiger Inkubation bestimmt.

Bezogen auf die Tumorzellen war die MTO enthaltene Formulierungen **L4<sub>MTO</sub>** in ihrer Wirksamkeit bzw. Toxizität mit dem freien MTO vergleichbar, unabhängig vom Vorhandensein eines Liganden. Dagegen zeichnet sich tendenziell eine geringere Toxizität der Liposomen **L1<sub>MTO</sub>** und **L1<sub>MTO</sub>-LG** gegenüber den MT-3 sowie U373 MG Zellen ab. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass MTO zu einem größeren Teil aus den Liposomen **L4<sub>MTO</sub>** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** als aus **L1<sub>MTO</sub>** und **L1<sub>MTO</sub>-LG** freigesetzt wurde. Bezogen auf die gemessene Freisetzung in Serum, die mit den Calcein beladene Liposomen bestimmt wurde, korrelieren die ermittelten Daten sehr gut miteinander, da auch die fluiden Liposomen **L4<sub>Calcein</sub>** schneller freisetzten als die rigidere und damit stabilere Formulierung **L1<sub>Calcein</sub>**.

Gegenüber den Endothelzellen bEnd.3 und den Nierenepithelzellen MDCK waren die Liposomen **L4<sub>MTO</sub>** im Vergleich zum freien Wirkstoff deutlich toxischer. Die übrigen Liposomen waren mit dem freien MTO in ihrer Toxizität vergleichbar. Diesen Daten ist zu entnehmen, dass die Formulierung **L4<sub>MTO</sub>** bei einer *in vivo* Anwendung zu höheren Nebenwirkungen (Nephrotoxizität) führen könnte als die Liposomen **L4<sub>MTO</sub>-LG**, **L1<sub>MTO</sub>** und **L1<sub>MTO</sub>-LG** bzw. das freie MTO. Des Weiteren ist den IC<sub>50</sub>-Werten der Tabelle 14 zu entnehmen, dass epitheliale (MDCK) und endotheliale (bEnd.3) Zellen um das zweifache weniger sensitiv auf das Zytostatikum MTO reagierten als die Tumorzellen, wobei die Formulierung **L1<sub>MTO</sub>** weniger zytotoxisch wirkte als **L4<sub>MTO</sub>**. Die PBS enthaltene Kontrollformulierung (**L4<sub>PBS</sub>**) zeigte keine toxische Wirkung auf die getesteten Zellen, was die physiologische Verträglichkeit der Lipidzusammensetzung belegt.

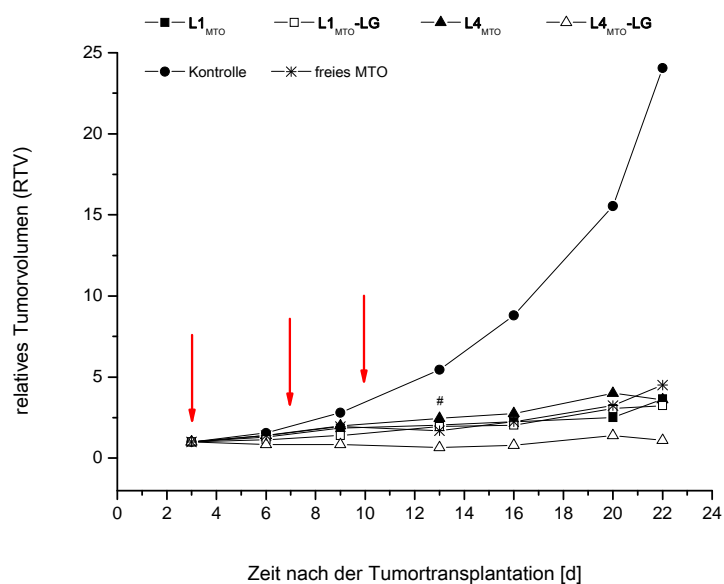
#### **4.12. Therapieversuche am Hirnmetastasenmodell in der Nude-Maus**

Die Testung der therapeutischen Wirksamkeit der ausgewählten liposomalen Formulierungen (**L1<sub>MTO</sub>**, **L4<sub>MTO</sub>**, **L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG**) erfolgte mit einem humanen MT-3 Brustkrebs-Xenograftmodell in der Maus. Klinische Studien zur Therapie von primären Hirntumoren (z.B. Glioblastom) mit liposomal verkapselten Zytostatika wurden schon in der Literatur beschrieben. Es konnte bereits in klinischen Studien gezeigt werden, dass die Kombination von einer systemischen Temozolamidbehandlung mit einer lokalen Behandlung mit MTO bzw. MTO haltige Mikrosphären bei der Therapie von malignen Glioblastomen (Grad 3 und 4) die Überlebensraten gegenüber der alleinigen systemischen Temozolamidgabe deutlich verbessern konnte [242-243]. Unter diesen Bedingungen konnte auch die therapeutische Wirkung weiterer Zytostatika beladener Liposomen (z.B. Doxorubicin) bei der lokalen Behandlung von Glioblastomen durch Boiardi nachgewiesen werden [242; 244]. Dennoch wird MTO (Abb.17) nach dem heutigen Wissensstand bisher nicht zur systemischen Behandlung von Primärtumoren oder Metastasen im Gehirn in der Klinik eingesetzt. MTO wird klinisch hauptsächlich zur Behandlung des fortgeschrittenen und/oder metastasierten Mammakarzinoms verwendet. Weitere Anwendungsgebiete sind das Non-Hodgkin-Lymphom, die akute myeloische Leukämie des Erwachsenen und die Therapie des fortgeschrittenen und hormonresistenten Prostatakarzinoms.

Für die Testung der MTO beladenen Liposomen **L1<sub>MTO</sub>**, **L4<sub>MTO</sub>**, **L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** *in vivo* wurde daher kein Primärtumormodell wie das Glioblastommodell (U373 MG) ausgewählt sondern ein Hirnmetastasenmodell mit humanen MT-3 Brustkrebszellen. Der Zytotoxizitätsassay (siehe Tab.14) zeigte, dass MT-3 Zellen wesentlich besser auf die MTO haltigen Formulierungen ansprechen als die humanen U373 MG Zellen. Des Weiteren sprach für das MT-3 Metastasenmodell das Wachstumsverhalten der Zelllinien im Tier. Zur Etablierung des Hirntumor-Xenograftmodells wurden Wachstumsversuche mit MT-3 und U373 MG Zellen mit unterschiedlichen Zellzahlen und

verschiedenen Wachstumszeiträumen durchgeführt. Hierbei zeigten sich große Unterschiede im Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien. U373 MG Zellen wuchsen in der Nude-Maus wesentlich schlechter an und bildeten sehr diffuse Tumoren im Gehirn, die sehr schlecht auswertbar waren. Dagegen konnte nach der intrazerebralen Injektion von MT-3 Zellen nach etwa 14 Tagen ein klar abgegrenzter Tumor erhalten werden, dessen Größe gut quantifizierbar war. Im Versuch selbst wurde zusätzlich noch ein s.c. MT-3 Tumor im gleichen Tier erzeugt, um die Wirksamkeit des MTOs im Verlauf des Experimentes direkt verfolgen zu können (Abb.38).

Im Therapieversuch erfolgte eine dreimalige (d 3, d 7 und d 10) systemische Behandlung mit 4 mg MTO/kg Körpergewicht der Formulierungen  $L1_{MTO}$ ,  $L4_{MTO}$ ,  $L1_{MTO-LG}$  und  $L4_{MTO-LG}$  sowie des freien Wirkstoffes MTO. Diese Dosis lag unter der bei einmaliger Gabe zuvor ermittelten maximal tolerierbaren Dosis (MTD) von 8 mg MTO/kg Körpergewicht. Um den therapeutischen Effekt zu verstärken und um eine Dosierung im toxischen Bereich zu vermeiden, wurden die Tiere mit 4 mg MTO/kg Körpergewicht mehrfach in Abständen von mehreren Tagen behandelt. Zur Beurteilung des therapeutischen Effektes wurden neben dem Ansprechen des Tumors auf den Wirkstoff auch die unerwünschten und zumeist toxischen Begleiterscheinungen (Nebenwirkungen) erfasst.



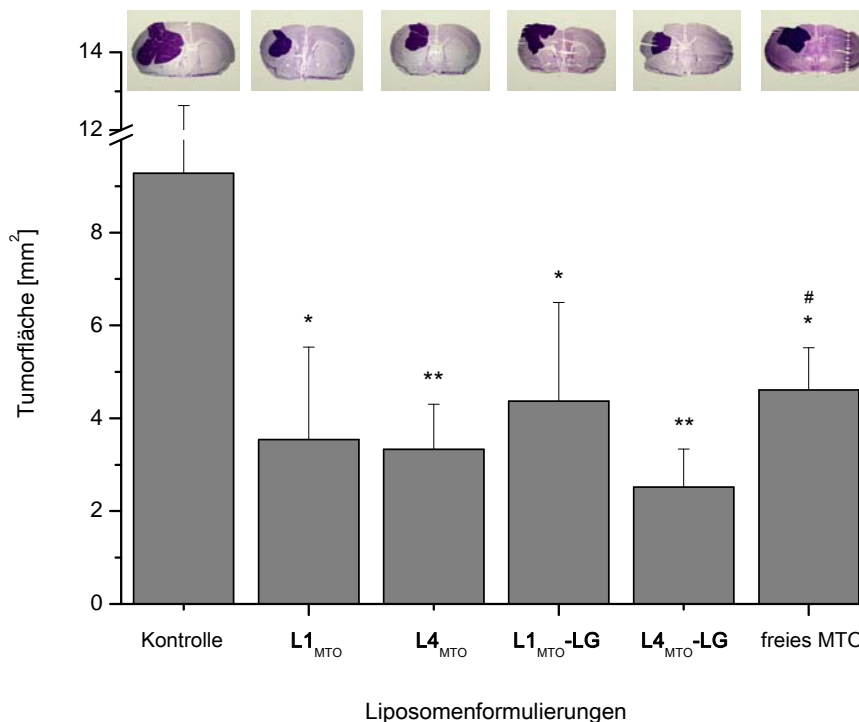
**Abb.38: Wachstumshemmung des s.c. implantierten humanen MT-3 Tumors während der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.**

Je NMRI:nu/nu Maus wurden  $5 \cdot 10^6$  MT-3 Zellen in die linke Flanke implantiert. Die Tiere wurden mit den Formulierungen  $L1_{MTO}$ ,  $L4_{MTO}$ ,  $L1_{MTO-LG}$  und  $L4_{MTO-LG}$  und dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 4 mg/kg bzw. die Kontrollgruppe mit Kochsalzlösung i.v. behandelt (rote Pfeile = Behandlungstage). Die Abbildung zeigt das relative Tumorumfugen (RTV). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen und sind als Mittelwerte angegeben (n: 7-16).

# Einzelne Tiere (3) sind in der MTO-Gruppe aufgrund toxischer Begleiterscheinungen nach der dritten Behandlung verstorben.

In Abbildung 38 sind die Tumorwachstumskurven (relatives Tumolvolumen; RTV) für den s.c. Tumor dargestellt. Die Daten zeigen ein deutliches Ansprechen des s.c. Tumors auf alle liposomalen Formulierungen und auf den freien Wirkstoff MTO. Die Wirksamkeit war vergleichbar und führte zu einer Reduktion des RTV von bis zu 86 % am Tag 22.

Das Ansprechen des intrazerebralen Tumors auf die Behandlung wurde über die Auswertung von Hirnschnitten ermittelt. Hierfür wurden von den entnommenen Gehirnen Gefrierschnitte angefertigt, die mit Kresylviolett gefärbt wurden (Bsp. Abb.29). Zur Bestimmung der intrazerebralen Tumorfläche wurde das Schnittpräparat mit dem größten Tumordurchmesser eingescannt und daraus die individuelle Hirntumorfläche kalkuliert. Alle liposomalen Formulierungen sowie der freie Wirkstoff MTO bewirkten eine signifikante Wachstumshemmung des Hirntumors (Abb.39).



**Abb.39: Hemmung des im Gehirn wachsenden humanen MT-3 Tumors durch MTO-haltige Liposomen und den freien Wirkstoff MTO.**

Je Tier wurden  $5 \cdot 10^3$  MT-3 Zellen intrazerebral implantiert. Die Mäuse wurden mit den Formulierungen L1<sub>MTO</sub>, L4<sub>MTO</sub>, L1<sub>MTO</sub>-LG und L4<sub>MTO</sub>-LG und dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 4 mg/kg bzw. die Kontrollgruppe mit Kochsalzlösung, i.v. behandelt. Am Tag 22 wurden die Tiere getötet und von den entnommenen Gehirnen Schnittpräparate angefertigt. Nach Färbung des Tumorareals mit Kresylviolett wurden diese mikroskopisch eingescannt und vermessen. Die Balken in der Abbildung zeigen die mittlere Tumorfläche [mm<sup>2</sup>]  $\pm$ S.D. der jeweiligen Gruppe von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen (n: 7-16). Die Fotos über dem Balken der Behandlungsgruppe zeigen ein repräsentatives Schnittpräparat eines Gehirns mit angefärbter Tumorfläche.

\* signifikant verschieden zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ );

\*\* signifikant verschieden zur Kontrollgruppe und zur MTO Gruppe ( $p < 0,05$ );

# einzelne Tiere (3) sind aufgrund toxischer Begleiterscheinungen nach der dritten Behandlung verstorben.

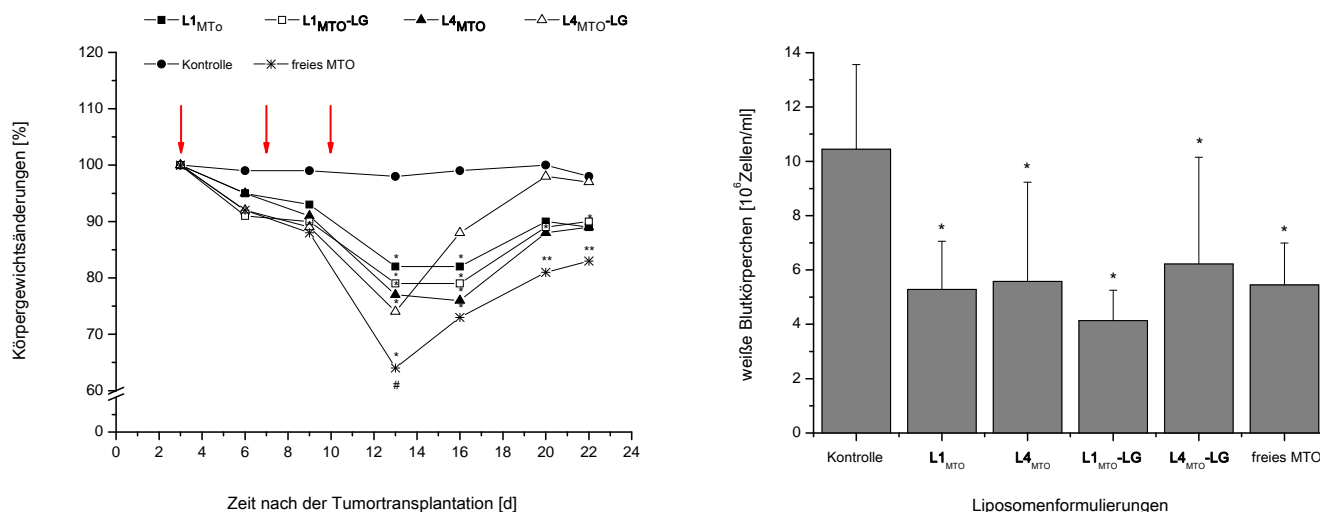
Mit freiem MTO wurde eine Hemmung von 51 % gegenüber der Kontrollgruppe gemessen. Die Formulierung **L1<sub>MTO</sub>-LG** erzielte mit 53 % ein ähnliches Ergebnis. Die Liganden freien Liposomen **L1<sub>MTO</sub>** zeigten mit 62 % eine bessere Wachstumshemmung, die jedoch nicht signifikant verschieden zu den Werten des freien Wirkstoffes waren. Signifikant besser als das freie MTO waren die fluiden Formulierungen **L4<sub>MTO</sub>** und **L4<sub>MTO</sub>-LG**, die mit 64 % und 73 % die stärkste Wachstumshemmung des i.c. Tumors erreichten. Zwischen den liposomalen Formulierungen konnte eine Tendenz zur besseren Wirksamkeit von den **L4<sub>MTO</sub>-LG** Liposomen beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur Wachstumshemmung der Liposomen **L4<sub>MTO</sub>** ist.

Zur Beurteilung des gesamten therapeutischen Spektrums der Liposomen wurden zusätzlich zur hemmenden Wirkung auf die s.c. und i.c. Tumoren die unerwünschten Begleiterscheinungen (Nebenwirkungen) der liposomalen Formulierungen sowie des freien MTO charakterisiert. Die toxischen Nebenwirkungen des MTO zeigten sich durch ein anormales physisches (Körpergewicht, Blutbild, krankhafte Erscheinungen) und psychisches Verhalten der Tiere.

Eine Erfassung der unerwünschten Begleiterscheinungen ist für die klinische Anwendung von zytotoxisch wirksamen Arzneistoffen von großer Bedeutung, da die Verträglichkeit eines Medikamentes entscheidend für die Akzeptanz beim Patienten ist. Wie bereits im Zytotoxizitätstest mit den Liposomen **L1<sub>MTO</sub>**, **L4<sub>MTO</sub>**, **L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** dargestellt, hat MTO nicht nur toxische Wirkungen auf Tumorzellen, sondern auch auf normale Körperzellen (z.B. Epithelzellen der Niere oder des Darms, endotheliale Körperzellen, siehe Tab.14). Ausgehend von den *in vitro* erhaltenen Daten, wurde bei der *in vivo* Anwendung von einer hohen Toxizität der Liposomen **L4<sub>MTO</sub>** ausgegangen, die sich aber nicht bestätigte. Bei der Behandlung der Tiere mit freiem MTO traten teilweise schwere Nebenwirkungen wie Durchfall, Dehydratation und Hautveränderungen auf, die sich in einem starken Gewichtsverlust von bis zu 36 % manifestierten (Abb.40). Bei der Obduktion der Tiere konnten weitere toxische Gewebeschäden (verkleinerte Nieren, Irritationen der Harnwege, Entzündungen des Darmgewebes) festgestellt werden, die durch die Toxizität von MTO auf schnell proliferierende Zellen wie Nierenepithel- oder Darmepithelzellen (Darmschleimhaut) zu erklären sind. Durch die Gabe der liposomalen Formulierungen **L1<sub>MTO</sub>**, **L4<sub>MTO</sub>**, **L1<sub>MTO</sub>-LG** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** mit der gleichen Wirkstoffdosis (4 mg/kg) konnten die toxischen Begleiterscheinungen deutlich reduziert werden (Tab.15). Es ist bekannt, dass liposomale Formulierungen durch die Abschirmung des Arzneistoffes zu einer Verringerung der Nebenwirkungen führen können (Bsp. Doxil®). Des Weiteren kam es zu einer langsameren Freisetzung des MTO über den Behandlungszeitraum, was wiederum zu einer unterschiedlichen Verteilung im Organismus führte.

Eine weitere, in der Fachliteratur beschriebene Nebenwirkung [245], die Knochenmarksdepression, war deutlich in den Blutbildern zu erkennen. Es kam zu einer starken Abnahme der weißen

Blutkörperchen und der Blutplättchen mit allen liposomalen Formulierungen und dem freien Wirkstoff (Abb.40). Nach 12 Tagen erreichte die Zahl der weißen Blutkörperchen wieder das ursprüngliche Niveau.



**Abb.40: Unerwünschte Begleiterscheinungen der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.**

*Links:* Darstellung der Körpergewichtsänderung der Tiere nach der Behandlung mit den Formulierungen L1<sub>MTO</sub>, L4<sub>MTO</sub>, L1<sub>MTO</sub>-LG und L4<sub>MTO</sub>-LG und dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 4 mg/kg bzw. mit Kochsalzlösung (Kontrollgruppe). Die roten Pfeile zeigen jeweils den Tag der Behandlung an. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen und sind als Mittelwerte angegeben (n: 7-16).

- \* signifikant verschieden zur Kontrollgruppe (p < 0,05);
- \*\* signifikant verschieden zur Kontrollgruppe und zur Formulierung L4<sub>MTO</sub>-LG (p < 0,05);
- # einzelne Tiere (3) sind aufgrund toxisch Begleiterscheinungen nach der dritten Behandlung verstorben.

*Rechts:* Die Balken zeigen die Zahl der weißen Blutzellen [10<sup>6</sup> Zellen/ml], die im Blut der Mäuse am Tag 5 gemessen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.D. (n: 10-16).

- \* signifikant verschieden zur Kontrollgruppe (p < 0,05).

Gruppen	Gastrointestinale Beschwerden	Körpergewichtsverlust	Dehydratation	Hautveränderungen
Kontrolle (NaCl)	-	-	-	-
Freies MTO	xx	xxx	xxx	x
L1 <sub>MTO</sub> , L4 <sub>MTO</sub> , L1 <sub>MTO</sub> -LG und L4 <sub>MTO</sub> -LG	-	x	x	-

- kein Effekt      x leichter Effekt      xx starker Effekt      xxx sehr starker Effekt

**Tab.15: Unerwünschte Begleiterscheinungen der verwendeten Therapeutika.**

Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass liposomale Trägersysteme die Therapie von schwer zu behandelnden Hirnmetastasen im Gehirn verbessern können, sowohl bezogen auf die Wachstumshemmung des Tumors, als auch auf die Verbesserung des Nebenwirkungsspektrums. Dennoch wurde der therapeutische Effekt vorwiegend durch die spezielle Lipidzusammensetzung (Kombination von DOPE und OPP) und dem damit entstandenen „slow release“ Effekt beeinflusst. Mit der Kopplung eines Liganden an die Liposomenoberfläche konnte dagegen keine signifikante Verbesserung der therapeutischen Wirkung erreicht werden.

#### 4.13. Pharmakokinetische Studien

Die zeitabhängigen Konzentrationsverläufe von Arzneistoffen im Körper können durch pharmakokinetische Studien untersucht werden. Zur quantitativen Analyse der zeitlichen Verteilung und Umsetzung ( $dc/dt$ ) eines Wirkstoffes werden Simulationen des zeitlichen und räumlichen Ablaufs durch Reaktionsmodelle und Reaktionsgleichungen herangezogen. Wichtige Parameter, die durch diese Modelle bestimmt werden und Informationen zur Bioverfügbarkeit, Verteilung, Metabolismus und Exkretion eines Arzneistoffs geben, sind:

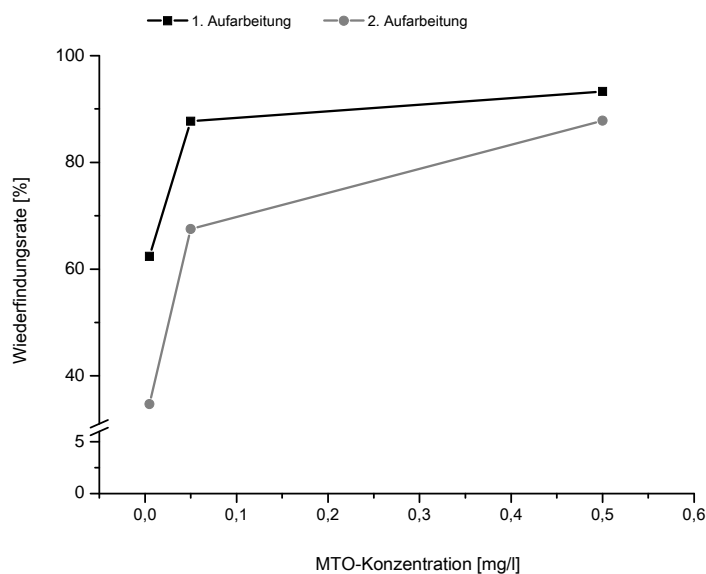
- die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve **AUC** [ $\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
- die Halbwertszeit  **$t_{1/2}$**  [h]
- das Verteilungsvolumen **Vd** [l]
- die Clearance **Cl** [l/h]
- die mittlere Verweildauer im Körper **MRT** [h].

Zur Durchführung der PK Studie wurde ein humanes MT-3 Brustkrebs-Xenograftmodell in der Maus verwendet. Hierzu wurden den Tieren MT-3 Zellen s.c. in die linke Flanke appliziert. Die Behandlung der Mäuse erfolgte zwei Wochen später mit MTO enthaltenen Liposomen (**L<sub>4,MTO</sub>** und **L<sub>4,MTO-LG</sub>**) oder dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 5 mg MTO/kg Körpergewicht. Diese Dosis wurde gewählt um MTO chromatographisch mittels HPLC nachweisen zu können. Die Validierung des Messbereiches der verwendeten HPLC Methode erfolgte durch die mehrfache Messung unterschiedlicher MTO Konzentrationen aus denen mit der Software DINTEST eine Kalibriergerade von MTO nach DIN 32645 erstellt wurde. Mit dieser Kalibriergerade wurden die Konzentrationen der Proben oberhalb der berechneten Bestimmungsgrenze ermittelt.

Zur weiteren Validierung der HPLC Methode wurde die Wiederfindungsrate (Reproduzierbarkeit der Methode) von MTO nach der Aufarbeitung aus biologischen Proben bestimmt. Für die Wiederfindungsrate bei Plasmaproben zeigte sich eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Aufarbeitung.

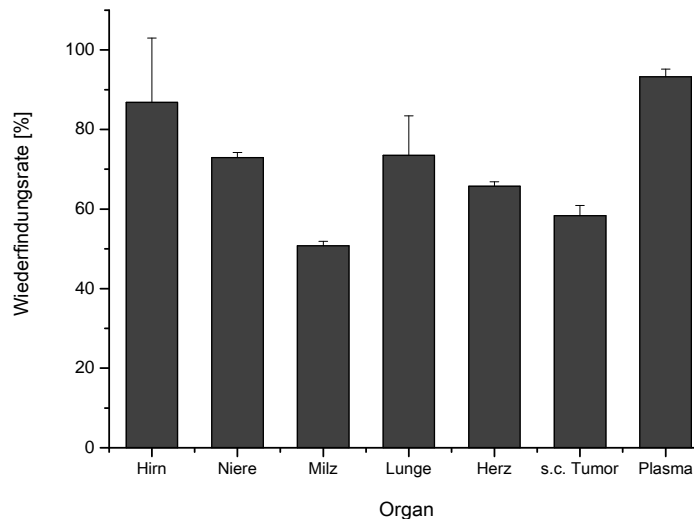


Es konnten bei einer zeitnahen Aufarbeitung der Plasmaproben Wiederfindungsraten zwischen 62 und 93 % erreicht werden. Wurden die Proben dagegen für 24 – 48 h bei -20 °C gelagert und dann erst aufgearbeitet und analysiert, verringerte sich die Wiederfindungsrate auf bis zu 35 % (Abb.41). Daher wurden die Proben innerhalb von 24 h nach der Entnahme aufbereitet, analysiert und die MTO Konzentration mit einer Wiederfindungsrate von 93 % berechnet. In Abbildung 42 sind die Wiederfindungsraten für Hirn, Niere, Milz Lunge, Herz, s.c. Tumor und Plasma für 0,5 mg/l MTO zusammengefasst und zeigen, dass Wiederfindungsraten zwischen  $50,8 \pm 1,1$  % (Milz) und  $93,3 \pm 1,92$  % (Plasma) erreicht wurden. Die MTO Konzentrationen der Organ- bzw. der Plasmaproben wurden mit der jeweils ermittelten Wiederfindungsrate berechnet.



**Abb.41: Zeitabhängigkeit der Wiederfindungsrate von MTO in Plasmaproben.**

Zu den Plasmaproben wurden definierte Mengen an MTO zugegeben, um eine Endkonzentration zwischen 0,005 und 0,5 mg/l einzustellen. Die Proben wurden wie in Material und Methoden (3.13. Pharmakokinetische Studien) beschrieben aufbereitet und der Wirkstoffgehalt mittels validierter HPLC Methode quantifiziert. Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte zeitnah nach der Entnahme (1. Aufarbeitung, schwarze Kurve) bzw. nach einer Lagerung von 24 – 48 h bei -20 °C (2. Aufarbeitung, graue Kurve). Angegeben sind die Mittelwerte [%] von zwei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen.

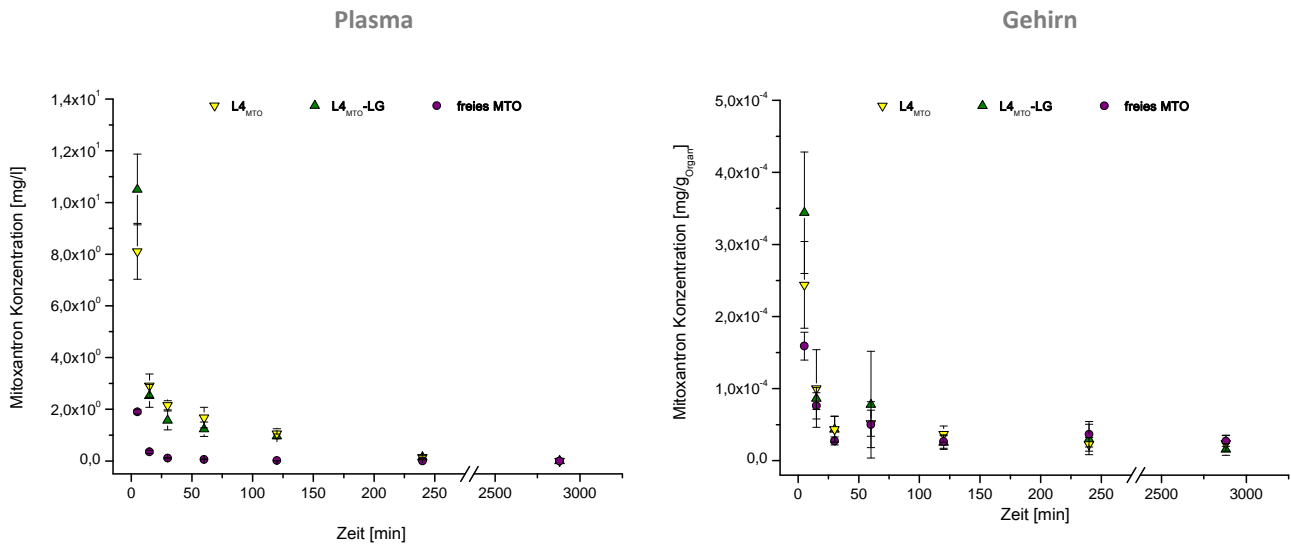


**Abb.42: Wiederfindungsraten für MTO aus biologischen Proben.**

Zu den einzelnen Organen wurde MTO in einer definierten Menge zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von 0,5 mg/l erhalten wurde. Die Proben wurden wie in Material und Methoden (3.13. Pharmakokinetische Studien) beschrieben aufbereitet und der Wirkstoffgehalt mittels validierter HPLC Methode quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte [%]  $\pm$  S.D. des jeweiligen Organs/Plasmas von zwei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Einzelmessungen.

Pharmakokinetische Untersuchungen haben ergeben, dass MTO nach i.v. Applikation schnell aus dem Plasma eliminiert wird und ein sehr großes Verteilungsvolumen aufgrund der breiten Gewebeverteilung aufweist. Somit kann es bereits 5 Stunden nach einer i.v. Injektion zu deutlich höheren MTO Konzentrationen im Gewebe als im Plasma kommen [245]. Die MTO Konzentrationen, die in diesem Versuch im Plasma und im Gehirn gemessen wurden, sind in Abbildung 43 dargestellt.

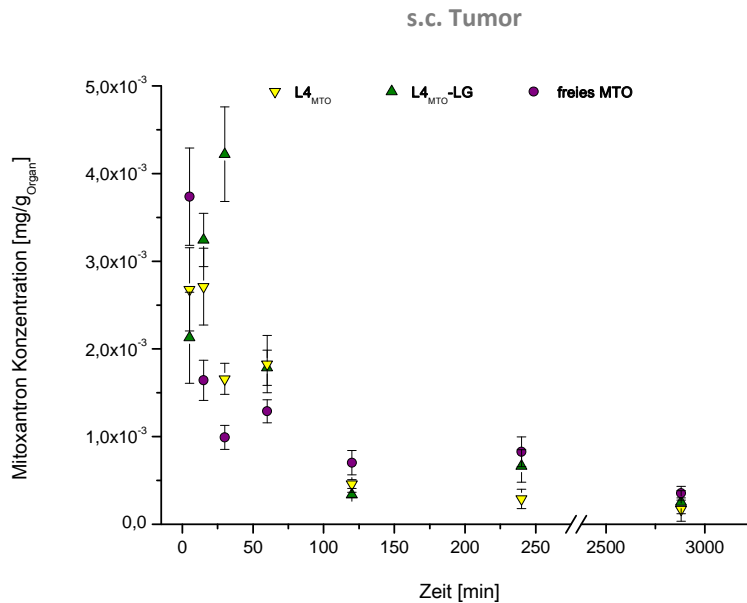
Es ist zu sehen, dass die liposomalen Formulierungen im Gegensatz zum freien Wirkstoff länger im Plasma zirkulieren und somit länger verfügbar sind (Abb.43, links). In der vorliegenden Studie konnte jedoch keine verstärkte Anreicherung von MTO durch die Liposomen **L4<sub>MTO</sub>** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** im Gehirn nachgewiesen werden (Abb.43, rechts). Die Konzentrationen, die im Gehirn gemessen wurden, waren sehr niedrig und die Unterschiede zwischen den einzelnen Formulierungen liegen vermutlich im Schwankungsbereich der Messungen. Dennoch konnte eine höhere MTO Konzentration des liposomalen Wirkstoffes im Gehirngewebe direkt nach der i.v. Applikation nachgewiesen werden (Abb.43). Der verbesserte therapeutische Effekt der Liposomen im Vergleich zum freien Wirkstoff wie in der Therapiestudie nachgewiesen (siehe Abb.39), kann durch eine längere Plasmahalbwertszeit für die Liposomen und vermutlich durch die kurzzeitige Anreicherung im Gehirn direkt nach der Injektion erklärt werden.



**Abb.43: MTO Konzentration im Plasma und im Gehirn nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.**

In der linken Abbildung ist die Plasmakonzentration von MTO in mg/l nach der Behandlung mit den Formulierungen  $L4_{MTO}$ ,  $L4_{MTO-LG}$  und dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 5 mg/kg dargestellt. Die rechte Graphik zeigt die Konzentration von MTO in mg/g<sub>Organ</sub>, die im Gehirn gemessen wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. für n=3.

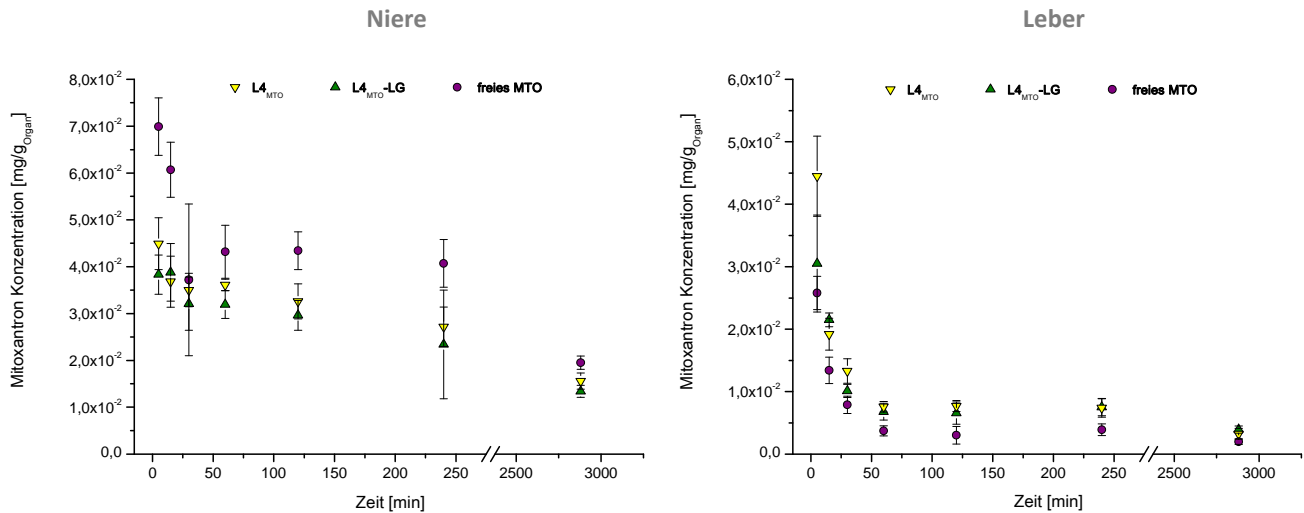
Die Ergebnisse der Untersuchung des s.c. transplantierten MT-3 Tumors, die in Abbildung 44 dargestellt sind, zeigten für die ligandentragenden Liposomen  $L4_{MTO-LG}$  eine Anreicherung von MTO über die ersten 60 min. im Tumorgewebe. Mit der Formulierung  $L4_{MTO}$ , ohne Oberflächenmodifizierung, konnte dagegen keine Erhöhung der MTO Konzentration über die Zeit erreicht werden. Ein anderes Verteilungsmuster wurde für den freien Wirkstoff MTO beobachtet, für den eine hohe Ausgangskonzentration im Tumorgewebe gemessen wurde, die dann aber sehr schnell wieder abnahm. Diese Daten zeigen, dass das liposomal verkapselte MTO länger im Tumor verfügbar war, wodurch ein therapeutischer Effekt gegenüber dem freien Wirkstoff erhöht werden könnte. Auch die vermehrte Anreicherung der oberflächenmodifizierten Liposomen, deuten auf einen Vorteil bei der Therapie des MT-3 Tumors hin. Diese Daten korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der Therapiestudie, bei der die Liposomen  $L4_{MTO-LG}$  auch einen signifikant besseren Effekt auf den Tumor hatten als die freie Substanz. Auch die Abstufung zwischen den Formulierungen  $L4_{MTO-LG}$  und  $L4_{MTO}$  könnten durch das unterschiedliche Anreicherungsverhalten, das sich jedoch ähnelt, erklärt werden.



**Abb.44: MTO Konzentration im s.c. MT-3 Tumor nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.**

In der Abbildung ist die Konzentration von MTO in  $\text{mg/g}_{\text{Organ}}$  im s.c. Tumor nach der Behandlung mit den Formulierungen  $\text{L4}_{\text{MTO}}$ ,  $\text{L4}_{\text{MTO-LG}}$  und dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 5 mg/kg dargestellt. Der Graph zeigt die Mittelwerte  $\pm$  S.D. für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Einzelmessungen jeweils als Doppelbestimmung gemessen ( $n=3$ ).

Die Ausscheidung von MTO erfolgt renal über die Nieren sowie hepatisch über die Leber [245], was auch in dieser Therapiestudie aufgrund der starken gastrointestinalen Begleiterscheinungen zu vermuten war. Die Toxizität von MTO auf schnell proliferierende Zellen wie das Nieren- und Darmepithel (Darmschleimhaut), zeigte sich durch starken Durchfall und einen aufgeblähten Unterleib am lebenden Tier sowie bei der Obduktion durch verkleinerte Nieren, Irritationen (Rötungen) der Harnwege und Entzündungen des Darmgewebes. Klinische Studien zeigten, dass nach der Applikation einer Einmaldosis von MTO innerhalb von 120 Stunden rund 10 % der Dosis über den Urin ausgeschieden wurden, wobei der größte Teil (6,5 %) innerhalb der ersten 24 Stunden eliminiert wird [245]. Diese schnelle Elimination während der ersten 24 Stunden wurde auch in der vorliegenden PK-Studie gefunden. Gleichzeitig zeigten sich deutliche Unterschiede in der Elimination der liposomalen Formulierungen  $\text{L4}_{\text{MTO}}$  und  $\text{L4}_{\text{MTO-LG}}$  im Vergleich zum freien Wirkstoff. Das freie MTO zeigte über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration in den Nieren, während das liposomale MTO schnell ausgeschieden wurde (Abb.45, links). In der Leber waren keine Unterschiede in der Anreicherung von MTO zwischen den Liposomen und dem freien Wirkstoff zu erkennen (Abb.45, rechts).



**Abb.45: MTO Konzentration in den Nieren und in der Leber nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.**

In der linken Abbildung ist die Konzentration von MTO in mg/g<sub>organ</sub> in den Nieren nach der Behandlung mit den Formulierungen  $L4_{MTO}$ ,  $L4_{MTO-LG}$  und dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 5 mg/kg dargestellt. Die rechte Graphik zeigt die Konzentration von MTO in mg/g<sub>organ</sub>, die in der Leber gemessen wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Einzelmessungen jeweils als Doppelbestimmung gemessen (n=3).

In der Milz wurden große Unterschiede in der MTO Konzentration zwischen dem liposomalen Wirkstoff und dem freien MTO gemessen (Tab.16). Die doppelt so große Anreicherung der Liposomen ist auf das MPS zurückzuführen, was vesikuläre Strukturen aus dem Blutkreislauf abfängt und in die Leber sowie in die Milz transportiert. Im Herzen war das Verhältnis von freiem MTO zum liposomalem MTO jedoch gegensätzlich. Hier reicherten sich die Liposomen rund ein Drittel weniger an, wodurch von einer verminderten Kardiotoxizität der liposomalen Formulierung ausgegangen werden kann. In der Lunge konnte kein Unterschied zwischen dem liposomalen Wirkstoff und dem freien MTO gemessen werden. Die zeitliche Änderung der MTO Konzentration in den oben beschriebenen Organen (Milz, Herz und Lunge) ist tabellarisch zusammengefasst (Tab.16) und graphisch im Anhang in *Abbildung A* und *B* dargestellt.

Zeit [min]	MTO-Konzentration [10 <sup>-2</sup> mg/g <sub>Organ</sub> ]								
	Milz			Herz			Lunge		
	L <sub>4MTO</sub>	L <sub>4MTO</sub> -LG	MTO	L <sub>4MTO</sub>	L <sub>4MTO</sub> -LG	MTO	L <sub>4MTO</sub>	L <sub>4MTO</sub> -LG	MTO
5	1,60 ± 0,14	1,41 ± 0,08	0,49 ± 0,15	1,00 ± 0,07	0,96 ± 0,08	1,04 ± 0,23	1,56 ± 0,15	1,71 ± 0,06	2,02 ± 0,40
15	1,39 ± 0,63	1,71 ± 0,28	0,85 ± 0,33	0,85 ± 0,08	0,71 ± 0,09	1,12 ± 0,21	1,44 ± 0,18	1,12 ± 0,20	1,75 ± 0,42
30	1,23 ± 0,21	1,10 ± 0,14	0,61 ± 0,17	0,74 ± 0,11	0,78 ± 0,14	1,00 ± 0,23	1,08 ± 0,14	0,95 ± 0,09	1,11 ± 0,20
60	1,15 ± 0,37	1,17 ± 0,12	0,57 ± 0,16	0,61 ± 0,09	0,61 ± 0,06	0,79 ± 0,32	0,82 ± 0,18	1,00 ± 0,18	0,98 ± 0,21
120	0,96 ± 0,18	0,93 ± 0,18	0,56 ± 0,12	0,51 ± 0,06	0,56 ± 0,03	0,68 ± 0,14	0,67 ± 0,32	0,79 ± 0,23	1,30 ± 0,11
240	1,05 ± 0,15	1,32 ± 0,44	0,53 ± 0,04	0,54 ± 0,10	0,46 ± 0,05	0,64 ± 0,11	0,94 ± 0,05	0,81 ± 0,11	1,28 ± 0,11
2880	1,13 ± 0,17	1,16 ± 0,05	0,49 ± 0,14	1,13 ± 0,08	0,42 ± 0,08	0,48 ± 0,04	0,89 ± 0,04	0,77 ± 0,17	1,03 ± 0,13

**Tab.16: MTO Konzentration in der Milz, im Herzen und in der Lunge nach der Behandlung mit MTO-haltigen Liposomen und dem freien Wirkstoff MTO.**

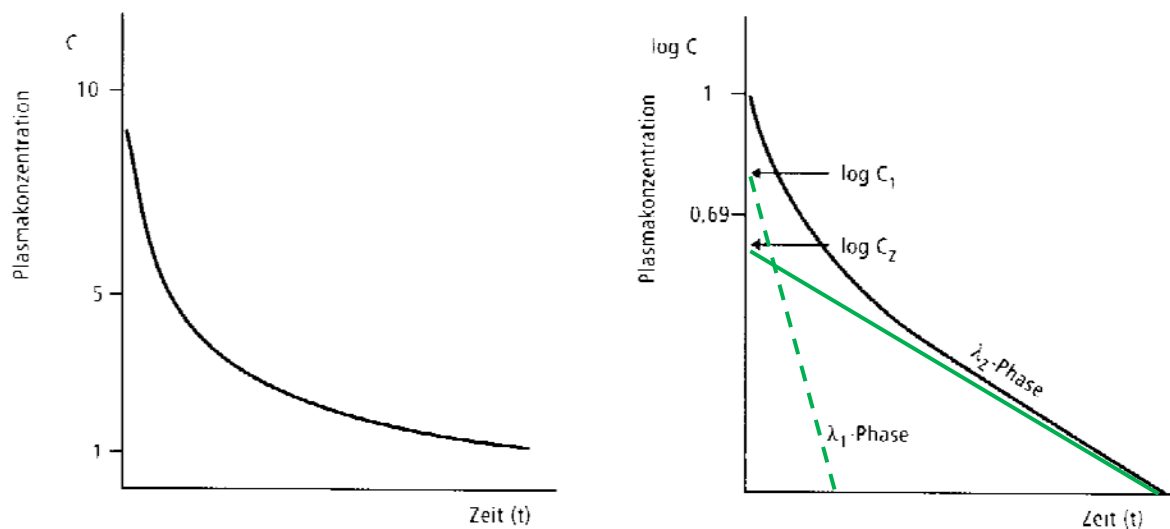
In der Tabelle sind die Konzentrationen von MTO in mg/g<sub>Organ</sub> in der Milz, dem Herzen und in der Lunge nach der Behandlung mit den Formulierungen L<sub>4MTO</sub>, L<sub>4MTO</sub>-LG und dem freien Wirkstoff MTO in einer Dosis von 5 mg/kg dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte ± S.D. für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Einzelmessungen jeweils als Doppelbestimmung (n=3).

Für die Ermittlung der oben beschriebenen pharmakokinetischen Parameter wurde mit Hilfe des Akaike Informationskriterium (AIC) ein passendes Modell für die Simulation der experimentell ermittelten Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven ausgewählt. Je besser die Simulation eines Modells zu den realen Messwerten passt, desto niedriger ist der berechnete AIC-Wert. Die Simulation wurde mit Hilfe des Pharmakokinetikprogramms WinNonlin durchgeführt und auf Grundlage der AIC-Werte wurde ein 2-Kompartiment-Modell für i.v. Applikationen ausgewählt (Abb.14), welches sich durch folgende Modellgleichung beschreiben lässt:

$$c(t) = C_1 * e^{(-\lambda_1 * t)} + C_2 * e^{(-\lambda_2 * t)}$$

$c(t)$	Plasmaspiegel zum Zeitpunkt $t$
$C_1$	Ordinatenabschnitt 1
$C_2$	Ordinatenabschnitt 2
$\lambda_1$	Geschwindigkeitskonstante (vorwiegend für Verteilungsvorgänge)
$\lambda_2$	Geschwindigkeitskonstante (vorwiegend für Eliminationsvorgänge).

Mit dieser Modellgleichung ergibt sich der für ein 2-Kompartiment-Modell typische biphasische Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf (Abb.46).



**Abb.46: Schematische Darstellung der Abnahme des Plasmaspiegels eines Wirkstoffes nach i.v. Applikation bei Vorliegen eines 2-Kompartiment-Modells\*.**

In der linken Abbildung ist eine lineare Darstellung der Plasmakonzentration über der Zeit zu sehen. Die rechte Abbildung zeigt eine halblogarithmische Darstellung der Plasmakonzentration über der Zeit. Hierbei charakterisiert die gestrichelte grüne Linie die  $\lambda_1$ -Phase und die durchgezogene grüne Linie die  $\lambda_2$ -Phase.

\* Modifiziert aus Mutschler 2001 [47].

Bei einer halblogarithmischen Darstellung zeigt die erste Phase einen schnell abfallenden Verlauf, der in erster Linie durch die Arzneistoffverteilung bestimmt wird und durch die Geschwindigkeitskonstante  $\lambda_1$  beschrieben wird. In der zweiten, weniger steil verlaufenden Phase der Plasmakonzentrationszeitkurve, ist die Elimination des Arzneistoffes aus dem Plasma geschwindigkeitsbestimmend, was mit der Geschwindigkeitskonstanten  $\lambda_2$  beschrieben wird (Abb.46) [47].

Die Ergebnisse der pharmakologischen Auswertung der Plasmakonzentration von MTO sind in Tabelle 17 für die einzelnen Formulierungen zusammengefasst. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC), ist proportional der bioverfügbaren Menge eines Wirkstoffes, d.h. des Anteils an der insgesamt applizierten Menge, die in den Blutkreislauf kommt. In der vorliegenden Studie ist die Bioverfügbarkeit (F) für einen intravenös verabreichten Arzneistoff per Definition 100 % für die jeweilige Formulierung. Die unterschiedlich ermittelten Werte für die AUC, die für die Liposomen **L4<sub>MTO</sub>** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** deutlich höher als für das freie MTO waren, resultieren aus der längeren Verweildauer des liposomalen MTO im Blutkreislauf. Dadurch war das liposomale MTO für eine Verteilung in das umliegende Gewebe bzw. in die Organe länger verfügbar als der freie Wirkstoff. Auch die Zeitspanne, in der sich die Konzentration des MTO im Plasma jeweils halbierte, war für die Liposomen höher. Die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ), beschrieben durch die Formeln:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$$

steht in einer festen Beziehung zu den Geschwindigkeitskonstanten der terminalen Phase  $\lambda_z$  (Abb.46) [47].

Das in einer Zeiteinheit formal von einem Wirkstoff befreite Plasmavolumen, die Clearance oder auch die Eliminationskapazität ergab für das freie MTO einen 10-fach höheren Wert im Vergleich zu den MTO enthaltenen Vesikeln. Die Clearance (Cl) steht in folgender Beziehung zum Verteilungsvolumen ( $V_d$ ) und zur Geschwindigkeitskonstanten der terminalen Phase ( $\lambda_z$ ):

$$Cl = V_d * \lambda_z$$

Die Gesamtclearance ( $Cl_{tot}$ ) addiert sich aus der renalen und der hepatischen Clearance. Sie stellt die Leistung aller an der Elimination beteiligten Vorgänge dar und ist mit der Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) und dem scheinbaren Verteilungsvolumen ( $V_d$ ) über folgend Beziehung verbunden:

$$t_{1/2} = \ln 2 * \frac{V_d}{Cl_{tot}}$$

Somit ist die Halbwertszeit umso kürzer, je kleiner das Verteilungsvolumen oder je größer die Gesamtclearance ist [47]. Diese Erkenntnisse lassen sich auch auf die experimentellen Daten übertragen, da die kürzere Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) des freien Wirkstoffes auch in einem größeren Verteilungsvolumen ( $V_d$ ) mündete. Die mittlere Verweildauer im Körper war wiederum bei den Formulierungen **L4<sub>MTO</sub>** und **L4<sub>MTO</sub>-LG** deutlich höher als für das freie MTO, was auch mit der Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) korrelierte.



Bezeichnung	MTO	L4 <sub>MTO</sub>	L4 <sub>MTO-LG</sub>
AUC [mg*h*L <sup>-1</sup> ]	0,536 ± 1,61 %	6,376 ± 6,44 %	6,179 ± 9,45 %
t <sub>1/2</sub> [h]	0,078 ± 2,52 %	0,209 ± 19,91 %	0,147 ± 16,22 %
Vd [L]	0,074 ± 9,73 %	0,029 ± 9,12 %	0,031 ± 15,89 %
Cl [L/h]	0,233 ± 1,61 %	0,020 ± 6,45 %	0,020 ± 9,46 %
MRT [h]	0,318 ± 11,14 %	1,472 ± 14,01 %	1,515 ± 24,06 %

AUC<sub>liposomal</sub> >> AUC<sub>frei</sub>

t<sub>1/2 liposomal</sub> > t<sub>1/2 frei</sub>

Cl<sub>liposomal</sub> << Cl<sub>frei</sub>

Vd<sub>liposomal</sub> < Vd<sub>frei</sub>

**Tab.17: Pharmakokinetische Parameter der MTO Konzentrationsverteilung im Plasma.**

Die MTO Konzentrationsverteilung im Plasma wurde mit Hilfe eines 2-Kompartiment-Modells berechnet. Die dargestellten Abweichungen (±) beziehen sich auf Unterschiede zwischen den realen Messwerten und den berechneten Parametern aus dem theoretischen Modell.

Diese berechneten Werte spiegeln sich auch in den simulierten Modellparametern wieder wie den Geschwindigkeitskonstanten k<sub>10</sub>, k<sub>12</sub> und k<sub>21</sub> die in Tabelle 18 zusammengefasst sind.

Bezeichnung	MTO	L4 <sub>MTO</sub>	L4 <sub>MTO-LG</sub>
k <sub>10</sub> ± sd [h <sup>-1</sup> ]	8,87 ± 0,22	3,32 ± 0,66	4,72 ± 0,77
k <sub>12</sub> ± sd [h <sup>-1</sup> ]	2,83 ± 0,15	10,02 ± 2,09	8,74 ± 1,07
k <sub>21</sub> ± sd [h <sup>-1</sup> ]	1,55 ± 0,18	2,58 ± 0,25	1,42 ± 0,20

**Tab.18: Ermittelte Modell-Parameter für das 2-Kompartiment-Modell zur Auswertung der MTO Konzentration im Plasma.**

Die dargestellten Abweichungen (±) beziehen sich auf Unterschiede zwischen den realen Messwerten und den berechneten Parametern aus dem theoretischen Modell.

Da es sich bei dem verwendeten Modell um ein i.v. Bolus Modell handelte, gibt es keine Diffusionskonstante k<sub>01</sub> in das Kompartiment 1 hinein. Die Konstante k<sub>12</sub> steht für den Transport (Diffusion) des Wirkstoffes, der eventuell noch liposomal verkapselt vorliegt, aus dem ersten

Kompartiment in das Kompartiment 2, wobei  $k_{21}$  die Elimination des womöglich schon freien MTO aus dem Kompartiment 2 zurück in das erste kennzeichnet. Die Eliminationsgeschwindigkeit aus dem Kompartiment 1 wird hierbei mit  $k_{10}$  bezeichnet.

Die pharmakologischen Daten zeigen einen deutlichen Vorteil für die Liposomen **L<sub>4</sub><sub>MTO</sub>** und **L<sub>4</sub><sub>MTO</sub>-LG** gegenüber dem freien Wirkstoff MTO, obwohl keine direkte Anreicherung der Vesikel im Gehirn gemessen werden konnte. Dagegen konnte eine ansteigende MTO Konzentration für die Liposomen **L<sub>4</sub><sub>MTO</sub>-LG** im s.c. MT-3 Tumor gezeigt werden. Der Unterschied zwischen der Formulierung **L<sub>4</sub><sub>MTO</sub>** und den oberflächenmodifizierten Vesikeln **L<sub>4</sub><sub>MTO</sub>-LG**, die in der Therapiestudie zu sehen waren (Abb.39), konnten nicht mit den PK-Daten für das Gehirn, aber mit den Ergebnissen des s.c. Tumors der PK-Studie belegt werden. Dennoch ist eine Anreicherung der ligandenhaltigen Liposomen durch die längere Zirkulation im Plasma und die gute Rezeptorausstattung der MT-3 Zellen im intrazerebralen Tumor wahrscheinlich und könnte somit den therapeutischen Effekt der Formulierung **L<sub>4</sub><sub>MTO</sub>-LG** (Abb.39) erklären.



## V. Schlussfolgerungen und Ausblick

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines effektiven liposomalen Trägersystems zur Überwindung der BHS, um die Therapie von Hirnmetastasen zu verbessern.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die Vesikeleigenschaften optimiert und die Liposomen mit einer Peptidsequenz (Angiopeptid 2) als Ligand für ein aktives Targeting modifiziert. Diese „Trojan Horse“ Liposomen erfüllten die Erwartungen *in vitro*, indem sie am besten zellulär aufgenommen wurden und auch in der Lage waren, eine dichte Zellbarriere effektiv zu überwinden. In anschließenden *in vivo* Untersuchungen konnte dann gezeigt werden, dass diese THL eine signifikante Verbesserung der therapeutischen Wirkung hinsichtlich der Hemmung des Tumorwachstums und der Verringerung der Nebenwirkungen im Vergleich zum freien Wirkstoff erzielen. Hierbei war der Effekt, der mit den ligandentragenden Liposomen erreicht wurde, besser als der mit vergleichbaren fluiden Liposomen ohne Liganden, jedoch noch nicht statistisch signifikant. Aufgrund dieser Datenlage ist davon auszugehen, dass der verbesserte therapeutische Effekt wahrscheinlich durch einen „slow release“ Effekt dieser fluiden Liposomen erzielt werden konnte.

Weiterführende Studien müssen nun zeigen, dass der erzielte therapeutische Effekt der THL noch optimierbar ist, indem entweder andere Wirkstoffe verkapselt werden, deren Schrankengängigkeit schlechter ist als die von MTO, oder die gewonnenen Erfahrungen auf ein anderes Targetingsystem übertragen werden.

Die bisherigen Ergebnisse bilden eine Basis für die weitere Optimierung von Trägersystemen, die in der Lage sind die BHS zu überwinden. Da ein großer Bedarf an einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten von Hirntumoren und Hirnmetastasen besteht, sollte das Potential der THL für die Entwicklung von neuen, wirkungsvollen Therapeutika zur Behandlung von zerebralen Krebserkrankungen genutzt werden. Das hier entwickelte liposomale Trägersystem kann die Grundlage für eine Plattformtechnologie bilden, die nicht nur zur systemischen Therapie von Hirntumoren angewendet werden kann, sondern auch für andere schwere ZNS Erkrankungen eingesetzt werden könnte.



## VI. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Herstellung von „Trojan Horse“- Liposomen zur systemischen Therapie von Hirntumoren und Metastasen durch eine Verbesserung des aktiven Transportes durch die BHS. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein oberflächenmodifiziertes liposomales Trägersystem entwickelt, das an einen Vertreter der LDL Rezeptor Familie (LRP) im Gehirn bindet und einen endozytotischen Transport über die BHS auslöst. Um dieses Ziel zu erreichen wurden die Liposomen hergestellt, charakterisiert und anschließend umfassend in *in vitro* und *in vivo* Experimenten getestet.

Einführend wurde der Einfluss der Membraneigenschaften der Vesikel auf die zelluläre Aufnahme und die Transzytose *in vitro* untersucht. Es wurden mehr als 25 verschiedene Liposomen mit der Lipidfilm-Hydratations- und Extrusionstechnik hergestellt und dann charakterisiert. Die Ergebnisse der zellulären Aufnahmeversuche zeigten, dass vor allem die Oberflächenladung und die Membranfluidität der Vesikel, die durch die Zusammensetzung bedingt war, eine entscheidende Rolle spielten. Positiv geladene Liposomen (**L2**) und die negativ geladene Formulierung (**L3**), die das Helferlipid DOPE enthielt, wurden am besten von den Zellen aufgenommen. In den folgenden *in vitro* und *in vivo* Experimenten wurden fünf repräsentative Liposomenformulierungen (**L1-L5**) mit unterschiedlicher zellulärer Aufnahmerate verwendet. In den anschließenden Transzytose Experimenten zeigte sich, dass der transzelluläre Transport von einem hydrophilen Markermolekül positiv mit der Membranfluidität korrelierte und fluide, DOPE und OPP enthaltene Liposomen (**L4**) am effizientesten transportiert wurden.

Um den aufgezeigten Effekt des verbesserten Transportes über Zellbarrieren durch fluide Liposomen zu steigern, wurden die Liposomen **L4** mit einem 19-mer-Peptid als Ligand ausgestattet. Dieses Peptid wurde vom LRP spezifischen Aprotinin abgeleitet und aktiviert ein rezeptorvermitteltes Targeting. Diese Oberflächenveränderung steigerte die zelluläre Aufnahme der fluiden, ligandtragenden Liposomen **L4-LG** deutlich um 60 % und erhöhte die Transzytose um mehr als 50 % im Vergleich zu den Vesikeln **L4** ohne Ligand.

Zur Untersuchung des therapeutischen Effektes dieser Liposomen *in vivo* wurden humane Brustkrebszellen intrazerebral und s.c. in Mäuse transplantiert. Diese wurden i.v. mit freiem Mitoxantron oder mit MTO haltigen Liposomen (ohne/mit Ligand) behandelt. Die Liposomen **L4-LG** hatten die höchste Wirksamkeit und führten zu einer signifikanten Reduktion des Tumorumfanges um 88 % für die s.c. und um 73 % für die intrazerebral wachsenden Tumoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Eine etwas schwächere, jedoch nicht signifikant verschiedene Wirkung hatten auch die ligandenfreien Liposomen **L4** was darauf hindeutet, dass eher ein „slow

release“ den verbesserten therapeutischen Effekt bedingte und das Targetingsystem noch optimierbar ist. Des Weiteren konnten mit allen liposomalen Formulierungen die durch freies MTO hervorgerufenen Nebenwirkungen (gastrointestinale Toxizität, Dehydratation) verringert werden.

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Studie zur zeitlichen Verteilung und Umsetzung von MTO wurden mit Hilfe eines 2-Kompartiment-Modells berechnet und zeigten für die ligandenhaltigen Liposomen **L1-LG** und **L4-LG** im Vergleich zum freien MTO eine längere Verweildauer im Körper. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Resultaten der therapeutischen Studien.

Die Daten zeigen, dass eine verbesserte Therapie von Hirnmetastasen mit „Trojan Horse“-Liposomen, die einen aktiven Transport über die BHS mittels LRP nutzen, möglich ist. Die entwickelten Liposomen können als Grundlage für eine Plattformtechnologie zur systemischen Behandlung von Hirntumoren eingesetzt werden, die dazu geeignet ist, auch auf andere Rezeptoren angewendet zu werden und/oder um andere Arzneistoffe ins Gehirn zu transportieren.

## VII. Abstract

The aim of this work was the design and development of Trojan horse liposomes to treat brain tumors and metastases systemically by an improvement of the active passage of these drug transporters through the BBB. To achieve this aim, a surface modified liposomal carrier system was designed to target a receptor of the LDL family (LRP) in the brain and to mediate an endocytotic transport through the BBB. Therefore, liposomes were produced, characterized and subsequently tested *in vitro* and *in vivo* in extensive experiments.

First, the effects of liposomal membrane properties on cellular uptake and transcytosis were investigated *in vitro*. More than 25 different liposome formulations were prepared by lipid film hydration and extrusion technology and characterized. Liposomal uptake by the cells seems to be mediated by different mechanisms. It is mainly depending on surface charge and membrane fluidity based on the lipids used for preparation. Liposomes with a positive charge (**L2**) and the negative charged formulation (**L3**) which contains the helper lipid DOPE were taken up in highest amounts. In the following *in vitro* and *in vivo* experiments representative liposomes were selected (**L1-L5**), which showed different uptake rates. In a next step, transcytosis experiments proved the positive correlation of the transcellular transport of a hydrophilic marker molecule with the membrane fluidity and showed that fluid liposomes containing DOPE and OPP (**L4**) were the most efficient vesicles for the transcytosis.

To increase the previous effect of the improved transport across cellular barriers by fluid liposomes, the **L4** liposomes were equipped with a 19-mer peptide ligand. This peptide was derived from the LRP-specific aprotinin and activates a receptor-mediated targeting. This surface modification increased the cellular uptake of the fluid, ligand-containing liposome **L4-LG** significantly by 60 %. Transcytosis was increased by more than 50 % compared to the **L4** vesicles without ligand.

To test the therapeutic effect *in vivo*, human breast cancer cells were transplanted into the brain and s.c. in mice. Mice were treated i.v. with free Mitoxantron or MTO entrapped formulations (without/with ligand). **L4-LG** liposomes showed the best efficiency and led to a significant reduction in the s.c. tumor volume by 88 % and 73 % of intracerebrally growing tumors, respectively, in comparison to the untreated control group. A slightly decreased, but not significantly different effect was shown by the ligand-free liposomes **L4**, what suggests that mostly the slow release improved the therapeutic effect and that the targeting system is still improvable. In addition, all tested liposomal formulations reduced the side effects caused by free MTO (gastrointestinal toxicity, dehydration).



The results of the pharmacokinetic study of the time dependent distribution and transformation of MTO were calculated with the help of a 2-compartment model. For ligand-containing **L1-LG** and **L4-LG** liposomes, they showed longer retention in the body, in comparison to the free MTO. These results correlate very well with the results of therapeutic trials.

All these data show that an improved therapy of brain metastasis is possible with “Trojan horse” liposomes that use active transport across the BBB by LRP. These vesicles could be used as a platform technology for systemic treatment of brain tumors, which can be adapted to target other receptors and/or to carry other drugs into the brain.

**VIII. Literaturverzeichnis**

- [1] Deutsches Krebsforschungszentrum (dkfz), 2010.  
www.dkfz.de
- [2] Deutsche Krebshilfe e.V. Bonn, 2009.  
www.krebshilfe.de
- [3] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114(2): 97–109.
- [4] Robert-Koch Institut (rki), 2010. Krebs in Deutschland 2005/2006.  
www.rki.de
- [5] Statistisches Bundesamt Deutschland (destatis), 2010.  
www.destatis.de
- [6] Fichtner I. Präklinische Daten als Grundlage für die Konzeption klinischer Studien. *Onkologie* 2008; 31(1): 34-38.
- [7] Fichtner I, Reszka R, Arndt D, Zeisig R. Animal experiments - an essential component for the development of liposomal anticancer agents. *J Liposome Res* 2003; 13(1): 9-15.
- [8] Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 2002; 10(4): 317-325.
- [9] Demeule M, Poirier J, Jodoin J, Bertrand Y, Desrosiers RR, Dagenais C et al. High transcytosis of melanotransferrin P97 across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2002; 83(4): 924-933.
- [10] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010; 37(1): 13-25.
- [11] Ehrlich P. Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie. Berlin: Hirschwald 1885.
- [12] Goldmann EE. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh Preuss Akad Wiss Phys Math* 1913; K1(1): 1-60.
- [13] Miller G. Drug targeting. Breaking down barriers. *Science* 2002; 297(5584): 1116-1118.
- [14] Demeuse P, Kerkhofs A, Struys-Ponsar C, Knoop B, Remacle C, van den Bosch de Aguilar. Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier. *J Neurosci Methods* 2002; 121(1): 21-31.
- [15] Dermietzel R, Krause-Finkeldey D, Faustmann P. Checkpoint im Gehirn: Jetzt in der Kulturschale. *Medizin* 2007; 1(1): 23-28.
- [16] Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22(1): 11-28.
- [17] Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther* 2004; 104(1): 29-45.
- [18] Goldstein GW, Betz AL. Recent advances in understanding brain capillary function. *Ann Neurol* 1983; 14(4): 389-395.
- [19] Visser CC, Voorwinden LH, Crommelin DJ, Danhof M, de Boer AG. Characterization and modulation of the transferrin receptor on brain capillary endothelial cells. *Pharm Res* 2004; 21(5): 761-769.

- [20] Pardridge WM. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Adv Drug Deliv Rev* 1995; 15(1): 5-36.
- [21] Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade MF, Zhang H, Ball M, Stanimirovic DB. The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J* 2003; 17(14): 2085-2087.
- [22] Girardin F. Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development. *Dialogues Clin Neurosci* 2006; 8(3): 311-321.
- [23] Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(8): 591-602.
- [24] van der Sandt IC, de Boer AG, Breimer DD. Implications of Pgp for the transport and distribution of drugs into the brain. In *Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease*, ed. Sharma HS, Wesman J; San Diego: Elsevier Acad, 2004; 1(1): 63-72.
- [25] Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem* 1999; 1(1): 55-68.
- [26] de Boer AG, van dS, I, Gaillard PJ. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43(1): 629-656.
- [27] Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res* 1982; 241(1): 49-55.
- [28] Pardridge WM, Oldendorf WH. Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1975; 401(1): 128-136.
- [29] Kumagai AK, Eisenberg JB, Pardridge WM. Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *J Biol Chem* 1987; 262(31): 15214-15219.
- [30] Pardridge WM, Triguero D, Buciak J. Transport of histone through the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251(3): 821-826.
- [31] Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001; 108(6): 779-784.
- [32] Moos T, Morgan EH. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20(1): 77-95.
- [33] Biessels GJ, Bravenboer B, Gispen WH. Glucose, insulin and the brain: modulation of cognition and synaptic plasticity in health and disease: a preface. *Eur J Pharmacol* 2004; 490(1): 1-4.
- [34] Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van BA, McCall AL, Flier JS. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 1998; 139(8): 3485-3491.
- [35] Duffy KR, Pardridge WM, Rosenfeld RG. Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metabolism* 1988; 37(2): 136-140.
- [36] Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422(6927): 37-44.
- [37] Ivanov AI. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 2008; 440(1): 15-33.
- [38] Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, Cohn ZA. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 1983; 96(1): 1-27.

- [39] el-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol* 1999; 45(1): 15-23.
- [40] Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(1): 79-87.
- [41] Drewes LR. What is the blood-brain barrier? A molecular perspective. *Cerebral vascular biology. Adv Exp Med Biol* 1999; 474(1): 111-122.
- [42] Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44(1): 235-249.
- [43] Pardridge WM. Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *J Drug Target* 2010; 18(3): 157-167.
- [44] Fenstermacher J, Kaye T. Drug "diffusion" within the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 531(1): 29-39.
- [45] Liu X, Chen C. Strategies to optimize brain penetration in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2005; 8(4): 505-512.
- [46] Oldendorf WH. Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 147(3): 813-815.
- [47] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2008.
- [48] Prokai L, Prokai-Tatrai K, Bodor N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Med Res Rev* 2000; 20(5): 367-416.
- [49] Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* 1998; 42(5): 1083-1099.
- [50] Bartus RT, Elliott P, Hayward N, Dean R, McEwen EL, Fisher SK. Permeability of the blood brain barrier by the bradykinin agonist, RMP-7: evidence for a sensitive, auto-regulated, receptor-mediated system. *Immunopharmacology* 1996; 33(1): 270-278.
- [51] Begley DJ. The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48(2): 136-146.
- [52] Scherrmann JM. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* 2002; 38(6): 349-354.
- [53] Patel NK, Bunnage M, Plaha P, Svendsen CN, Heywood P, Gill SS. Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol* 2005; 57(2): 298-302.
- [54] Temsamani J, Scherrmann JM, Rees AR, Kaczorek M. Brain drug delivery technologies: novel approaches for transporting therapeutics. *Pharm Sci Technol Today* 2000; 3(5): 155-162.
- [55] Dietz GP, Bahr M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* 2004; 27(2): 85-131.
- [56] Pardridge WM. Vector-mediated drug delivery to the brain. *Advanced drug delivery* 1999; 36(1): 299-321.
- [57] Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol* 2005; 30(1): 57-70.

- [58] Broadwell RD, Baker-Cairns BJ, Friden PM, Oliver C, Villegas JC. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. III. Receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Exp Neurol* 1996; 142(1): 47-65.
- [59] Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(2): 131-139.
- [60] Lee HJ, Engelhardt B, Lesley J, Bickel U, Pardridge WM. Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292(3): 1048-1052.
- [61] Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71(2): 251-256.
- [62] Demeule M, Regina A, Che C, Poirier J, Nguyen T, Gabathuler R et al. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324(3): 1064-1072.
- [63] Gutman RL, Peacock G, Lu DR. Targeted drug delivery for brain cancer treatment. *J Control Release* 2000; 65(1): 31-41.
- [64] McDonagh CF, Turcott E, Westendorf L, Webster JB, Alley SC, Kim K et al. Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment. *Protein Eng Des Sel* 2006; 19(7): 299-307.
- [65] Vorbrodts AW. Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries. *J Neurocytol* 1989; 18(3): 359-368.
- [66] Herve F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J* 2008; 10(3): 455-472.
- [67] Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. TAT peptide-modified liposomes provide enhanced gene delivery to intracranial human brain tumor xenografts in nude mice. *Oncol Res* 2007; 16(8): 351-359.
- [68] Rousselle C, Clair P, Tamsamani J, Scherrmann JM. Improved brain delivery of benzylpenicillin with a peptide-vector-mediated strategy. *J Drug Target* 2002; 10(4): 309-315.
- [69] Zorko M, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(4): 529-545.
- [70] Prochiantz A. Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6(5): 629-634.
- [71] Tunnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, Cardoso MC. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J* 2006; 20(11): 1775-1784.
- [72] Astriab-Fisher A, Sergueev D, Fisher M, Shaw BR, Juliano RL. Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm Res* 2002; 19(6): 744-754.
- [73] Wolf Y, Pritz S, Abes S, Bienert M, Lebleu B, Oehlke J. Structural requirements for cellular uptake and antisense activity of peptide nucleic acids conjugated with various peptides. *Biochemistry* 2006; 45(50): 14944-14954.

- [74] Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(15): 8786-8791.
- [75] Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18(4): 410-440.
- [76] Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target* 2004; 12(9): 635-641.
- [77] Saar K, Lindgren M, Hansen M, Eiriksdottir E, Jiang Y, Rosenthal-Aizman K et al. Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study. *Anal Biochem* 2005; 345(1): 55-65.
- [78] Patel MM, Goyal BR, Bhadada SV, Bhatt JS, Amin AF. Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs* 2009; 23(1): 35-58.
- [79] Tiwari SB, Amiji MM. A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr Drug Deliv* 2006; 3(2): 219-232.
- [80] Agarwal A, Lariya N, Saraogi G, Dubey N, Agrawal H, Agrawal GP. Nanoparticles as novel carrier for brain delivery: a review. *Curr Pharm Des* 2009; 15(8): 917-925.
- [81] Blasi P, Schoubben A, Giovagnoli S, Rossi C, Ricci M. Lipid nanoparticles for drug delivery to the brain: in vivo veritas. *J Biomed Nanotechnol* 2009; 5(4): 344-350.
- [82] Bartsch M, Weeke-Klimp AH, Meijer DK, Scherphof GL, Kamps JA. Cell-specific targeting of lipid-based carriers for ODN and DNA. *J Liposome Res* 2005; 15(1): 59-92.
- [83] De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 2008; 3(2): 133-149.
- [84] Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazu V et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Part Fibre Toxicol* 2010; 7(3): 2-25.
- [85] Bruchez M, Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998; 281(5385): 2013-2016.
- [86] Tian F, Prina-Mello A, Estrada G, Beyerle A, Möller W, Schulz H *et al.* A novel assay for the quantification of internalized nanoparticles in macrophages. *Nanotoxicology*. 2008; 2(4): 232-242.
- [87] Cui D, Tian F, Coyer SR, Wang J, Pan B, Gao F et al. Effects of antisense-myc-conjugated single-walled carbon nanotubes on HL-60 cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7(4): 1639-1646.
- [88] Czerniawska A. Experimental investigations on the penetration of  $^{198}\text{Au}$  from nasal mucous membrane into cerebrospinal fluid. *Acta Otolaryngol* 1970; 70(1): 58-61.
- [89] Cui D, Tian F, Kong Y, Ozkan C, Titushikin I, Gao H. Effects of single-walled carbon nanotubes on the polymerase chain reaction. *Nanotechnology*. 2004; 15(1): 154-157.
- [90] Ma J, Huifen W, Kong LB, Peng KW. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology*. 2003; 14(1): 619-623.
- [91] Shinkai M, Yanase M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: in vitro study. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87(11): 1179-1183.

- [92] Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 1990; 175(2): 489-493.
- [93] Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28(1): 1-13.
- [94] Olivier JC. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx* 2005; 2(1): 108-119.
- [95] Singh R, Lillard JW, Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 2009; 86(3): 215-223.
- [96] Win KY, Feng SS. In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials* 2006; 27(10): 2285-2291.
- [97] Krewson CE, Klarman ML, Saltzman WM. Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Res* 1995; 680(1): 196-206.
- [98] Pardridge WM. shRNA and siRNA delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(2): 141-152.
- [99] La SB, Okano T, Kataoka K. Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(beta-benzyl L-aspartate) block copolymer micelles. *J Pharm Sci* 1996; 85(1): 85-90.
- [100] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47(1): 65-81.
- [101] Kreuter J. Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *International Congress Series* 2005; 1277(1): 85-94.
- [102] Gelperina SE, Khalansky AS, Skidan IN, Smirnova ZS, Bobruskin AI, Severin SE et al. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. *Toxicol Lett* 2002; 126(2): 131-141.
- [103] Friese A, Seiller E, Quack G, Lorenz B, Kreuter J. Increase of the duration of the anticonvulsive activity of a novel NMDA receptor antagonist using poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles as a parenteral controlled release system. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 49(2): 103-109.
- [104] Alyautdin RN, Tezikov EB, Ramge P, Kharkevich DA, Begley DJ, Kreuter J. Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study. *J Microencapsul* 1998; 15(1): 67-74.
- [105] Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KP, Paramakrishnan N, Suresh B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res* 2008; 1200(1): 159-168.
- [106] Wang CX, Huang LS, Hou LB, Jiang L, Yan ZT, Wang YL, Chen ZL. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model. *Brain Res* 2009; 1261(19): 91-99.
- [107] Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(6): 454-477.
- [108] Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71(2): 161-172.

- [109] Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56(9): 1257-1272.
- [110] Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47(2): 165-196.
- [111] Olbrich C, Gessner A, Kayser O, Müller RH. Lipid-drug-conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazenediacetate. *J Drug Target* 2002; 10(5): 387-396.
- [112] Date AA, Joshi MD, Patravale VB. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(6): 505-521.
- [113] Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Li Y, Wu XY. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(6): 491-504.
- [114] Kuo YC, Su FL. Transport of stavudine, delavirdine, and saquinavir across the blood-brain barrier by polybutylcyanoacrylate, methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate, and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2007; 340(1): 143-152.
- [115] Fischer M, Vögtle F. Dendrimere: vom Design zur Anwendung – ein Fortschrittsbericht. *Angewandte Chemie* 1999; 111(7): 934-955.
- [116] D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(15): 2147-2162.
- [117] Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13(1): 238-252.
- [118] Lasic D. Liposomes: Synthetic lipid microspheres serve as multipurpose vehicles for the delivery of drugs, genetic material and cosmetics. *American Scientist* 1992; 80(1): 20-30.
- [119] Huang C. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 1969; 8(1): 344-352.
- [120] Merck KGaA Darmstadt, 2010.  
[www.merck.de](http://www.merck.de)
- [121] Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295(14): 765-770.
- [122] Lasic D. Sterisch stabilisierte Vesikel. *Angewandte Chemie* 1994; 106 (1): 1765-1779.
- [123] Müller RH, Hildebrand G.E. Liposomen in Arzneimitteln. *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*. 2.Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1998.
- [124] Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1151(2): 201-215.
- [125] Elorza B, Elorza MA, Sainz MC, Chantres JR. Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations. *J Microencapsul* 1993; 10(2): 237-248.
- [126] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., New York: Garland Science. 2007.
- [127] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990; 268(1): 235-237.
- [128] Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, Lee KC. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1061(1): 56-64.



- [129] New RRC. *Liposomes, a practical approach*. Oxford University Press, 1990.
- [130] Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem* 2010; 21(5): 797-802.
- [131] Orthmann A, Zeisig R, Koklic T, Sentjurc M, Wiesner B, Lemm M, Fichtner I. Impact of membrane properties on uptake and transcytosis of colloidal nanocarriers across an epithelial cell barrier model. *J Pharm Sci* 2010; 99(5): 2423-2433.
- [132] Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep* 2002; 22(2): 129-150.
- [133] Yokoyama M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J Artif Organs* 2005; 8(2): 77-84.
- [134] Arndt D, Zeisig R, Eue I, Sternberg B, Fichtner I. Antineoplastic activity of sterically stabilized alkylphosphocholine liposomes in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 43(3): 237-246.
- [135] Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MH, Toyka KV, Storm G, Gold R. Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126(8): 1895-1904.
- [136] Zeisig R, Röss A, Fichtner I, Walther W. Lipoplexes with alkylphospholipid as new helper lipid for efficient in vitro and in vivo gene transfer in tumor therapy. *Cancer Gene Ther* 2003; 10(4): 302-311.
- [137] Torchilin VP. Liposomes as targetable drug carriers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1985; 2(1): 65-115.
- [138] Nishimura M, Kuboi Y, Muramoto K, Kawano T, Imai T. Chemokines as novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173(1): 350-356.
- [139] Morse MA, Chapman R, Powderly J, Blackwell KL, Keler T, Green J et al. Phase I study utilizing a novel antigen-presenting cell-targeted vaccine with Toll-like receptor stimulation to induce immunity to self antigens in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; [Epub ahead of print].
- [140] Karan D, Dubey S, Van VP, Holzbeierlein JM, Tawfik O, Thrasher JB. Dual antigen target-based immunotherapy for prostate cancer eliminates the growth of established tumors in mice. *Immunotherapy* 2011; 3(6): 735-746.
- [141] Bendas G. Immunoliposomes: a promising approach to targeting cancer therapy. *BioDrugs* 2001; 15(4): 215-224.
- [142] Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Biosci Rep* 2002; 22(2): 251-266.
- [143] Merrimack® Pharmaceuticals, Cambridge, UK, 2011. [www.merrimackpharma.com](http://www.merrimackpharma.com)
- [144] Janssen AP, Schiffelers RM, ten Hagen TL, Koning GA, Schraa AJ, Kok RJ et al. Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Int J Pharm* 2003; 254(1): 55-58.
- [145] Lopez-Barcons LA, Polo D, Reig F, Fabra A. Pentapeptide YIGSR-mediated HT-1080 fibrosarcoma cells targeting of adriamycin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *J Biomed Mater Res A* 2004; 69(1): 155-163.
- [146] Dagar S, Krishnadas A, Rubinstein I, Blend MJ, Onyuksel H. VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies. *J Control Release* 2003; 91(1): 123-133.

- [147] Moreira JN, Hansen CB, Gaspar R, Allen TM. A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1514(2): 303-317.
- [148] Béliveau R, Demeule M, 2004. Patent-Nr. WO2004060403
- [149] Pardridge WM. Preparation of Trojan horse liposomes (THLs) for gene transfer across the blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Protoc* 2010; 2010(4): 5407-5422.
- [150] Ying X, Wen H, Yao HJ, Zhang Y, Tian W, Zhang L et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of dual-targeting daunorubicin liposomes in mice. *Pharmacology* 2011; 87(1): 105-114.
- [151] Howell BW, Herz J. The LDL receptor gene family: signaling functions during development. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(1): 74-81.
- [152] Zhang Y, Zhu C, Pardridge WM. Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Mol Ther* 2002; 6(1): 67-72.
- [153] Cerletti A, Drewe J, Fricker G, Eberle AN, Huwyler J. Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system. *J Drug Target* 2000; 8(6): 435-446.
- [154] Huwyler J, Wu D, Pardridge WM. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24): 14164-14169.
- [155] Markoutsas E, Pampalakis G, Niarakis A, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, Antimisiaris SG. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 77(2): 265-274.
- [156] Omori N, Maruyama K, Jin G, Li F, Wang SJ, Hamakawa Y et al. Targeting of post-ischemic cerebral endothelium in rat by liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferrin. *Neurol Res* 2003; 25(3): 275-279.
- [157] Suresh RJ, Venkateswarlu V, Koning GA. Radioprotective effect of transferrin targeted citicoline liposomes. *J Drug Target* 2006; 14(1): 13-19.
- [158] Tian W, Ying X, Du J, Guo J, Men Y, Zhang Y et al. Enhanced efficacy of functionalized epirubicin liposomes in treating brain glioma-bearing rats. *Eur J Pharm Sci* 2010; 41(2): 232-243.
- [159] Visser CC, Stevanovic S, Voorwinden LH, van BL, Gaillard PJ, Danhof M et al. Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier in vitro. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25(2): 299-305.
- [160] Ko YT, Bhattacharya R, Bickel U. Liposome encapsulated polyethylenimine/ ODN polyplexes for brain targeting. *J Control Release* 2009; 133(3): 230-237.
- [161] Chen H, Tang L, Qin Y, Yin Y, Tang J, Tang W et al. Lactoferrin-modified procationic liposomes as a novel drug carrier for brain delivery. *Eur J Pharm Sci* 2010; 40(2): 94-102.
- [162] McNeeley KM, Annapragada A, Bellamkonda RV. Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma. *Nanotechnology*. 2007; 18(1): 101-112.
- [163] McNeeley KM, Karathanasis E, Annapragada AV, Bellamkonda RV. Masking and triggered unmasking of targeting ligands on nanocarriers to improve drug delivery to brain tumors. *Biomaterials* 2009; 30(23): 3986-3995.
- [164] Migliore MM, Vyas TK, Campbell RB, Amiji MM, Waszczak BL. Brain delivery of proteins by the intranasal route of administration: a comparison of cationic liposomes versus aqueous solution formulations. *J Pharm Sci* 2010; 99(4): 1745-1761.

- [165] Thöle M, Nobmann S, Huwyler J, Bartmann A, Fricker G. Uptake of cationized albumin coupled liposomes by cultured porcine brain microvessel endothelial cells and intact brain capillaries. *J Drug Target* 2002; 10(4): 337-344.
- [166] Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Han XJ, Fujimura A et al. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials* 2009; 30(9): 1746-1755.
- [167] Madhankumar AB, Slagle-Webb B, Wang X, Yang QX, Antonetti DA, Miller PA et al. Efficacy of interleukin-13 receptor-targeted liposomal doxorubicin in the intracranial brain tumor model. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(3): 648-654.
- [168] Tamaru M, Akita H, Fujiwara T, Kajimoto K, Harashima H. Leptin-derived peptide, a targeting ligand for mouse brain-derived endothelial cells via macropinocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 587-592.
- [169] Zhang X, Xie J, Li S, Wang X, Hou X. The study on brain targeting of the amphotericin B liposomes. *J Drug Target* 2003; 11(2): 117-122.
- [170] Du J, Lu WL, Ying X, Liu Y, Du P, Tian W et al. Dual-targeting topotecan liposomes modified with tamoxifen and wheat germ agglutinin significantly improve drug transport across the blood-brain barrier and survival of brain tumor-bearing animals. *Mol Pharm* 2009; 6(3): 905-917.
- [171] Hartz AM, Bauer B, Fricker G, Miller DS. Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Mol Pharmacol* 2006; 69(2): 462-470.
- [172] Qin Y, Fan W, Chen H, Yao N, Tang W, Tang J et al. In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes. *J Drug Target* 2010; 18(7): 536-549.
- [173] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232(1): 34-47.
- [174] Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* 1988; 7(13): 4119-4127.
- [175] Raychowdhury R, Niles JL, McCluskey RT, Smith JA. Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science* 1989; 244(1): 1163-1165.
- [176] Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(19): 9252-9256.
- [177] Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ et al. Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 1996; 271(14): 8373-8380.
- [178] Strickland DK, Gonas SL, Argraves WS. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(2): 66-74.
- [179] Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J et al. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 1999; 97(6): 689-701.
- [180] Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 1999; 96(4): 507-515.

- [181] Nykjaer A, Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol* 2002; 12(6): 273-280.
- [182] Zhang C, An J, Strickland DK, Yepes M. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am J Pathol* 2009; 174(2): 586-594.
- [183] Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989; 341(1): 162-164.
- [184] Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 1990; 265(29): 17401-17404.
- [185] Andersen OM, Christensen PA, Christensen LL, Jacobsen C, Moestrup SK, Etzerodt M, Thogersen HC. Specific binding of alpha-macroglobulin to complement-type repeat CR4 of the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Biochemistry* 2000; 39(35): 10627-10633.
- [186] Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 2003; 112(10): 1533-1540.
- [187] Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1991; 266(31): 21232-21238.
- [188] Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 2004; 35(11): 2628-2631.
- [189] Gabathuler R, Arthur G, Kennard M, Chen Q, Tsai S. Development of a potential vector NeuroTrans to deliver drugs across the blood-brain barrier. *Int Cong Series* 2005; 1277(1): 171-184.
- [190] Kim DK, Seo MY, Lim SW, Kim S, Kim JW, Carroll BJ et al. Serum melanotransferrin, p97 as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25(1): 84-90.
- [191] Hasan MK, Mooney RP. The predisposing factors, biological markers, neuroimaging techniques and medical complications associated with Alzheimer's disease. *W V Med J* 2011; 107(3): 26-29.
- [192] Bertrand Y, Currie JC, Demeule M, Regina A, Che C, Abulrob A et al. Transport characteristics of a novel peptide platform for CNS therapeutics. *J Cell Mol Med* 2010; 14(12): 2827-2839.
- [193] Demeule M, Currie JC, Bertrand Y, Che C, Nguyen T, Regina A et al. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J Neurochem* 2008; 106(4): 1534-1544.
- [194] Thomas FC, Taskar K, Rudraraju V, Goda S, Thorsheim HR, Gaasch JA et al. Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-brain barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer. *Pharm Res* 2009; 26(11): 2486-2494.
- [195] Che C, Yang G, Thiot C, Lacoste MC, Currie JC, Demeule M et al. New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *J Med Chem* 2010; 53(7): 2814-2824.

- [196] Regina A, Demeule M, Che C, Lavallee I, Poirier J, Gabathuler R et al. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol* 2008; 155(2): 185-197.
- [197] Johnson T, Quibell M, Sheppard RC. N,O-bisFmoc derivatives of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-amino acids: useful intermediates in peptide synthesis. *J Pept Sci* 1995; 1(1): 11-25.
- [198] Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Suss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(10): 1633-1640.
- [199] Gantert M, Lewrick F, Adrian JE, Rossler J, Steenpass T, Schubert R, Peschka-Suss R. Receptor-specific targeting with liposomes in vitro based on sterol-PEG(1300) anchors. *Pharm Res* 2009; 26(3): 529-538.
- [200] Camag Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG & Co.GmbH Berlin. 2011. [www.camag.com](http://www.camag.com)
- [201] Zeisig R, Muller K, Maurer N, Arndt D, Fahr A. The composition-dependent presence of free (micellar) alkylphospholipid in liposomal formulations of octadecyl-1,1-dimethyl-piperidino-4-yl-phosphate affects its cytotoxic activity in vitro. *J Membr Biol* 2001; 182(1): 61-69.
- [202] Zeisig R, Arndt D, Stahn R, Fichtner I. Physical properties and pharmacological activity in vitro and in vivo of optimised liposomes prepared from a new cancerostatic alkylphospholipid. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1414(1): 238-248.
- [203] Manosroi A, Thathang K, Werner RG, Schubert R, Peschka-Suss R, Manosroi J. Development of highly stable and low toxic cationic liposomes for gene therapy. *Arzneimittelforschung* 2008; 58(10): 485-492.
- [204] Madgula VL, Avula B, Reddy VLN, Khan IA, Khan SI. Transport of decursin and decursinol angelate across Caco-2 and MDR-MDCK cell monolayers: in vitro models for intestinal and blood-brain barrier permeability. *Planta Med* 2007; 73(4): 330-335.
- [205] Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD et al. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro* 2005; 19(3): 299-334.
- [206] Johnson JL, Ahmad A, Khan S, Wang YF, bu-Qare AW, Ayoub JE et al. Improved liquid chromatographic method for mitoxantrone quantification in mouse plasma and tissues to study the pharmacokinetics of a liposome entrapped mitoxantrone formulation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 799(1): 149-155.
- [207] Coune A. Liposomes as drug delivery system in the treatment of infectious diseases. Potential applications and clinical experience. *Infection* 1988; 16(3): 141-147.
- [208] Meunier F, Prentice HG, Ringden O. Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28(1): 83-91.
- [209] Pflanzner T, Janko MC, André-Dohmen B, Reuss S, Weggen S, Roebroek AJ et al. LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid-beta across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging* 2010; 12(1): Epub ahead of print.
- [210] Gubernator J, Chwastek G, Korycinska M, Stasiuk M, Gryniewicz G, Lewrick F et al. The encapsulation of idarubicin within liposomes using the novel EDTA ion gradient method ensures improved drug retention in vitro and in vivo. *J Control Release* 2010; 146(1): 68-75.
- [211] Ramsay E, Alnajim J, Anantha M, Zastre J, Yan H, Webb M et al. A novel liposomal irinotecan formulation with significant anti-tumour activity: use of the divalent cation ionophore A23187 and copper-containing liposomes to improve drug retention. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68(3): 607-617.

- [212] Zucker D, Barenholz Y. Optimization of vincristine-topotecan combination--paving the way for improved chemotherapy regimens by nanoliposomes. *J Control Release* 2010; 146(3): 326-333.
- [213] Bolotin EM, Cohen R, Bar LK, Emanuel N, Ninio S, Lasic DD et al. Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligandoliposomes. *J Liposome Research* 1994; 4(1): 455-479.
- [214] Lim HJ, Masin D, Madden TD, Bally MB. Influence of drug release characteristics on the therapeutic activity of liposomal mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281(1): 566-573
- [215] Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001; 21(1): 15-23.
- [216] Lillis AP, Greenlee MC, Mikhailenko I, Pizzo SV, Tenner AJ, Strickland DK, Bohlsso SS. Murine low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) is required for phagocytosis of targets bearing LRP ligands but is not required for C1q-triggered enhancement of phagocytosis. *J Immunol* 2008; 181(1): 364-373.
- [217] Bauer KH, Frömming KH, Führer C. *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie*. 7 ed. 2002.
- [218] Lindner LH, Hossann M, Vogeser M, Teichert N, Wachholz K, Eibl H et al. Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: active ingredient and mediator of drug release. *J Control Release* 2008; 125(2): 112-120.
- [219] Koklic T, Sentjurc M, Zeisig R. Interaction of alkylphospholipid liposomes with MT-3 breast cancer cells depends critically on cholesterol concentration. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(2): 2682-2689.
- [220] Farhood H, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanol- amine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235(2):289-295.
- [221] Smisterova J, Wagenaar A, Stuart MC, Polushkin E, ten BG, Hulst R et al. Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 47615-47622.
- [222] Zhao L, Feng SS. Effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within the lipid monolayer at the air-water interface. *J Colloid Interface Sci* 2006; 300(1): 314-326.
- [223] Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(8): 639-649.
- [224] von Wedel-Parlow M, Wolte P, Galla HJ. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 2009; 111(1):111-118.
- [225] Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv* 2007; 4(4): 297-305.
- [226] Calvagno MG, Celia C, Paolino D, Cosco D, Iannone M, Castelli F et al. Effects of lipid composition and preparation conditions on physical-chemical properties, technological parameters and in vitro biological activity of gemcitabine-loaded liposomes. *Curr Drug Deliv* 2007; 4(1): 89-101.
- [227] Zeisig R, Shimada K, Hirota S, Arndt D. Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1285(2): 237-245.

- [228] Blau S, Jubeh TT, Haupt SM, Rubinstein A. Drug targeting by surface cationization. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2000; 17(5): 425-465.
- [229] Jain S, Mishra V, Singh P, Dubey PK, Saraf DK, Vyas SP. RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting. *Int J Pharm* 2003; 261(1-2): 43-55.
- [230] Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B et al. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int J Cancer* 2003; 105(4): 561-567.
- [231] Baczynska D, Widerak K, Ugorski M, Langner M. Surface charge and the association of liposomes with colon carcinoma cells. *Z Naturforsch [C]* 2001; 56(9-10): 872-877.
- [232] Massing U, Kley JT, Gurtesch L, Fankhaenel S. A simple approach to DOTAP and its analogs bearing different fatty acids. *Chem Phys Lipids* 2000; 105(2): 189-191.
- [233] Regelin AE, Fankhaenel S, Gurtesch L, Prinz C, von KG, Massing U. Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1464(1): 151-164.
- [234] Liminga G, Nygren P, Larsson R. Microfluorometric evaluation of calcein acetoxymethyl ester as a probe for P-glycoprotein-mediated resistance: effects of cyclosporin A and its nonimmunosuppressive analogue SDZ PSC 833. *Exp Cell Res* 1994; 212(2): 291-296.
- [235] Huth US. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J Control Release* 2006; 110(3): 490-504.
- [236] Koklic T, Sentjurc M, Zeisig R. The influence of cholesterol and charge on the membrane domains of alkylphospholipid liposomes as studied by EPR. *J Liposome Res* 2002; 12(4): 335-352.
- [237] Poncet D, Boya P, Metivier D, Zamzami N, Kroemer G. Cytofluorometric quantitation of apoptosis-driven inner mitochondrial membrane permeabilization. *Apoptosis* 2003; 8(5): 521-530.
- [238] Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di LF. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 1999; 76(2): 725-734.
- [239] Cho MJ, Scieszka JF, Cramer CT, Thompson DP, Vidmar TJ. Neutrophil-mediated transport of liposomes across the Madin Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *Pharm Res* 1989; 6(1): 78-84.
- [240] Veronesi B. Characterization of the MDCK cell line for screening neurotoxicants. *Neurotoxicology* 1996; 17(2): 433-443.
- [241] Wegener J, Abrams D, Willenbrink W, Galla HJ, Janshoff A. Automated multi-well device to measure transepithelial electrical resistances under physiological conditions. *Biotechniques* 2004; 4(4): 596-597.
- [242] Boiardi A, Eoli M, Salmaggi A, Lamperti E, Botturi A, Broggi G et al. Systemic temozolomide combined with loco-regional mitoxantrone in treating recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2005; 75(2): 215-220.
- [243] Yemisci M, Bozdag S, Cetin M, Soylemezoglu F, Capan Y, Dalkara T, Vural I. Treatment of malignant gliomas with mitoxantrone-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres. *Neurosurgery* 2006; 59(6): 1296-1302.
- [244] Boiardi A, Eoli M, Salmaggi A, Lamperti E, Botturi A, Solari A et al. Local drug delivery in recurrent malignant gliomas. *Neurol Sci* 2005; 26(1): 37-39.

- [245] Fachinformation: Mitoxantron 10/20 mg, Konzentrat zur Herstellung einer Injektionslösung. Sandoz 2010.





## **IX. Anhang**

**Tabelle A: Liposomenzusammensetzung.**

Es wurden liposomale Formulierungen entsprechend der unten angegebenen Zusammensetzung durch Lipidfilm-Hydratations und Extrusionstechnik wie in Material und Methoden (3.1. Liposomenpräparation) beschrieben hergestellt.

Bezeichnung <sup>1</sup>		Basislipide		Rigidität <sup>2</sup>	Helferlipide	Ladung	sterische Stab. <sup>3</sup>	MSL <sup>4</sup>
Interne I.D.	Manuskript I.D.	PC <sub>i</sub> / PC <sub>s</sub> /DOPC	HePC/TPC	CH	DOPE/OPP/SM	DCP/DDAB/PA	P <sub>2</sub> -PE/P <sub>5</sub> -PE	
<b>A1</b>	<b>L1</b>	70 / - / -	-	30	-	10 / - / -	-	110
<b>A2</b>		- / 70 / -	-	30	-	10 / - / -	-	110
<b>A3</b>		- / - / 70	-	30	-	10 / - / -	-	100
<b>A4</b>		-	70 / -	30	-	10 / - / -	-	110
<b>A5</b>		40 / - / 30	-	30	-	10 / - / -	-	110
<b>B1</b>		70 / - / -	-	30	-	-	-	100
<b>B2</b>		70 / - / -	-	30	-	- / - / 10	-	110
<b>B3</b>	<b>L2</b>	70 / - / -	-	30	-	- / 10 / -	-	110
<b>C1</b>	<b>L3</b>	40 / - / -	-	30	30 / - / -	10 / - / -	-	110
<b>C2</b>		70 / - / -	-	30	20 / - / -	10 / - / -	-	130
<b>C3</b>		70 / - / -	-	30	- / - / 20	10 / - / -	-	130
<b>D1</b>		100 / - / -	-	-	-	10 / - / -	-	110
<b>D2</b>		90 / - / -	-	10	10 / -	-	-	110
<b>D3</b>		80 / - / -	-	20	10 / -	-	-	110
<b>E1</b>		70 / - / -	- / 20	20	-	10 / - / -	-	120
<b>E2</b>	<b>L4</b>	50 / - / -	-	20	20 / 20	10 / - / -	-	120
<b>E3</b>		70 / - / -	-	20	- / 20	10 / - / -	-	120
<b>E4</b>		-	-	50	- / 50	10 / - / -	-	110

Bezeichnung <sup>1</sup>		Basislipide		Rigidität <sup>2</sup>	Helferlipide	Ladung	sterische Stab. <sup>3</sup>	MSL <sup>4</sup>
Interne I.D.	Manuskript I.D.	PC <sub>L</sub> / PC <sub>S</sub> /DOPC	HePC/TPC	CH	DOPE/OPP/SM	DCP/DDAB/PA	P <sub>2</sub> -PE/P <sub>5</sub> -PE	
F2		70 / - / -	-	30	-	10 / - / -	- / 5	115
F3		40 / - / -	-	30	30 / -	10 / - / -	5 / -	115
F4		- / 50 / -	-	20	20 / 20	10 / - / -	5 / -	125
H1		- / 40 / -	-	30	30 / -	10 / - / -	-	110
H2		- / 40 / -	-	20	30 / -	10 / - / -	-	100
H3		- / 40 / -	-	20	30 / 20	10 / - / -	-	120
H4		40 / - / -	-	20	30 / -	10 / - / -	-	100

**1:** Interne Bezeichnung und Bezeichnung, die im Manuskript verwendet wurde;

**2:** Komponenten zur Veränderung der Membranrigidität;

**3:** Komponenten zur sterischen Stabilisierung;

**4:** Molare Summe der eingesetzten Lipide.

**Abkürzungen:** PC<sub>L</sub>: Phosphatidylcholin (Lipoid, Deutschland); PC<sub>S</sub>: Phosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, Deutschland); DOPC: 1,2-Dioleoylphosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, Deutschland); CH: Cholesterol (Serva, Deutschland); TPC: Tetradecylphosphatidylcholin (ASTA Medica, Deutschland); OPP: 4-((Hydroxy(octadecyloxy)phosphinyl)oxy)-1,1-dimethylpiperidin-1-ium-4-yl-phosphat (ASTA Medica, Deutschland); DCP: Dicaprylphosphat (Serva, Germany); PA: Phosphatidicacid (Sigma-Aldrich, Deutschland); DDAB: Dimethyldioctadecylammoniumbromid (Sigma-Aldrich, Deutschland); DOPE: 1,2-Dioleoyl-s,n-glycero-3-phosphoethanolamin (Sigma-Aldrich, Deutschland); SM: Sphingomyelin (Sigma-Aldrich, Deutschland); P<sub>2</sub>-PE: Methyl-(polyethyleneglycol)<sub>2000</sub>-1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin (Lipomed, Schweiz); P<sub>5</sub>-PE: Methyl-(polyethyleneglycol)<sub>5000</sub>-1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphatidylethanolamin (Lipomed, Schweiz).

**Tabelle B: Physikochemische Eigenschaften der Liposomen und deren zelluläre Aufnahme.**

Die Liposomen wurden in der Zusammensetzung entsprechend **Tabelle A** hergestellt und ihr Gesamtlipidgehalt, die Größe und die Beladungskonzentration wie in Material und Methoden (3.2. Liposomencharakterisierung) beschrieben bestimmt. Des Weiteren sind die Ergebnisse der zellulären Aufnahmeexperimente aufgeführt.

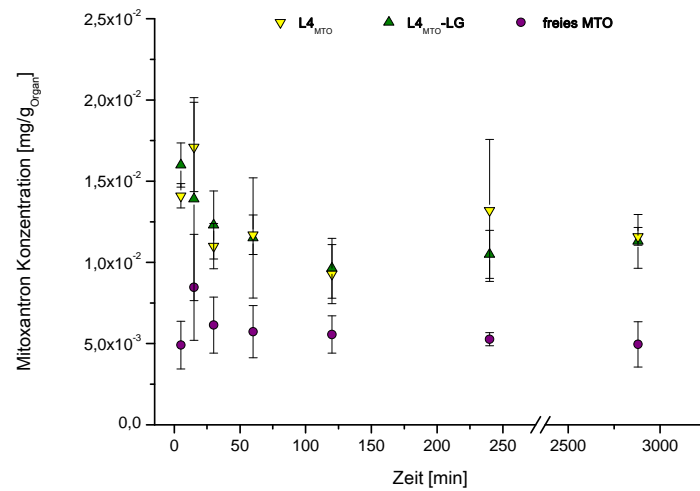
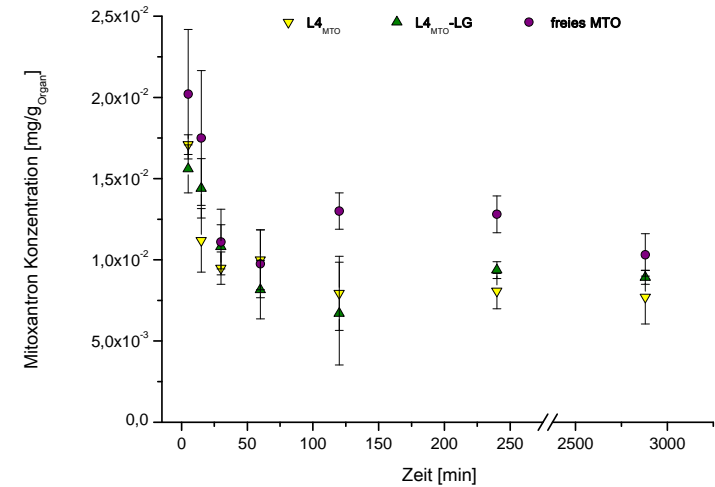
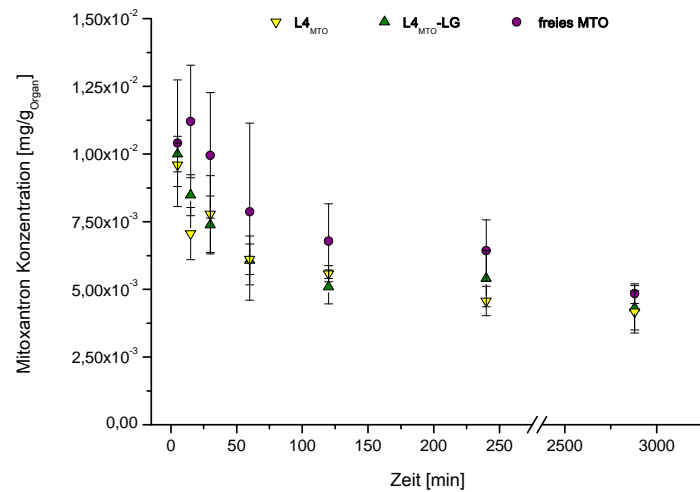
Bezeichnung <sup>1</sup>		TL <sup>2</sup>	Größe	PI <sup>3</sup>	Calceineinschluß <sup>4</sup>	Zelluläre Aufnahme <sup>5</sup>
		MW ± S.D.	MW ± S.D.	MW ± S.D.	Calcein	MW ± S.D.
Interne I.D.	Manuskript I.D.	[µmol/ml]	[nm]		[mmol/mol TL]	[nmol/well]
<b>A1</b>	<b>L1</b>	10.5 ± 1.0	128 ± 6	0.17 ± 0.11	98.4	0.028 ± 0.008
<b>A2</b>		5.0 ± 0.3	150 ± 34	0.54 ± 0.19	34.0	0.070 ± 0.010
<b>A3</b>		5.6 ± 0.2	109 ± 5	0.15 ± 0.08	48.9	0.030 ± 0.003
<b>A4</b>		3.9 ± 0.1	166 ± 10	0.11 ± 0.06	42.9	0.060 ± 0.012
<b>A5</b>		5.7 ± 0.5	107 ± 4	0.20 ± 0.07	46.5	0.030 ± 0.003
<b>B1</b>		6.2 ± 0.1	123 ± 21	0.29 ± 0.16	29.1	0.031 ± 0.002
<b>B2</b>		5.1 ± 0.2	117 ± 9	0.22 ± 0.05	35.0	0.031 ± 0.000
<b>B3</b>	<b>L2</b>	7.0 ± 0.2	181 ± 1	0.25 ± 0.06	63.4	0.257 ± 0.003
<b>C1</b>	<b>L3</b>	8.6 ± 0.3	142 ± 1	0.16 ± 0.02	56.2	0.174 ± 0.016
<b>C2</b>		7.2 ± 0.2	110 ± 14	0.22 ± 0.17	40.7	0.068 ± 0.024
<b>C3</b>		7.3 ± 0.3	92 ± 7	0.26 ± 0.15	32.8	0.030 ± 0.005
<b>D1</b>		6.6 ± 0.1	133 ± 31	0.37 ± 0.14	28.9	0.031 ± 0.003
<b>D2</b>		4.6 ± 0.1	118 ± 24	0.22 ± 0.09	66.3	0.045 ± 0.001
<b>D3</b>		5.0 ± 0.1	110 ± 19	0.30 ± 0.10	49.8	0.050 ± 0.002
<b>E1</b>		4.3 ± 0.1	142 ± 7	0.19 ± 0.07	44.1	0.041 ± 0.002
<b>E2</b>	<b>L4</b>	12.4 ± 0.6	125 ± 2	0.22 ± 0.09	82.6	0.059 ± 0.014
<b>E3</b>		5.3 ± 0.2	108 ± 3	0.24 ± 0.05	37.8	0.034 ± 0.003
<b>E4</b>		3.0 ± 0.4	161 ± 41	0.50 ± 0.22	20.6	0.039 ± 0.001

Bezeichnung <sup>1</sup>		TL <sup>2</sup>	Größe	PI <sup>3</sup>	Calceineinschluß <sup>4</sup>	Zelluläre Aufnahme <sup>5</sup>
		MW ± S.D.	MW ± S.D.	MW ± S.D.	Calcein	MW ± S.D.
Interne I.D.	Manuskript I.D.	[µmol/ml]	[nm]		[mmol/mol TL]	[nmol/well]
<b>F2</b>		5.0 ± 0.2	108 ± 7	0.23 ± 0.10	27.1	0.027 ± 0.000
<b>F3</b>		4.2 ± 0.5	115 ± 9	0.24 ± 0.11	29.8	0.039 ± 0.002
<b>F4</b>		4.6 ± 0.7	126 ± 8	0.26 ± 0.10	47.0	0.041 ± 0.003
<b>H1</b>		3.2 ± 0.5	163 ± 26	0.17 ± 0.04	43.9	0.082 ± 0.026
<b>H2</b>		3.0 ± 0.4	151 ± 5	0.19 ± 0.06	46.9	0.064 ± 0.013
<b>H3</b>		4.0 ± 0.5	136 ± 3	0.35 ± 0.08	49.4	0.048 ± 0.029
<b>H4</b>		4.8 ± 0.7	137 ± 7	0.15 ± 0.01	58.5	0.115 ± 0.105

- 1: Interne Bezeichnung und Bezeichnung die im Manuskript verwendet wurde;  
2: Gesamtlipidkonzentration der einzelnen Formulierungen, angegeben ist der MW ± S.D.;  
3: Polydispersitätsindex der Größenverteilung, angegeben ist der MW ± S.D.;  
4: Eingeschlossene Calceinkonzentration, bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration;  
5: Ergebnisse der zelluläre Aufnahme des Fluoreszenzmarkers Calcein in MDCK Zellen, nach Korrektur der unspezifischen Aufnahmeraten. Angegeben sind die MW ± S.D.

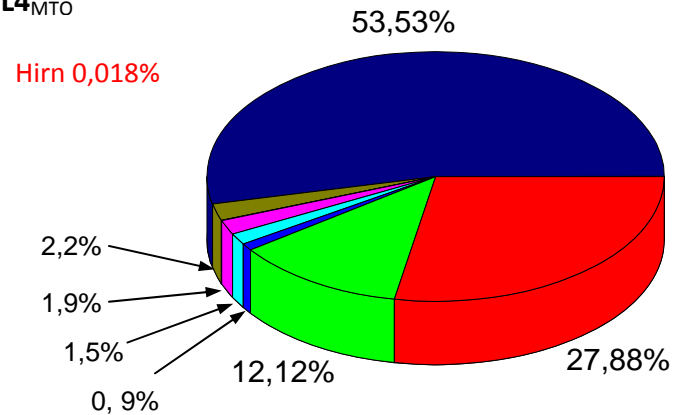
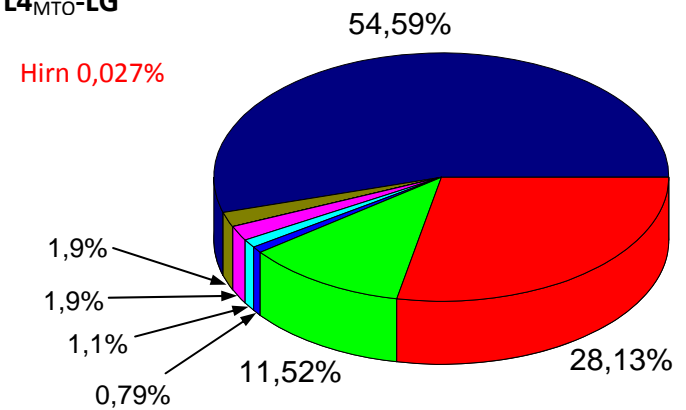
**Abbildung A: Zeitliche Verteilung von Mitoxantron nach i.v. Behandlung in der Nude-Maus.**

In den Diagrammen ist die Mitoxantron (MTO) Konzentration [ $\text{mg/g}_{\text{Organ}}$ ] über den Zeitraum von 3000 min. (48 h) in der Milz (1), der Lunge (2) und dem Herzen (3) nach der i.v. Behandlung mit den MTO haltigen Liposomen  $\text{L4}_{\text{MTO}}$ ,  $\text{L4}_{\text{MTO-LG}}$  und freiem MTO in einer Dosis von 5 mg/kg dargestellt. Die Organe wurden wie in Material und Methoden (3.13. Pharmakokinetische Studien) beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. für  $n=3$ .

**(1) Milz**

**(2) Lunge**

**(3) Herz**


**Abbildung B: Relative Verteilung von Mitoxantron nach i.v. Behandlung in der Nude-Maus.**

Die graphischen Darstellungen zeigen den Mitoxantron-Gehalt in [%] in ausgewählten Organen 15 min. nach der i.v. Behandlung mit den MTO haltigen Liposomen  $L4_{MTO}$  (1),  $L4_{MTO-LG}$  (2) und freiem MTO (3) in einer Dosis von 5 mg/kg.

**(1)  $L4_{MTO}$** **(2)  $L4_{MTO-LG}$** **(3) MTO**