

Aus dem Centrum für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Dendritische Polyglycerolsulfate in der Tumorchemotherapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patrick Würfel

aus Görlitz

Datum der Promotion: 11.12.2015

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	II
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	V
III.	Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit	VII
IV.	Zusammenfassung – Abstract.....	VIII
	IV.I. Zusammenfassung	VIII
	IV.II. Abstract.....	IX
1.	Einleitung	1
	1.1. Definition und Entstehung maligner Tumoren	1
	1.1.1. Definition maligner Tumoren.....	1
	1.1.2. Grundlagen der Pathogenese maligner Tumoren	1
	1.2. Behandlung von malignen Tumorerkrankungen.....	4
	1.2.1. Übersicht über die Therapieverfahren.....	4
	1.2.2. Zytostatika	5
	1.2.3. Pharmakologische Probleme von Zytostatika am Beispiel von Paclitaxel	7
	1.3. Drug-Targeting	9
	1.3.1. Begriffsbestimmungen	9
	1.3.2. Mechanismen und Beispiele für Drug-Targeting.....	9
	1.3.3. Anforderungen und Einschränkungen bei Drug-Targeting-Systemen	13
	1.4. Dendritisches Polyglycerolsulfat	15
	1.4.1. Einordnung und chemische Struktur von dPGS.....	15
	1.4.2. Synthese von dPGS	17
	1.4.3. Toxizität, Wirkung und Struktur-Wirkungs-Beziehungen von dPGS.....	18
	1.4.4. Administration, Verteilung und zelluläre Aufnahme	19
	1.4.5. Begründung zur Untersuchung von dPGS als Drug-Targeting-System	20
	1.5. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.....	21
2.	Material und Methoden.....	23
	2.1. Übersicht über genutzte Materialien	23
	2.1.1. Geräte.....	23
	2.1.2. Zellkulturmaterialien	24
	2.1.3. Zelllinien	25
	2.1.4. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	25
	2.1.5. Antikörper für die Immunhistochemie	27
	2.2. Untersuchte chemische Wirkstoffe und Konjugate.....	27
	2.3. Untersuchungen zur Wirksamkeit von dPGS <i>in vivo</i>	31
	2.3.1. Xenografttransplantation von A549-Zellen	31
	2.3.2. Immunhistochemische und histologische Färbungen der Tumorgewebe	32
	2.4. Allgemeine Zellkultur	34
	2.4.1. Allgemeine Zellkultur, Sub- und Dauerkultur	34

2.4.2. Zelllinien	36
2.5. Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	37
2.5.1. Definition von IC ₅₀	37
2.5.2. Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen <i>in vitro</i>	38
2.5.3. Überprüfung der dPGS-Zytostatika-Konjugate auf Zytotoxizität <i>in vitro</i>	39
2.6. Färbungen mit Toluidinblau und Alcianblau <i>in vitro</i>	42
2.6.1. Toluidinblaufärbung verschiedener dPGS-Varianten.....	42
2.6.2. Alcianblaufärbung unterschiedlich stark sulfatierter dPGS-Moleküle.....	42
2.7. Analyse ICC-markierter dPGS-Konjugate.....	43
2.7.1. Absorptionsanalyse	43
2.7.2. Fluoreszenzanalyse	43
2.8. Aufnahme und Elimination von dPGS-Konjugaten <i>in vitro</i>	44
2.8.1. Durchflusszytometrische Analysen zur Aufnahme von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGamin-PTX-ICC und dPGSamin-ICC	44
2.8.2. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von dPGSamin-PTX-(6)-ICC.....	44
2.8.3. Durchflusszytometrische Analyse der Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC.....	45
2.8.4. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von dPGSamin-DXR-(1).....	45
2.9. Nachweis des Wirkmechanismus von dPGSamin-PTX-(6).....	46
2.9.1. Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus	46
2.9.2. Beeinflussung der Tubulinverteilung durch PTX und dPGSamin-PTX-(6)	47
2.10. Statistische Methodik.....	47
3. Ergebnisse	49
3.1. Behandlung von Lungentumoren mit dPGS <i>in vivo</i>.....	49
3.1.1. Körpergewicht und Verhalten der Tiere	49
3.1.2. Veränderung der Tumorumfänge	50
3.1.3. Untersuchung der Proliferation, Apoptose und des NF-κB im Tumorgewebe	52
3.1.4. Toluidinblau- und Alcianblaufärbung	58
3.2. Untersuchungen der Zytotoxizität von dPGS-Konjugaten <i>in vitro</i>	62
3.2.1. Zytotoxizitätsscreening kovalenter dPGS-Zytostatika-Konjugate.....	62
3.2.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Zytotoxizität von PTX und dPGSamin-PTX-(6).....	66
3.2.3. Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) auf HUVEC-Zellen	68
3.2.4. Einfluss der Sulfatierung auf die Zytotoxizität von dPGSamin-PTX-(6).....	69
3.3. Färbungen mit Toluidinblau und Alcianblau <i>in vitro</i>	71
3.3.1. Toluidinblaufärbung nach Inkubation von dPGS-Konjugaten	71
3.3.2. Alcianblaufärbung unterschiedlich stark sulfatierter dPGS-Derivate.....	72
3.4. Analyse ICC-markierter dPGS-Konjugate.....	74
3.4.1. Einfluss der ICC-Konjugation auf die Zytotoxizität.....	74
3.4.2. Absorptionsanalyse	76
3.4.3. Fluoreszenzanalyse	78
3.5. Aufnahme und Elimination <i>in vitro</i>	80
3.5.1. Aufnahme von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC in A431-Zellen	80
3.5.2. Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC <i>in vitro</i>	84
3.5.3. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von dPGSamin-DXR-(1).....	85

3.6. Nachweis der Wirkmechanismen für PTX und dPGSamin-PTX-(6) <i>in vitro</i>	87
3.6.1. G ₂ /M-Arrest nach Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6)	87
3.6.2. Beeinflussung der Tubulinverteilung durch PTX und dPGSamin-PTX-(6)	89
4. Diskussion	92
4.1. Wirkung und Wirksamkeit von dPGS <i>in vivo</i>	92
4.1.1. Wirkung und Wirksamkeit von dPGS	92
4.1.2. Einfluss der dPGS-Behandlung auf Proliferation, Apoptose und NF-κB	95
4.1.3. Nachweis sulfatierter Moleküle mit Alcian- und Toluidinblau.....	97
4.1.4. Verteilung von dPGS innerhalb der Tumoren	98
4.2. Untersuchung der Zytotoxizität von dPGS-Konjugaten <i>in vitro</i>	99
4.2.1. Der MTT-Test und die Ermittlung der IC ₅₀ -Werte	100
4.2.2. Screening kovalenter dPGS-Zytostatika-Konjugate.....	100
4.2.3. Zytotoxizität von PTX und dPGSamin-PTX-(6).....	103
4.3. Analyse ICC-markierter Substanzen	105
4.4. Aufnahme und Elimination bei Zellen <i>in vitro</i>	107
4.4.1. Aufnahme von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC in A431-Zellen	107
4.4.2. Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC.....	109
4.5. Nachweis des Wirkmechanismus von PTX und dPGSamin-PTX-(6)	110
4.6. Freisetzung des PTX und Struktur des dPGSamin-PTX-(6)-Konjugates	111
4.7. Eignet sich dPGS als Drug-Targeting-System?	113
V. Literaturverzeichnis	116
VI. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	128
VI.I. Eidesstattliche Versicherung	128
VI.II. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen	129
VII. Lebenslauf	131
VIII. Publikationsliste	133
IX. Danksagung	134

II. Abkürzungsverzeichnis

A2780	Zelllinie eines humanen Ovarialzellkarzinoms
A431	Zelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms der Vulva
A549	Zelllinie eines humanen nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms
APC	adenomatous-polyposis-coli [Gen]
b.w.	Körpergewicht
C5a	aktivierte Komplementkomponente 5
CAB	Chlorambucil
CD	cluster of differentiation
Cy TM 3	Cyanine TM 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCC	deleted in colorectal carcinoma
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dPG	dendritisches Polyglycerol
dPGS	dendritisches Polyglycerolsulfat
dPGSamin	dendritisches Polyglycerolsulfat mit freien Aminogruppen
dPGSazid	dendritisches Polyglycerolsulfat mit freien Azidgruppen
DXR	Doxorubicin
EGF	epidermal growth factor
EPR	enhanced permeability and retention effect
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FGF2	basic fibroblast growth factor 2
FL2-A	FACS-Fluoreszenzkanal 2-Area
FL2-H	FACS-Fluoreszenzkanal 2-Height
FL2-W	FACS-Fluoreszenzkanal 2-Width
Foxn1	forkhead box protein N1
G ₁ /G ₂ -phase	Gap-1/Gap-2-Phase des Zellzyklus
G ₂ /M-Phase	Gap-2/Mitose-Phase des Zellzyklus
HCT-116	humane Kolonkarzinomzelllinie
HGF	hepatocyte growth factor
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
Hy(-)	ohne Hyaluronidasevorbehandlung [bei Alcianblaufärbung]
Hy(+)	Hyaluronidasevorbehandlung [bei Alcianblaufärbung]
IC ₅₀	halbmaximale Inhibierungskonzentration
ICC	Indocarbocyanin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Ki-67	Kiel-67 [Proliferationsmarker]
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L-Selektin	Selektin, auf Lymphozyten präsentiert
mAB	monoklonaler Antikörper
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

MTX	Methotrexat
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	nuclear factor-κB
NSCLC	non-small cell lung cancer
OATP 1B1/1B3	organic anion-transporting polypeptide 1B1/1B3
OD ₅₇₀₋₆₂₀	optische Dichte ($\lambda = 570 \text{ nm} - \lambda = 620 \text{ nm}$ als Referenzfilter)
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p53	Tumorprotein, 53kDa
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	platelet-derived growth factor
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	permeability-glycoprotein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
P-Selektin	Selektin, auf Thrombozyten und Endothelzellen präsentiert
PTX	Paclitaxel
QGP-1	Zelllinie eines humanen Pankreaskarzinoms (Somatostatinom)
R^2	Bestimmtheitsmaß
RB1-Gen	Retinoblastom-Gen 1
RES	retikuloendotheliales System
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
RTV	relatives Tumolvolumen
SK-Hep-1-Zellen	Zelllinie aus Aszites eines Leber-Adenokarzinompatienten
T/E	Trypsin/Ethylendiamintetraacetat
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TGF-β	transforming growth factor beta
TMM	tumorumgebendes Mikromilieu
TNF-α	tumour necrosis factor alpha
TNM	Tumor/Nodes/Metastase [Klassifizierungssystem maligner Tumoren]
Top2	Topoisomerase 2
TP53-Gen	Tumorprotein-53-Gen
U937	Zelllinie eines humanen histiozytischen Lymphoms
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
VEGF	vascular endothelial growth factor
VV_{ss}	Verteilungsvolumen im Steady-state-Bereich

III. Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit

Ergebnisse und Diskussionen dieser Arbeit sind bereits im nachfolgend genannten „peer-reviewed“ Journal veröffentlicht worden:

Sousa-Herves, A.†; **Würfel, P.†**; Wegner, N.; Khandare, J.; Licha, K.; Haag, R.; Welker, P.; Calderón, M.

„Dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery: pitfalls of ester linkage”.

Nanoscale, 2015 Feb 19;7(9):3923–32. DOI: 10.1039/c4nr04428b.

† **Beide Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.**

Ergebnisse und Diskussionen dieser Arbeit sind bereits auf den nachfolgend genannten Tagungen vorgestellt worden:

Würfel, P.; Welker, P.; Licha, K.; Mangoldt, D.; Serowka, F.; Schirner, M.

„Dendritisches Polyglycerolsulfat als Drug-Delivery-System in der Tumorchemotherapie“.

4. Berliner Posterkongress „Wissenschaftliches Arbeiten im Reformstudiengang Medizin“, 2013.

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Multifunctional dendritic polyglycerol as a novel platform for paclitaxel delivery”.

Vortrag durch Sousa Hervés, A.

VI. Mediterranean Organic Chemistry Meeting-REQOMED, 2013.

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Novel conjugates from multifunctional polyglycerol sulfate and paclitaxel”.

Poster von Sousa Hervés, A.

8th International Dendrimer Symposium, 2013.

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Multifunctional dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery”.

Poster von Sousa Hervés, A.

Xth SPLC-CRS Conference on Controlled Release, 2013.

IV. Zusammenfassung – Abstract

IV.I. Zusammenfassung

Zur Therapie maligner Tumoren werden Zytostatika, wie das Tubulin-bindende Paclitaxel (PTX), genutzt. Deren Anwendung wird jedoch durch Eigenschaften wie einer geringen Wasserlöslichkeit und der nicht tumorspezifischen Wirkungsweise eingeschränkt. Drug-Targeting-Systeme, beispielsweise synthetische Polymere, könnten die Administration vereinfachen und die Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe erhöhen. Ein chemisch variables Polymer ist dendritisches Polyglycerolsulfat (dPGS), welches mit Wirkstoffen (PTX) und Fluorochromen (Indocarbocyanin [ICC]) konjugiert werden kann. dPGS wurde *in vitro* als gut verträglich evaluiert und erfüllt Anforderungen an Drug-Targeting-Systeme.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob dPGS als potentielles Drug-Targeting-System genutzt werden kann.

Dazu wurde die Therapie von humanen Lungentumoren in der Maus mit dPGS ausgewertet und die Tumoren hinsichtlich der Proliferation und Apoptose immunhistochemisch untersucht. Anhand eines Screenings von 14 kovalenten dPGS-Zytostatika-Konjugaten wurde ein Konjugat (dPGS-PTX) ausgewählt und hinsichtlich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung *in vitro* untersucht (MTT-Test). Die Analyse der zellulären Aufnahme und Elimination von dPGS-PTX erfolgte durch Fluorochrom-Markierungen (dPGS-PTX-ICC). Ergänzend wurden Zellzyklusanalysen und immunhistochemische Darstellungen von Tubulin durchgeführt. Unsulfatiertes dendritisches Polyglycerol (dPG) wurde als Kontrollpolymer genutzt.

Die Behandlung der Tumoren mit $D = 30$ mg/kg Körpergewicht dPGS verminderte den Median der relativen Tumorumfänge und wies keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf. Die Proliferation in den Tumorgeweben wurde signifikant reduziert und die mediane Apoptose erhöht. Durch eine Alcianblaufärbung wurde dPGS histologisch in den tumorumgebenden Bindegeweben nachgewiesen. Das dPGS-PTX-Konjugat wies eine teilweise signifikant verminderte Zytotoxizität bei Tumorzellen und nicht-malignen Zellen auf. Während die Fluoreszenzzunahme von dPGS-PTX-ICC in den Tumorzellen linear erfolgte, führte die dPG-PTX-ICC-Inkubation erwartungsgemäß zu vergleichbar geringen Fluoreszenzen wie die Negativkontrollen. Dennoch zeigte dPG-PTX eine unerwartete zytotoxische Wirkung, die histologisch durch Tubulindarstellungen bestätigt wurde.

Die Beeinflussung der Tumorumfänge, der Nachweis von dPGS im tumorumgebenden Bindegewebe und die gute Verträglichkeit des dPGS deuten eine erfolgreiche Anwendung an. Mög-

licherweise sind die Sulfatgruppen für die Wirkung essentiell und führen zu einer Bindung von Wachstumsfaktoren. Die trotz fehlender Aufnahme des dPG-PTX-ICC-Konjugates nachgewiesene Wirkung des dPG-PTX ließ auf eine Freisetzung des PTX von dPG und dPGS schließen. Während dPGS pharmakologische Voraussetzungen für die Weiterentwicklung als Drug-Targeting-System erfüllte, stellte dPGS-PTX keine geeignete Verbindung zum Drug-Targeting dar.

IV.II. Abstract

Cytostatic drugs such as tubulin-binding drug paclitaxel (PTX) are used for chemotherapy. Their applicability is limited due to their low water-solubility and non-specific modes of action. It has been proposed that drug-targeting systems such as polymers may overcome these difficulties and may increase drug concentrations within the targeted tissues. A suitable synthetic polymer is dendritic polyglycerol sulfate (dPGS), as it can be functionalised with cytostatic drugs (e.g. PTX) and fluorochromes (indocarbocyanine dye [ICC]). dPGS has been proven to be non-toxic *in vitro* and meets general requirements of drug-targeting systems.

The present work examined whether dPGS represents a suitable drug-targeting system.

Using a mouse xenograft model, human lung tumours were treated with dPGS and tumour tissues were analysed immunohistochemically regarding proliferation and apoptosis. Based on a screening assay of 14 conjugates, dPGS-PTX was chosen as lead candidate. Its *in vitro* dose-response curve was determined in different cell lines and its cellular uptake and clearance kinetics were determined using dPGS-PTX-ICC. Additionally, cell cycle analysis and tubulin staining were performed. Non-sulfated dendritic polyglycerol (dPG) was used as control throughout the experiments.

Treatment of lung tumours with dPGS (30 mg/kg body weight) reduced the median of relative tumour volumes whilst not inducing toxic side effects. Analysis of tissues revealed that proliferation was significantly reduced and median apoptosis was increased. Using Alcian blue staining, dPGS was visualized in the tissues surrounding the tumours. The dPGS-PTX-conjugate exhibited a reduced cytotoxicity compared to PTX in both tumour and non-malignant cells. Intracellular fluorescence of tumour cells treated with dPGS-PTX-ICC increased linearly over time, whilst cells incubated with dPG-PTX-ICC exhibited fluorescence values comparable to those of untreated cells. The unexpected cytotoxic effect of dPG-PTX was confirmed via histological staining.

Due to its ability to influence lung tumour volumes, its accumulation in tissues surrounding tumours, and its lack of toxic side effects dPGS represents a promising drug-targeting candidate. It may be the presence of sulfate groups, which may be responsible for the observed *in vivo* tumour response. As possible mode of action, binding of growth factors is proposed, yet this warrants further investigation. Despite a minimal uptake of dPG-PTX-ICC in malignant cells, cytotoxicity was observed for dPG-PTX. This can be attributed to the release of PTX from dPG-PTX-conjugate.

While dPGS meets requirements for further development as drug-targeting system, its covalent conjugate with PTX, dPGS-PTX does not represent an applicable conjugate.

1. Einleitung

1.1. Definition und Entstehung maligner Tumoren

1.1.1. Definition maligner Tumoren

Maligne Tumoren sind Gewebe, die unabhängig von externen Wachstumssignalen proliferieren können und gegenüber wachstumshemmenden Einflüssen resistent sind [1]. Neben einer Apoptoseresistenz weisen sie die Fähigkeit zur Metastasierung und Angiogeneseinduktion auf [1, 2]. Weitere Kennzeichen sind eine genomische Instabilität, ein vom Normalgewebe abweichender Metabolismus, tumorunterstützende Entzündungsreaktionen und die Möglichkeit, der Immunreaktion zu entgehen [2]. Die Differenzierung maligner von benignen Tumoren, welche auch Eigenschaften maligner Tumoren aufweisen können [3], erfolgt durch das invasive Wachstum und die Metastasierung [3].

Histologisch stellt ein maligner Tumor ein heterogenes Gewebe dar, welches aus unterschiedlich differenzierten Tumorzellpopulationen und nicht-malignen Zellen besteht [1]. Der Tumor wird in seinem Wachstum und der Progression durch immunkompetente Zellen und Entzündungsreaktionen, assoziierte Fibroblasten, Endothelzellen und Perizyten beeinflusst [1, 2, 4].

1.1.2. Grundlagen der Pathogenese maligner Tumoren

Mutationen

Die Beeinflussung von Zellwachstum und -eigenschaften erfolgt durch Mutationen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder infolge pathologischer Abweichungen der Proteinbiosynthese. Maligne Tumoren entstehen durch Transformation aus einer einzelnen Zelle [5] nach Einfluss von physikalischen (ionisierende Strahlung), chemischen (polyzyklische Kohlenwasserstoffe) oder biologischen (Humane Papillomaviren) Mutagenen [6].

Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene

Proto-Onkogene, deren Genprodukte die Proliferation, den Zellzyklus und die Apoptose regulieren, können zu Onkogenen verändert werden [7]. Beispiele für Onkogene sind Gene für Wachstumsfaktoren und -rezeptoren bzw. Rezeptortyrosinkinasen, Transkriptionsfaktoren oder Apoptoseregulatoren [7, 8]. Die Aktivierung kann durch Mutation, Genamplifikation oder chromosomales Rearrangement erfolgen [7].

Tumorsuppressorgene, wie das *retinoblastoma-1-Gen (RB1-Gen)* oder *tumor-protein-53-Gen (TP53-Gen)* regulieren das Fortschreiten des Zellzyklus bzw. die Apoptose. Ein Funktionsverlust durch Deletion oder Rearrangement fördert die maligne Entartung [9].

Tumorentstehung und -progression

Die Entstehung von Tumoren ist ein mehrstufiger Prozess. In Abbildung 1 ist am Beispiel des kolorektalen Karzinoms dieser Prozess entsprechend dem Fearon-Vogelstein-Modell dargestellt (Darstellung des Modells nach [10], modifiziert nach [11]). Eine zunehmende Anzahl von Mutationen führt zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (*adenomatous-polyposis-coli-Gen* [*APC-Gen*]) oder zur Umwandlung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen. Die Entwicklung des Karzinoms verläuft über benigne Vorstufen (Adenome), wobei die alleinige Mutation eines Gens i. d. R. nicht ausreichend ist, die maligne Entartung auszulösen.

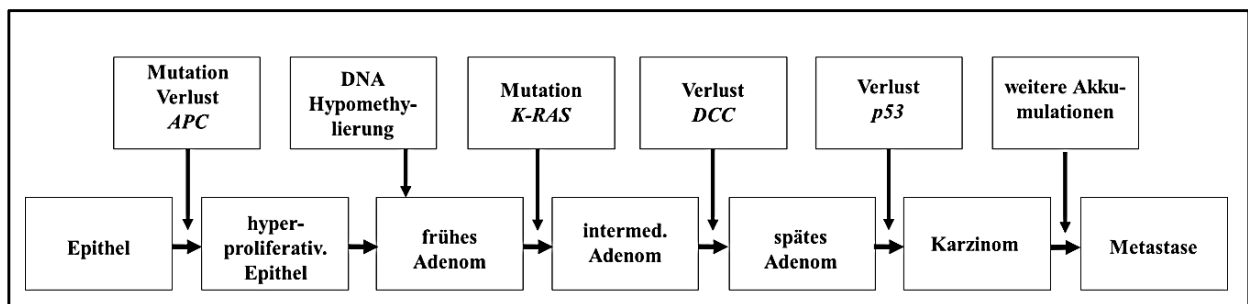


Abbildung 1

Übersicht über die Adenom-Karzinom-Sequenz nach dem Fearon-Vogelstein-Modell [10]. Die Entstehung des Karzinoms ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene an der Progression beteiligt sind. Dabei entwickelt sich das Epithel über Zwischenstufen (Adenome) zu einem Karzinom.

APC: adenomatous-polyposis-coli-Gen. *K-RAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog. *DCC*: "deleted in colorectal carcinoma". p53: Tumorprotein 53.

(Darstellung des Modells nach [10]; modifiziert nach [11])

Zur Metastasierung sind die Invasion/Intravasation, der Transit im Blut-/Lymphsystem sowie die Adhärenz, Extravasation und Kolonisation von malignen Zellen mit Bildung eines neuen Mikromilieus notwendig [12]. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Metastasierungsfähigkeit bereits frühzeitig vorhanden sein könnte [13-15] und frühe Metastasen möglicherweise abweichend vom Primärtumor auf eine Therapie ansprechen [16].

Inwiefern das Wachstum des Malignoms von einer größeren Subpopulation (stochastisches Evolutionsmodell nach Nowell [17]) oder von einer geringen Anzahl an Tumorstammzellen [18, 19] unterhalten wird, ist Gegenstand der Diskussion [20]. Trotz des Nachweises tumorstammzellähnlicher Zellen in verschiedenen humanen Tumoren [21-24] wird das Modell der Tumorstammzelle hinsichtlich der Nomenklatur [25], des Modells selbst und dessen Bedeutung kontrovers diskutiert [20, 25-27].

Die Progression eines malignen Tumors wird zusätzlich durch das tumorumgebende Mikromilieu (TMM) beeinflusst.

Das tumorumgebende Mikromilieu und Inflammationsprozesse

Maligne Zellen und das TMM stehen in komplexen Wechselwirkungen zueinander. Diese sind schematisiert in Abbildung 2 dargestellt (Darstellung des Modells nach [2], modifiziert).

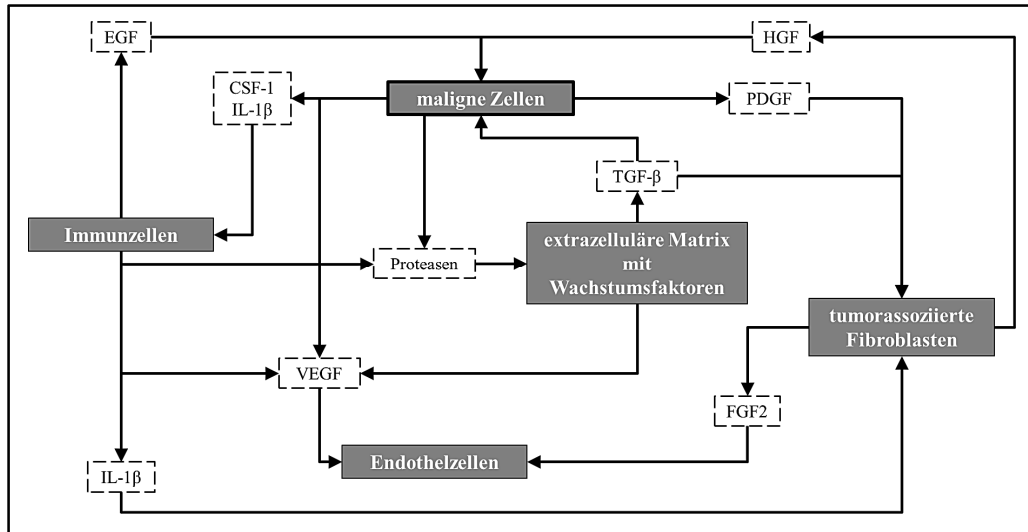


Abbildung 2

Darstellung der gegenseitigen Beeinflussung von tumorumgebendem Mikromilieu (Immunzellen, Endothelzellen, tumorassoziierte Fibroblasten, extrazelluläre Matrix) und malignen Zellen. Die Wechselwirkungen erfolgen durch Wachstumsfaktoren und Zytokine und können zur Förderung der malignen Zellen führen [2].

EGF: epidermal growth factor. HGF: hepatocyte growth factor. CSF-1: colony-stimulating factor 1. IL-1β: interleukin 1β. TGF-β: transforming growth factor β. VEGF: vascular endothelial growth factor. PDGF: platelet-derived growth factor. FGF2: fibroblast growth factor 2.

(Darstellung des Modells nach [2], modifiziert)

Das TMM wird durch Immunzellen, tumorassoziierte fibroblastische Zellen (Fibroblasten, Myofibroblasten), mesenchymale Stammzellen, Adipozyten, Endothelzellen und Perizyten gebildet [4]. Grundlage der Interaktionen zwischen Tumorzellen und TMM sind Wachstumsfaktoren (u. a. vascular endothelial growth factor [VEGF], epidermal growth factor [EGF], transforming growth factor β [TGF-β], hepatocyte growth factor [HGF]), Zytokine (u. a. interleukin 1β [IL-1β]) und Proteasen [2].

Die Immunzellen des TMM (u. a. Makrophagen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten) stellen einen Teil des tumorumgebenden Entzündungsprozesses dar [2]. Diese Inflammationsprozesse können die Progression durch Erlangung maligner Merkmale fördern [2]. Durch Zytokine und Chemokine, die in Tumorzellen oder bereits vorhandenen Entzündungsprozessen produziert werden, können weitere Immunzellen rekrutiert werden [28]. Diese fördern durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bspw. die Proliferation oder die epithelial-mesenchymale Transition [28]. Gleichzeitig wird durch Rückkopplung über Zytokine der Entzündungsprozess

unterhalten [28]. Die Bedeutung der einzelnen Zelltypen des TMM ist jedoch differenziert zu betrachten [4]. Makrophagen erzielen durch eine Chemokin- und Zytokinfreisetzung einen tumorhemmenden Effekt [29]. Sie können jedoch auch die Angiogenese fördern [30, 31] und zu der Invasion beitragen [32, 33].

Einer der Transkriptionsfaktoren, der sowohl an entzündlichen als auch malignen Prozessen entscheidend beteiligt ist, ist der nuclear factor- κ B (NF- κ B), der in einer komplexen Signalkaskade wirkt [34]. Dieser Transkriptionsfaktor stellt nach Karin eine „[...] Verbindung zwischen Entzündung und Krebs [...]“ dar (übersetzt aus dem Englischen, nach M. Karin in [34]). Das Zytokin tumor necrosis factor alpha (TNF- α) scheint dabei der entscheidende Aktivator des NF- κ B-abhängigen, anti-apoptotischen Signalweges zu sein [35]. Gleichzeitig kann die NF- κ B-Signalkaskade auch zur Metastasierung beitragen [36, 37]. Die Wirkung des NF- κ B ist dennoch differenziert zu betrachten, da signalwegabhängig auch pro-apoptotische Signale durch NF- κ B vermittelt werden können [38].

1.2. Behandlung von malignen Tumorerkrankungen

1.2.1. Übersicht über die Therapieverfahren

Bei der Behandlung von malignen Tumoren werden im Wesentlichen vier Therapieprinzipien angewandt: (I) die chirurgische Resektion, (II) die Strahlentherapie, (III) die pharmakologische Therapie sowie (IV) die supportive Therapie. Auf Letztere wird hier jedoch nicht eingegangen.

In Abhängigkeit von der Typisierung, dem Staging, dem Grading, der Klassifizierung (TNM-Klassifikation) bzw. dem Stadium (UICC-Stadium) sowie dem klinischen Status des Patienten wird eine kurative oder palliative Therapie angewandt.

Chirurgische Resektion

Durch kurativ-chirurgische Therapien sollen Tumoren in allen räumlichen Ebenen sowie im Lymphabflussgebiet im Gesunden reseziert werden (R_0 -Resektion) [39]. Die Mitentfernung der Lymphknoten im Abflussgebiet besitzt sowohl diagnostischen als auch therapeutischen Nutzen.

Strahlentherapie

Der therapeutische Effekt einer Strahlentherapie beruht auf der ionisierenden Wirkung von Strahlung auf Zellen und der Bildung von Radikalen des Wassers [40]. Die zur Wirkungsinduktion zu applizierende Dosis ist von der Strahlensensibilität und dem Oxygenierungszustand des Tumors sowie der Dosisverteilung abhängig [41]. Palliative Strahlentherapien sind z. B. bei Metastasen im Skelett- und im Zentralnervensystem anwendbar [40].

Pharmakologische Therapie

Eine pharmakologische Therapie kann mit Zytostatika, durch Hormontherapeutika, mittels Immuntherapie oder als „Targeted Therapy“ durchgeführt werden [42].

Zytostatika wirken klassenabhängig auf unterschiedliche Weise proliferationshemmend/zytotoxisch. Beispiele für Zytostatika-Klassen sind Taxane, Alkylantien, Antimetabolite oder Anthrazykline [42]. Zytostatika wirken unspezifisch auf alle proliferierenden Zellen und weisen eine nur geringe therapeutische Breite auf [42].

Im Vergleich dazu werden mit monoklonalen Antikörpern (z. B. Bevacizumab [VEGF-Antikörper]) und Tyrosinkinase-Inhibitoren (z. B. Sorafenib [VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor]) definierte Signaltransduktionen beeinflusst (Targeted Therapy) [42]. Diese Pharmaka sind entsprechend dem Wirkmechanismus hochspezifisch. Monoklonale Antikörper sind durch ihre Funktion jedoch auch Teil eines immunologischen Wirkprinzips [42]. Zur Immuntherapie zählen außerdem Interleukine zur T-Zell-Aktivierung, Vakzinierungen oder die Anwendung von Immuneffektoren (T-Zellen, Antikörper) [43].

Hormonsensitive Tumoren, wie das Mammakarzinom, können durch die Anwendung von Hormonantagonisten sowie die Hemmung der Sexualhormonsynthese behandelt werden [42].

Targeted Therapies, Immun- und Hormontherapien werden nur bei definierten Indikationen genutzt. Gegenstand pharmakologischer Therapien vieler maligner Tumoren sind die Zytostatika.

1.2.2. Zytostatika

Aus der Vielzahl der Zytostatika sollen nur die vier relevanten Wirkstoffe dargestellt werden.

Paclitaxel

Das Taxan Paclitaxel (PTX) wurde aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert [44]. Neben der ursprünglichen Extraktion sind auch teil- bzw. vollsynthetische Herstellungswege bekannt [45, 46].

Die zelluläre Aufnahme von PTX erfolgt durch unselektive Diffusion [47, 48] oder durch Transportproteine, wie dem organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) [48-50]. Die Administration von PTX muss intravenös erfolgen. Ursächlich dafür ist die sehr geringe Bioverfügbarkeit von PTX nach oraler Administration im Tierversuch [51], da möglicherweise ein transportervermittelter, zellauswärts gerichteter Transport bei intestinalen Zellen stattfindet [52].

Pharmakologisch wirken Taxane an den Mikrotubuli, welche aus α - und β -Tubulindimeren gebildet werden. Mikrotubuli fördern die zelluläre Stabilisierung von Zellorganellen, sind Leitstruktur für intrazellulären Transport und bilden die Mitosespindeln [53]. Für die physiologische

Funktion ist eine hohe Mikrotubulidynamik (Polymerisation und Depolymerisation) bedeutsam (Übersicht in [53]). PTX bindet vermutlich an verschiedenen Bereichen an β -Tubulin [54, 55]. Weitere Bindungsstellen für Taxoide sind auf α -Tubulin bekannt [56]. Durch diese Bindung an Tubulin erfolgt eine Stabilisierung der Mikrotubuli [57, 58], wodurch es zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase und einer Verminderung der kritischen Tubulinkonzentration kommt [57, 58]. Bereits sehr niedrige Konzentrationen von PTX führen durch die effektive Unterdrückung der notwendigen Mikrotubulidynamik zur Beeinflussung der Mitose [59]. Mitoseunabhängig, jedoch expressionsabhängig, kann PTX durch Induktion von p53 und p21 zu einem G₁/G₂-Arrest führen [60].

Klinisch wird PTX u. a. bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Ovarialkarzinomen und metastasierten Mammakarzinomen angewandt [61].

Chlorambucil

Das oral administrierbare Alkylanz Chlorambucil (CAB) wirkt zellzyklusphasenunabhängig [62]. CAB wird hepatisch zum aktiven Metaboliten Phenylelessigsäure-Stickstofflost metabolisiert [63], das, verglichen mit CAB, eine höhere Aktivität aufweist [64]. Die alkylierende Wirkung des CAB auf Phosphatgruppen der DNA/RNA, Purine und Pyrimidine sowie Aminogruppen kann zu kovalenten Verbindungen der Reaktionspartner führen [62]. Die Zytotoxizität wird u. a. durch die kovalente Verbindung von DNA-Anteilen erklärt [62].

Die Anwendung von CAB erfolgt u. a. bei der Chronisch lymphatischen Leukämie [62, 65]. Resistenzmechanismen wie die DNA-Reparatur [66] und unerwünschte Arzneimittelwirkungen ([UAW]; Myelosuppression, Hepatotoxizität, Lungenfibrose) schränken die Anwendung jedoch ein [62, 67, 68].

Methotrexat

Methotrexat (MTX) wird in die Gruppe der Antifolate eingeordnet [69]. Die antiproliferative Wirkung des MTX beruht auf der Inhibition des Enzyms Dihydrofolatreduktase (DHFR) [69]. Durch Reduktion der Tetrahydrofolatkonzentration sind die Nukleotid-Synthese beeinträchtigt und das Zellwachstum gehemmt [69].

Die Anwendung von MTX erfolgt u. a. bei Non-Hodgkin-Lymphomen oder Akuten lymphatischen Leukämien [69]. Resistenzmechanismen (Veränderungen der DHFR) und UAW (Mukositis, akutes Nierenversagen, Myelosuppression) beschränken den Einsatz [69].

Doxorubicin

Das Anthrazyklin Doxorubicin (DXR) wurde aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius var. caesius* isoliert [70]. Die antiproliferative Wirkung beruht auf der Interkalierung von DXR in die DNA und der Hemmung der Topoisomerase II (Top2) [71, 72]. DXR führt außerdem zur Produktion von freien Radikalen [73, 74].

Klinisch wird DXR bei einer Vielzahl maligner Tumoren angewendet (u. a. Ovarialkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom [NSCLC]) [71]. Bei höheren Dosierungen und in Abhängigkeit der kumulativen Dosis von DXR ist die kardiotoxische Wirkung zu beachten [75, 76]. Andere UAW sind die Myelosuppression sowie die Mukositis [71].

Resistenzen gegen DXR entstehen durch einen zellauswärts gerichteten Transport oder die Herunterregulation der Top2 [71].

1.2.3. Pharmakologische Probleme von Zytostatika am Beispiel von Paclitaxel

Trotz des vielfachen Einsatzes von Zytostatika wird die klinische Anwendung durch pharmakologisch-chemische Eigenschaften eingeschränkt. Am Beispiel von Paclitaxel soll dies dargestellt werden.

Administration

Bei PTX handelt es sich um einen niedermolekularen Wirkstoff ($M = 853$ Da) [77]. PTX weist aufgrund seiner Struktur eine nur geringe Wasserlöslichkeit ($c_{max} = 0,006$ mg/ml [78]) und eine sehr hohe Proteinbindung auf [79]. Pharmakologisch aktiv ist jedoch nur der ungebundene PTX-Anteil [80]. Durch die Proteinbindung können andere, ebenfalls proteingebundene Wirkstoffe, in ihrer Pharmakologie beeinflusst werden. Die durch die schlechte Wasserlöslichkeit bedingten Administrationsprobleme konnten auch durch Synthese wasserlöslicher PTX-Phosphate nicht verbessert werden, da diese eine nur mangelhafte *In-vivo*-Wirksamkeit aufwiesen [81]. PTX wird deshalb mithilfe des Lösungsvermittlers Cremophor® EL/Kolliphor® EL appliziert [82]. Dieser stellt ein 1:1-Gemisch aus polyethoxyliertem Rizinusöl und Ethanol dar [77] und bindet PTX in Mizellen [80]. Die Anwendung dieses Lösungsvermittlers führt jedoch zu einer großen Anzahl an UAW wie Hypersensitivitätsreaktionen (Dyspnoe, Hypotension, Erytheme) [82, 83], sodass Prämedikationen und Veränderungen der Administration bereits in frühen Studien erfolgen mussten [82, 84]. Ursächlich scheinen eine Histaminfreisetzung und die Komplementaktivierung durch Cremophor® EL zu sein [77, 85]. Auch eine periphere Neuropathie [86] sowie tonisch-klonische Anfälle [87] und Onycholyse [88]

werden mit dem Lösungsvermittler in Verbindung gebracht. Zusätzlich wird die klinische Routine durch die Inkompatibilität zu Polyvinylchlorid-Infusionssystemen erschwert [77].

Pharmakokinetik

Die α -Halbwertszeit von PTX beträgt nur $t_{1/2\alpha} \approx 0,3$ h [79]. Kurze α -Halbwertszeiten deuten auf eine schnelle initiale Verteilung des Wirkstoffes hin. PTX wird im Tierversuch unspezifisch in Leber, Lunge und Niere, jedoch kaum in das Gehirn oder die Hoden verteilt [51]. Im Steady-state-Zustand weist PTX ein hohes Verteilungsvolumen von $VV_{SS} = 55\text{--}182$ l/m² auf [79]. Vergleichsweise hohe Verteilungsvolumina entsprechen, unter der Annahme gleicher administrierter Pharmakomengen, niedrigen Plasmakonzentrationen. Dies kann auf eine Verteilung aus dem Blutkompartiment in periphere Kompartimente oder eine hohe Plasmaeiweißbindung hindeuten. Gleichzeitig liegt mit β -Halbwertszeiten von $t_{1/2\beta} = 1,3\text{h--}8,6$ h (mittlere HWZ $t_{1/2\beta} \approx 5$ h), abhängig vom Dosierungsschema, eine hohe Variabilität der Plasmaverweildauer vor [79].

Resistenz

Maligne Zellen können bei der Anwendung von Zytostatika Resistenzen erlangen. Es sind permeability-glycoprotein-Transporter (P-gp) bekannt, die durch einen zellauswärts gerichteten Transport bei verschiedenen Zelllinien eine Resistenz gegenüber PTX erzeugen [89-91]. Untersuchungen zur Hemmung dieses Effluxes erfolgten durch Inhibition des Transporters [92-94], durch Veränderung der Administrationsschemata [95] oder durch chemische Modifikation des PTX [96]. Die P-gp-Expression ist ein prognostischer Faktor für das klinische Outcome von Ovarialkarzinompatientinnen, wodurch dessen Bedeutung bei der Therapie deutlich wird [97]. Ein weiterer Taxan-Transporter ist das multidrug resistance protein 2 [98]. Neben Transportern kann auch das β -Tubulin Grundlage für entstehende Resistenzen sein. Mutationen der β -Tubulin-Sequenz können zur veränderten Interaktion zwischen PTX mit β -Tubulin führen [99, 100]. Veränderungen des α -Tubulins können ebenfalls zu einer Resistenzentwicklung beitragen [101].

Zelluläre Aufnahme und Wirkmechanismus

Wie zuvor dargestellt, wird PTX durch OATPs [49, 50] und als niedermolekularer, apolarer Wirkstoff durch unselektive, passive Diffusion in die Zellen aufgenommen [47, 48]. Eine selektive Aufnahme in Tumorzellen ist diffusionsbedingt nicht möglich.

Durch die unselektive Aufnahme und den, im Vergleich zu einer Targeted Therapy, unspezifischen Wirkmechanismus weist PTX keine tumorzellspezifische Wirkung auf. Dies führt zu z. T.

dosislimitierenden UAW wie Neutropenie, Mukositis, Neurotoxizität, Myalgien und Arthralgien, Alopezie oder Arrhythmien (Übersicht in [79]).

Zur Verbesserung der Administrationsschwierigkeiten, der unspezifischen Verteilung und der fehlenden Selektivität von Zytostatika wurden „Drug-Targeting-Mechanismen“ entwickelt.

1.3. Drug-Targeting

1.3.1. Begriffsbestimmungen

Unter dem Begriff „Drug-Targeting“ (Synonym: „Targeted-Drug-Delivery“ [102]) wird nach Torchilin die Fähigkeit einer Substanz verstanden, sich unabhängig vom Administrationsweg selektiv im Zielgewebe/-organ anzureichern [103]. Ziel des Drug-Targeting ist die Erhöhung der Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe bei gleichzeitiger Akkumulationsvermeidung in unspezifischem Gewebe [103]. Durch Drug-Targeting sollen die Administration von Wirkstoffen vereinfacht, die notwendige Wirkstoffmenge verringert, die Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe erhöht und die therapeutische Sicherheit verbessert werden [103].

Die Unterscheidung zwischen „aktivem Drug-Targeting“ (z. B. spezifische Ligand-Rezeptor-Interaktion) und „passivem Drug-Targeting“ (Akkumulation durch veränderte Blutgefäßeigenschaften) wird inhaltlich kritisch betrachtet [102] und in dieser Arbeit nicht genutzt. Anzumerken ist, dass Drug-Targeting nicht mit einer Targeted Therapy gleichzusetzen ist [102].

1.3.2. Mechanismen und Beispiele für Drug-Targeting

Mechanismen und Beeinflussung des Drug-Targeting

Drug-Targeting kann durch verschiedene Methoden erreicht werden [103]. Neben der direkten Applikation des Wirkstoffes in das Zielkompartiment kann Drug-Targeting auch durch die Akkumulation von Wirkstoffen infolge veränderter endothelialer Verhältnisse (maligne Tumoren), durch Nutzung physikalisch-chemischer Eigenschaften der Zielgewebe (pH-Wert, Temperatur), durch physikalische Eigenschaften des Trägers (magnetische Trägermoleküle) oder durch gezielte Interaktion zwischen dem Drug-Targeting-System und dem Zielgewebe (monoklonale Antikörper) ermöglicht werden [103].

Durch die rationale Synthese bzw. die Veränderung chemischer Eigenschaften der Drug-Targeting-Systeme ist eine gezielte Beeinflussung des Drug-Targeting möglich. Abbildung 3 stellt beispielhaft einige Variationen von Drug-Targeting-Systemen und deren Effekte dar (modifizierte Darstellung der Graphik nach [104]).

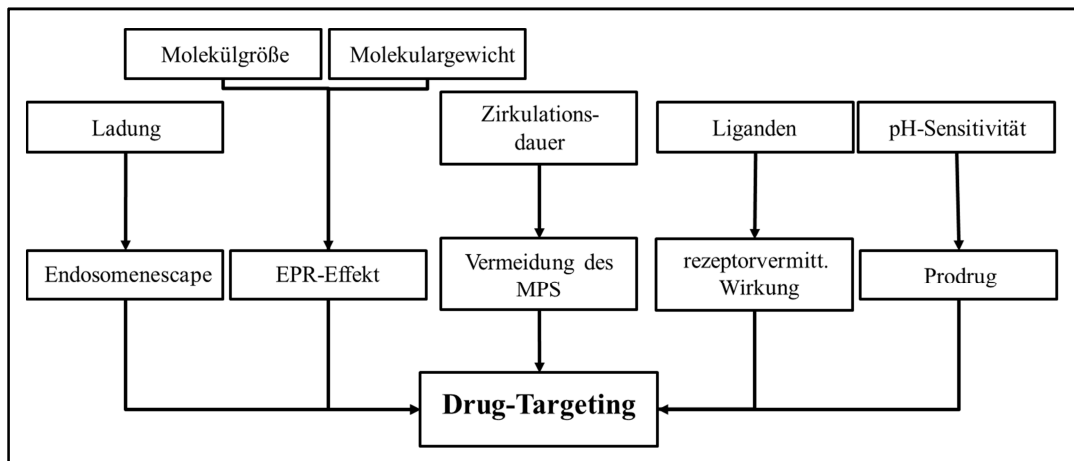


Abbildung 3

Überblick über Ansätze zur Beeinflussung des Drug-Targeting.

EPR: enhanced permeability and retention effect. MPS: mononukleäres Phagozyten-System.

(modifizierte Darstellung der Graphik nach [104])

Durch Veränderung chemischer Parameter wie Ladung, Molekulargewicht oder Zirkulationsdauer kann auf das Drug-Targeting Einfluss genommen werden. Beispielsweise ist ein intrazellulärer Endosomenescape von der Ladung abhängig [104, 105]. Geänderte Molekülgrößen und Molekulargewichte beeinflussen den enhanced permeability and retention effect (EPR-Effekt), wodurch dieser ausgenutzt werden kann [104, 106]. Auf diesen Effekt wird im folgenden Abschnitt eingegangen. Werden Träger so konzipiert, dass die Aufnahme des Systems durch das mononukleäre Phagozyten-System verhindert wird (= Elimination), oder werden gezielt tumorspezifische Liganden genutzt, kann das Drug-Targeting verbessert werden [104]. Auch die Nutzung spezifischer Tumormerkmale wie der erniedrigte pH-Wert kann durch pH-sensitive Träger bzw. Bindungen erreicht werden [104].

Diese Übersicht verdeutlicht, dass die erfolgreiche Anwendung eines Drug-Targeting-Systems von einer großen Parameteranzahl abhängig ist. Es ist aus diesem Grund sinnvoll, hoch variable Trägersysteme zu entwickeln.

Beispiele für Drug-Targeting-Mechanismen mit einem Schwerpunkt auf polymeren Konjugaten

Drug-Targeting-Systeme können auf der Anwendung von Makromolekülen (Plasmaproteine, Antikörper, synthetische Polymere), Liposomen, Mizellen oder auf einer Kombination der genannten Elemente beruhen.

Das erste Konzept zu pharmakologisch aktiven Polymeren geht auf H. Ringsdorf zurück [107]. Danach verbindet das Polymergerüst verschiedene Domänen mit unterschiedlichen Aufgaben: (1) Anteile zur Löslichkeitserhöhung, (2) den Wirkstoff sowie (3) spezifische Transportanteile [107]. Während der Lösungsvermittler je nach Anwendungsgebiet für Wasser oder Fette

generiert wird, ist auch die Transportdomäne spezifisch veränderbar (Molekulargewicht, Endgruppen → Resorptionserhöhung; Rezeptor-vermittelte Reaktion → Fixierung im Zielgewebe) [107]. Die Synthese der Polymer-Wirkstoff-Bindung darf den Wirkstoff nicht durch Konformationsänderungen in seiner Wirkung beeinflussen [107]. Es können auch sogenannte „Spacer“ eingebracht werden, die zur Distanzerhöhung zwischen Polymer und Wirkstoff beitragen und gleichzeitig zur Freisetzung genutzt werden können [107]. Für eine Wirkstoff-Polymer-Konjugation stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung: (1) die Reaktion des Linkers/Wirkstoffes mit bereits im Polymer vorhandenen funktionellen Gruppen, (2) die Synthese von Copolymeren mit Monomereinheiten, welche reaktive Seitenketten zur späteren Konjugation enthalten, oder (3) die Synthese von Polymeren aus Monomereinheiten, die den Linker/Wirkstoff als anhängige Ketten enthalten [108]. Als Verbindung zwischen Polymer und Wirkstoff (Linker) sind beispielsweise säurelabile, pH-abhängige Linker oder Peptidverbindungen nutzbar (für lysosomotrope Systeme) [108]. Der Wirkstoff kann jedoch auch direkt gebunden werden [107]. Häufige Bindungsarten in polymeren Konjugaten sind Ester, Amide, Carbonate oder Imine [108]. Abhängig vom genutzten Linker resultieren unterschiedliche Freisetzungsgeschwindigkeiten [108].

Das genutzte Polymergerüst kann linear, sternförmig oder dendritisch (griech. *δένδρον* – „*déndron*“: Baum [109]; i. d. S. baumartig) aufgebaut sein [110].

Pharmakologischer Hintergrund zur Anwendung von makromolekularen Polymeren ist häufig der EPR-Effekt [106]. Maligne Tumoren sind durch eine Hypervaskularisierung gekennzeichnet, in deren Blutgefäßen glatte Muskelzellschichten fehlen und die Angiotensin-II-vermittelte Vasokonstriktion mangelhaft ist [111]. Zusätzlich sind bei malignen Tumoren Fenestrierungen der Blutgefäße vorhanden [111]. Im Vergleich zum Normalgewebe besitzen Tumorgewebe außerdem ein nur mangelhaft entwickeltes lymphatisches System, wodurch die Elimination von Makromolekülen verlangsamt wird [106, 111]. Diese Eigenschaften führen zu der Anreicherung und Retention von Makromolekülen in Tumorgeweben [106, 111]. Zum Erreichen des EPR-Effektes wird ein Mindestmolekulargewicht von $M = 20$ kDa [110] bis $M = 40$ kDa [111] als Voraussetzung angesehen.

Aus der Vielfalt untersuchter Drug-Targeting-Polymere (vgl. dazu Übersichten [110, 112]) wird im Folgenden nur auf einige Beispiele eingegangen.

Als makromolekulares Trägersystem werden u. a. Serumproteine genutzt. Ein Beispiel stellt das Albumin-PTX (Abi-007; *Abraxane*®) dar, welches nicht auf Cremophor® EL als Lösungsvermittler angewiesen ist und klinisch bei verschiedenen malignen Tumoren erfolgreich evaluiert

wurde [113-116]. Durch die Bindung von PTX an Albumin verbessert sich im Tiermodell die intratumorale Anreicherung und Wirksamkeit im Vergleich zu der PTX-Cremophor-Kombination [117]. Albumin-PTX benötigt keine Prämedikation [115]. Gleichzeitig wird der therapeutische Index verbessert [116].

Ein Polymer, das auf der Kopplung von PTX und Poly-L-Glutaminsäure beruht (CT-2103, *Paclitaxel poliglumex*) [118], stellt ein Beispiel für Poly-Aminosäuren als Trägersysteme dar. Die Toxizitätsprofile verbesserten sich bei Anwendung von *Paclitaxel poliglumex* im Vergleich zur Standardbehandlung [119]. In einer Therapiestudie des NSCLC wurde jedoch kein signifikanter Überlebensvorteil der *Paclitaxel-poliglumex*-Gruppe nachgewiesen [119].

Auch das polyanionische Heparin wurde als Konjugatbasis beschrieben [120, 121]. Wang et al. stellten ein PTX-Trägersystem vor, das auf Heparin-PTX-Nanopartikeln beruht [122]. Andere Drug-Targeting-Konjugate mit Polysacchariden basieren auf Dextran oder Polyglucosamin [108].

Vielfach wurden auch lineare Polymere auf Basis von Polyethylenglycol (PEG) oder Copolymeren aus *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA) untersucht [112]. Beide letztgenannten Polymere sind jedoch nicht immer biologisch abbaubar [108], während Poly-Aminosäuren oder Polysaccharide potentiell abbaubar sind [108].

Zur Verbesserung der Stabilität oder Verteilung von Wirkstoffen können weiterhin liposomale und mizellare Formulierungen genutzt werden [103, 123]. Ein Beispiel für diese Gruppe ist das bereits klinisch untersuchte, liposomal formulierte Cisplatin, das ein verbessertes Toxizitätsprofil aufwies [124]. Vielfach werden Kombinationen verschiedener Systeme genutzt. Liposomen können bspw. mit Drug-Targeting-Komponenten kombiniert werden [125]. Das bereits erwähnte DXR wird in einer Formulierung mit *PEGylierten Liposomen (Caelyx®)* u. a. bei Mammakarzinomen angewandt und reduziert die Kardiotoxizität des Zytostatikums [126, 127]. Unter PEGylierung versteht man die Addition des Polymers PEG. Dadurch kann eine Reduktion der Plasmaproteinbindung erreicht und die Opsonierung und Elimination über das retikuloendotheliale System reduziert werden [123]. Durch PEGylierung kann damit eine Verlängerung des Zirkulationszeitraumes von Liposomen erreicht werden [128]. Für die PEGylierung sprechen die chemischen Eigenschaften des PEG, wie eine hohe Wasserlöslichkeit, und die geringe Toxizität [123].

Auch Antikörperkonjugate wurden als Ansatz für Drug-Targeting untersucht. Ein Beispiel für deren erfolgreiche *In-vitro*-Anwendung stellen mit EGF-Rezeptor-Antikörpern funktionalisierte

Liposomen dar, die einen insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor-Kinase-Inhibitor einschließen [125].

1.3.3. Anforderungen und Einschränkungen bei Drug-Targeting-Systemen

Anforderung an Drug-Targeting-Systeme

Für die erfolgreiche Anwendung von Drug-Targeting-Systemen sind verschiedene Voraussetzungen zu erfüllen.

Drug-Targeting-Systeme sollten keine Immunogenität aufweisen, nicht hämolytisch oder gerinnungsaktivierend wirken und biokompatibel sein [129]. Es ist eine neutrale oder negative Ladung notwendig, um eine Bindung an die luminaire Oberfläche von Blutgefäßen zu vermeiden (Heparansulfat) [129]. Auch die Löslichkeitserhöhung von Wirkstoffen gehört zu den Anforderungen an ein Drug-Targeting-System [111].

Bei der erwünschten Steigerung der Plasmahalbwertszeit, die u. a. vom Molekulargewicht abhängig ist, muss eine Freisetzung des aktiven Wirkstoffes vom Träger im Plasma vor Erreichen des Zielgewebes berücksichtigt werden [129]. Die in polymeren Drug-Targeting-Systemen vorhandenen Bindungen zwischen Träger und Wirkstoff sind für diesen Freisetzungsgrad und die -geschwindigkeit von hoher Bedeutung [108]. Das System muss zusätzlich *in vivo* abbaubar sein oder renal bzw. hepatisch/biliär eliminiert werden können [111].

Eine große Zahl an untersuchten Drug-Targeting-Systemen ist hochmolekular. In der Entwicklung sind die benötigten, minimal effektiven Dosen zu beachten, da sonst möglicherweise große Konjugatmengen verabreicht werden müssen, um diese zu erreichen [129].

Einschränkungen von Drug-Targeting-Mechanismen

Verschiedene Mechanismen führen zu einer Wirkungsverminderung hochmolekularer Pharmaka in Tumoren. Diese Mechanismen beziehen sich auf den pathohistologischen Aufbau und die sich ableitenden pathophysiologischen Folgen. Durch diese werden die Verteilung, die Freisetzung und die Retention der Pharmaka beeinflusst.

Während des Tumorwachstums liegen innerhalb der Tumoren unterschiedlich hohe Perfusionsraten und funktionelle Vaskularisationsinhomogenitäten vor [130]. Dies führt zu einer ungleichmäßigen Verteilung von Wirkstoffen. In einem Mammakarzinom-Modell wurden außerhalb der avaskulären Regionen, die in jedem größeren Tumor vorhanden sind, vergleichsweise geringe mittlere interkapilläre Abstände ($d \approx 50 \mu\text{m}$) gefunden, die denen im Normalgewebe gleichen [131]. Im Vergleich dazu wurden in bioptischen Messungen aus Zervixkarzinomen deutlich höhere Abstände ($d \approx 300 \mu\text{m}$) gemessen [132]. Die Vaskularisationsinhomogenitäten

und der interkapilläre Abstand sind wichtige Parameter für die Verteilung von Wirkstoffen (Diffusionsweg).

Maligne Tumoren weisen einen erhöhten interstitiellen Druck auf [133-135], der am Übergang zum Normalgewebe auf Normalniveau abfällt [136]. Die Folge dessen ist eine verminderte intratumorale Freisetzung von Molekülen. Gleichzeitig kommt es durch einen tumorauswärts gerichteten Flüssigkeitsstrom sowie den Blutabstrom zu einer Reduktion von bereits extravasal vorliegenden Molekülen [136]. Beide Mechanismen können zu einer Konzentrationsverminderung des Wirkstoffes führen.

Nach der Extravasation ist auch die Penetration des Wirkstoffes von Bedeutung. Dabei kann das Drug-Targeting-System durch Interaktionen mit der extrazellulären Matrix des Tumors beeinflusst werden [102]. Es können jedoch auch Wirkstoffe wie Zytostatika zur Veränderung der Penetration beitragen [137]. Am Beispiel von PTX wurde gezeigt, dass die Penetration und Akkumulation des direkt applizierten Wirkstoffes von der Dichte der Tumorzellen und der Wirkeffizienz abhängig ist [137]. Mit steigender Apoptose erhöhte sich die Penetration von PTX durch Reduktion der Epithelzellendichte und Störung der Gewebearchitektur [137]. Gleichzeitig wurde jedoch die Akkumulation vermindert [137]. Die Integrität des Tumorgewebes stellt damit einen Faktor der Penetration dar.

Die intratumorale Verteilung wird auch durch die chemischen Eigenschaften des Drug-Targeting-Systems beeinflusst. Anhand von Block-Copolymer-Mizellen wurde gezeigt, dass sowohl die Addition von Targeting-Komponenten als auch unterschiedliche Partikelgrößen Einfluss auf die intratumorale Penetration haben [138, 139]. Bereits eine geringe Veränderung der Größe untersuchter Nanopartikel kann – infolge einer beeinflussten Pharmakokinetik – zu einer veränderten Aufnahme in Tumoren führen [140].

Letzte Barriere in einem Drug-Targeting-Prozess ist die zelluläre Aufnahme. Akkumulierte Wirkstoffe müssen, sofern sie eine intrazelluläre Wirkung erzielen sollen, die Fähigkeit aufweisen, in die Zielzellen aufgenommen werden zu können. Die alleinige Retention eines Drug-Targeting-Systems ist nicht mit einer verbesserten Wirkung gleichzusetzen [141].

Pharmakokinetische Einschränkungen, die ein effektives Drug-Targeting im Organismus und im Tumor verhindern, führen zu der Notwendigkeit, chemisch flexible Systeme zu entwickeln, um auf die Einschränkungen mit Modifikationen des Drug-Targeting-Systems reagieren zu können. Gleichzeitig sollte das System einen potentiellen Drug-Targeting-Mechanismus für maligne Tumoren aufweisen und idealerweise unabhängig von der Gewinnung aus Organismen sein.

Aus diesen Gründen soll dendritisches Polyglycerolsulfat (dPGS) untersucht werden, welches die skizzierten Anforderungen an Drug-Targeting-Systeme erfüllt und im chemischen Aufbau sowie in der Funktionalisierung variiert werden kann.

1.4. Dendritisches Polyglycerolsulfat

Das makromolekulare, dendritische Polyglycerolsulfat [142], das ein sulfatiertes Derivat des dendritischen Polyglycerols (dPG) darstellt, wurde ursprünglich als Alternative zu Heparin entwickelt [143]. Neben den dPG- und dPGS-Molekülen sind auch Derivate mit anderen funktionellen Gruppen (Carboxylat-, Phosphat-, Amino-, Phosphonat-, Sulfonatgruppen) untersucht worden [143-145].

1.4.1. Einordnung und chemische Struktur von dPGS

dPGS ist Bestandteil einer Gruppe von synthetischen Polyglycerolen, die hinsichtlich der Anwendung als Therapeutika oder als Trägersysteme untersucht worden sind (vgl. Übersichten in [146, 147]). Polyglycerole können als Dendrone, Dendrimere, hochverzweigte Moleküle und Mikrogele synthetisiert werden [146]. Abbildung 4 stellt repräsentativ einige Strukturformeln jeder Untergruppe dar, die hinsichtlich der Größe, des Molekulargewichts und der Komplexität der Moleküle variieren (Abbildung aus [146]).

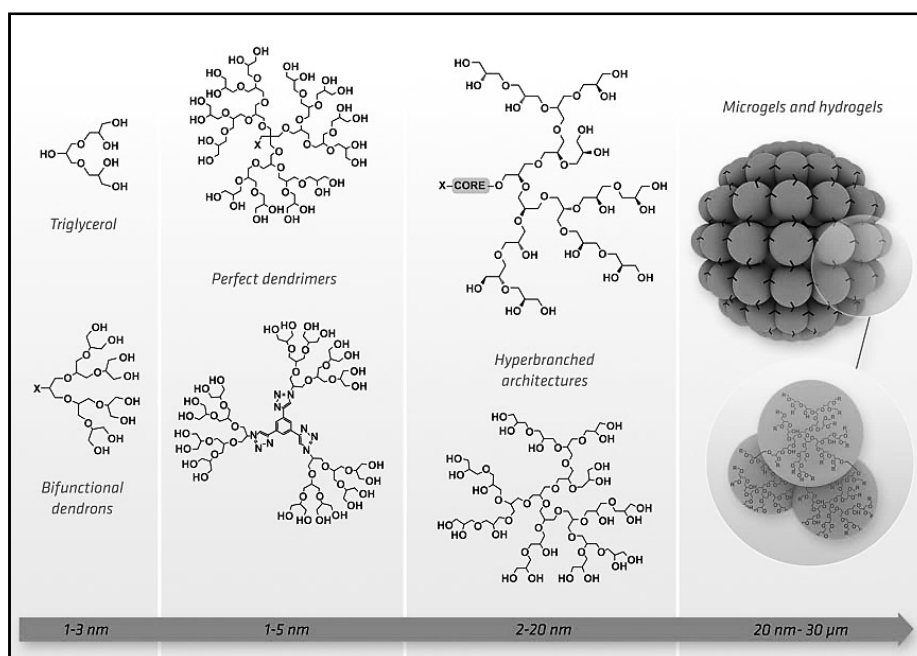


Abbildung 4

Übersicht über dendritische Polyglycerole vom Dendron bis zum Microgel. Die Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Größe und im Aufbau.

(Abbildung aus [146])

Das polysulfatierte dPGS stellt ein dreidimensionales, nichtlineares, dendritisch verzweigtes Polymer dar [143, 148] und wird in die Gruppe der hochverzweigten („hyperbranched“) Polyglycerole eingeordnet [146]. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des dPGS (modifizierte Abbildung aus [148], Beschriftung in Anlehnung an [149]).

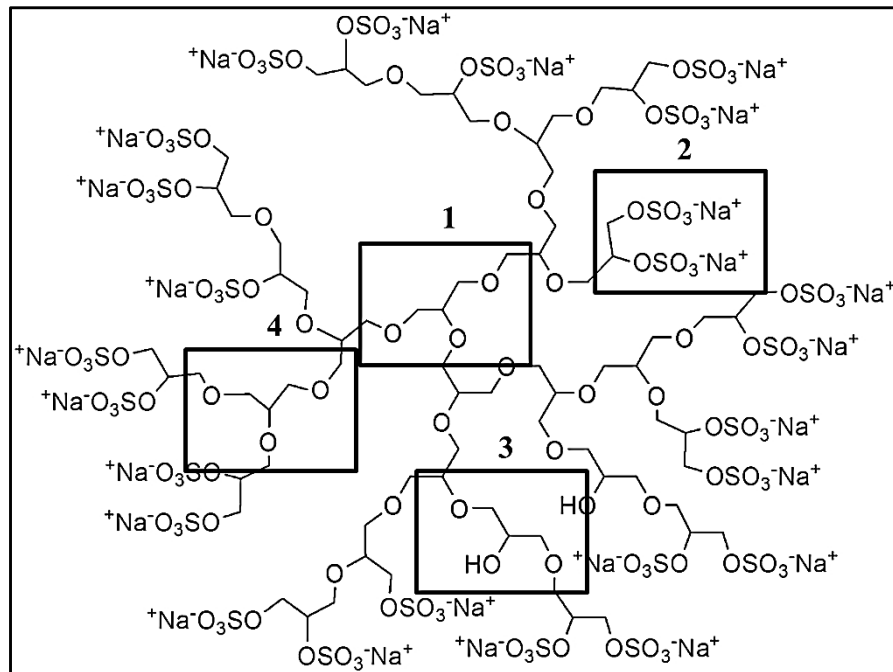


Abbildung 5

Schematisierte Darstellung eines dendritischen Polyglycerolsulfates (dPGS). Sichtbar ist der hohe Grad an anionischen Sulfatgruppen (R-OSO₃⁻). Kennzeichnung des (1) Kernes, (2) der terminalen, (3) linearen sowie der (4) dendritischen Einheiten. Die Darstellung enthält nur einen Ausschnitt der dreidimensionalen Struktur des Polymers.

(modifizierte Abbildung aus [148], Beschriftung in Anlehnung an [149]).

Ausgehend vom Kern des Moleküls erfolgt die dendritische Verzweigung. Die terminalen Einheiten enthalten bei dPGS Sulfatgruppen (R-OSO₃⁻) und neutrale Hydroxygruppen (R-OH) [143]. Sowohl das Molekulargewicht als auch die Menge der Sulfatgruppen können bei dPGS durch gezielte Synthese variiert werden [143, 150]. Weinhart et al. untersuchten dPGS-Derivate mit einem Gesamtmolekulargewicht von $M_{ges} \approx 4\text{--}1800$ kDa ($\approx 20\text{--}9800$ Sulfatgruppen) [150]. Durch Synthesevariationen ist auch die Herstellung von Polyglycerolen mit unterschiedlichen Verzweigungsgraden möglich [151].

In der vorliegenden Arbeit wurden im Grundaufbau identische dPGS-Derivate (dPGS, dPGSazid und dPGSamin) genutzt. Im Gegensatz zu dPGS besitzt dPGSamin auch eine geringe Anzahl an Aminogruppen bzw. dPGSazid Azidgruppen (i. d. R. 10–15 % aller Gruppen).

1.4.2. Synthese von dPGS

Die Herstellung von dPGS bzw. dPGS-Derivaten verläuft in Teilprozessen: der Synthese von dPG, der Sulfatierung von dPG zu dPGS und der optionalen Konjugation.

Zur Herstellung von dPG wird Glycidol und 1,1,1Tris(hydroxymethyl)propan als Initiator der Polymerisierungsreaktion benötigt [149]. Es werden auch andere Initiatoren verwendet [152]. Die Zugabe von Glycidol (Monomer) erfolgt langsam über mehrere Stunden, wodurch eine kontrollierte Polymerisation zu dPG stattfindet [149]. Das entstehende Polymerisationsprodukt (dPG) ist ein transparenter, hochvisköser Feststoff [149].

Durch Zugabe von SO_3 /Pyridin-Komplex in Dimethylformiat über $t = 4$ h bei $T = 60$ °C sowie weiteren Zwischenschritten kann dPG zu dPGS sulfatiert werden [143]. Es handelt sich um einen weiß-gelblichen Feststoff [143].

Fluorochrome, wie Indocarbocyanin (ICC), Indocyaningrün und Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoffe, können mit dPGS konjugiert werden [144, 152-155]. Das Fluorochrom ICC weist ein Anregungsmaximum bei $\lambda_{Ex} = 515/550$ nm und ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em} = 570$ nm auf [156]. Mit ICC können zytologische, histologische und durchflusszytometrische Untersuchungen zur Verteilung und Aufnahme von dPGS-Derivaten durchgeführt werden [144, 152, 155]. Zusätzlich sind Konjugate aus Wirkstoffen (PTX) mit dPGS beschrieben worden [155]¹. Zur Veranschaulichung der Konjugate ist in Abbildung 6 eine dPGSamin-PTX-ICC-Verbindung dargestellt (Abbildung der mivenion® GmbH, Berlin; modifiziert).

¹ Die genannte Veröffentlichung enthält Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

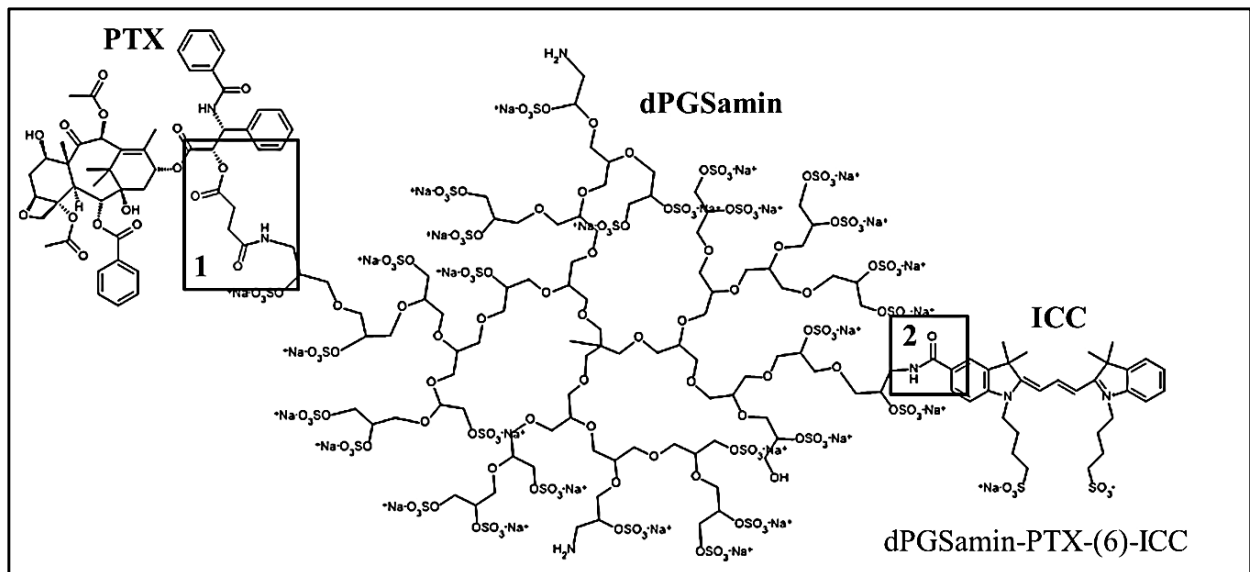


Abbildung 6

Schematisierte Darstellung von dendritischem Polyglycerolsulfat (dPGSamin), konjugiert mit dem Zytostatikum Paclitaxel (PTX) und dem Fluorochrom Indocarbocyanin (ICC) zu einem dPGSamin-PTX-(6)-Konjugat.

Die Darstellung enthält nur einen Ausschnitt der dreidimensionalen Struktur des dPGSamin. (Abbildung der mivenion® GmbH, Berlin; modifiziert)

Zentrum des dPGSamin-PTX-(6)-Konjugates ist dPGSamin, bei dem freie Aminogruppen Ansatzpunkte für Konjugationen sind. Zur Synthese dieses dPGSamin-PTX-(6)-ICC wird PTX-Succinat-*N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) und dPGSamin benötigt [155]. Durch Reaktion des NHS-Esters mit der freien Aminogruppe des dPGS entsteht eine Amidbindung. PTX ist durch eine Esterbindung an das Succinat gebunden [155]. Diese dPGS-PTX-Bindung ist in Abbildung 6 als Linker 1 gezeigt. Das Fluorochrom ICC ist ebenfalls mit einer Amidbindung an dPGS gebunden (Abbildung 6, Linker 2) [155]. Zwischen dem PTX und dem ICC besteht keine Verbindung.

Andere Wirkstoff-Konjugat-Verbindungen der untersuchten dPGS-Zytostatika-Konjugate erfolgten bspw. mit Iminothiolanen, Triazolen oder Propargylamiden.

Als polydisperses Polymer ist dPGS nicht durch ein einheitliches Molekulargewicht definiert. Für Polyglycerole wurden jedoch niedrige Polydispersitätsindizes gemessen [149, 155].

1.4.3. Toxizität, Wirkung und Struktur-Wirkungs-Beziehungen von dPGS

Toxizität

Sowohl dPGS als auch dPG erwiesen sich *in vitro* als gut biokompatibel [144, 155], wodurch die Anwendung von dPGS-Konjugaten in Tierversuchen ermöglicht wurde [148, 152, 154].

Antikoagulation und Hemmung der Komplementkaskade

Trotz des ursprünglichen Ansatzes, dPGS als synthetisches Heparinanalogue zur Gerinnungshemmung zu nutzen, wies dPGS im Vergleich zu unfraktioniertem Heparin eine verminderte gerinnungshemmende Wirksamkeit auf [143]. Verglichen mit unfraktioniertem Heparin inhibiert dPGS jedoch verstärkt sowohl die klassische als auch die alternative Komplementaktivierung [143]. Dervedde et al. zeigten, dass dPGS die Bildung des Komplementfaktors C5a *in vivo* hemmen kann, was möglicherweise auf eine Bindung von C5 zurückzuführen ist. Dadurch könnte die Proteolyse zum C5a unterbunden werden [148].

Bindung an Selektine

Das Polymer dPGS bindet an L- und P-Selektine ($IC_{50} = 30$ bzw. 90 nmol/l) und kann eine Leukozytenextravasation in Entzündungsgewebe *in vivo* vermindern [148]. dPGS stellt damit einen hochpotenten Entzündungsinhibitor dar [148]. Die Effizienz der L-Selektin-Inhibierung ist von der Größe des Kernes und dem Sulfatierungsgrad abhängig [150]. dPG zeigt, infolge fehlender Sulfatgruppen, keinen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf L-Selektin wie dPGS-Derivate [145]. Auch der Verzweigungsgrad von Polyglycerolsulfaten besitzt Einfluss auf das L-Selektin-Bindungsverhalten [151].

Bindung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren

dPGS weist vielfältige Bindungen an Zytokine, Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren auf. Die Bindung von transforming growth factor β (TGF- β ; $K_d = 4$ pmol/l), hepatocyte growth factor (HGF; $K_d = 6$ pmol/l) und VEGF ($K_d = 100$ nmol/l) erfolgt hochaffin [157]. Gebunden wird auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B [157, 158]. Die Konjugationen von dPGS mit PTX zu dPGSamin-PTX-(6) oder von dPGS mit ICC zu dPGS-ICC-Konjugaten führen zu keiner deutlichen Verminderung der L-Selektin-Inhibierung [152, 157], woraus der Erhalt der grundsätzlichen Bindungsfähigkeit geschlossen werden könnte. Keine Bindung erfolgt an granulocyte macrophage colony-stimulating factor oder EGF [157].

1.4.4. Administration, Verteilung und zelluläre Aufnahme

Als Administrationswege für dPGS-Derivate *in vivo* können sowohl subkutane als auch intravenöse Injektionen genutzt werden [152-154, 159]. Im Vergleich zu anderen dPG-Derivaten (dPG mit 100 % Aminogruppen) weist dPGS nur eine geringe Interaktion mit bovinem Serumalbumin auf [144]. Die Interaktion zwischen Polymer und Albumin kann ein wichtiger Faktor für die erfolgreiche und verträgliche Anwendung *in vivo* sein [144]. Über andere pharmakokinetische Parameter des dPGS *in vivo* (Verteilungsvolumen,

Eliminationshalbwertszeiten) ist bislang wenig bekannt. Eine Anreicherung von Fluorochrom-markiertem dPGS ist für Entzündungsgewebe bekannt [152, 154]. Die Aufnahme von dPGS-ICC erfolgt in die Kupffer-Zellen, in sinusoidale Endothelzellen der Leber und Milz sowie in Makrophagen der Marginalzone (Milz) [153]. Diese Aufnahme von dPGS-ICC in die Kupffer-Zellen wurde zusätzlich durch dPG³⁵S bestätigt, welches nicht durch Fluorochrom-Markierungen in seiner Struktur verändert wurde [160]. Analysen zeigen nach intravenöser Applikation von dPGS-ICC-Konjugaten außerdem Fluoreszenz in der Niere [153, 159]. Im Vergleich dazu weist das unsulfatierte dPG-ICC eine differente Verteilung auf [153].

In vitro wurde gezeigt, dass dPGS-Fluorochrom-Konjugate in Tumorzellen [144, 152, 153] und nicht-maligne Endothelzellen [153] aufgenommen werden. Der transmembranäre Transport von dPGS erfolgt durch die OATP1B1 bzw. OATP1B3-Transporter in das zytosolische Kompartiment [161]. Beide repräsentieren hepatozytäre Transporter, die eine Vielzahl an Substraten transportieren können (zusammengefasst in [162]). Gleichfalls können sie jedoch auch subgruppenabhängig bei verschiedenen Tumoren durch messenger-Ribonukleinsäure- oder Proteinexpression nachgewiesen werden [50, 163-166]. Die Aufnahme bei Makrophagen erfolgt vermutlich per Endozytose, sodass dPGS-Konjugate dann im endosomalen Kompartiment vorliegen [161]. Im Vergleich zu dPGS-Konjugaten werden dPG-Fluorochrom-Konjugate nur marginal in Lungentumorzellen aufgenommen [144], wodurch die Bedeutung der Sulfatgruppen für die biologische Wirkung des dPGS hervorgehoben wird [144].

1.4.5. Begründung zur Untersuchung von dPGS als Drug-Targeting-System

dPGS weist eine Anzahl an Eigenschaften auf, die eine erfolgreiche Anwendung als Drug-Targeting-System ermöglichen könnten:

- dPGS kann hinsichtlich chemischer Eigenschaften wie dem Molekulargewicht und der Sulfatierung verändert werden [143, 150].
- dPGS ist ein synthetisch herstellbares Polymer [143] und von der Gewinnung aus Organismen unabhängig.
- dPGS kann mit Wirkstoffen oder Farbstoffen konjugiert werden [144, 152-155].
- dPGS ist auch nach Konjugation mit Zytostatika (PTX) gut wasserlöslich [155].
- dPGS erwies sich *in vitro* als gut verträglich [144, 155] und dPGS-Konjugate wurden bereits *in vivo* angewandt [152-154].
- dPGS weist keine gerinnungsaktivierende Wirkung und verglichen mit unfraktioniertem Heparin eine geringere antikoagulatorische Wirksamkeit auf [143].
- dPGS-Fluorochrom-Konjugate werden in Tumorzellen aufgenommen [144, 152, 153].

- dPGS weist eine hohe anti-inflammatorische Wirkung auf [148] und reichert sich in Entzündungsgeweben an [152, 154]. Da maligne Tumoren und Inflammationsprozesse häufig eng miteinander verbunden sind [28], könnte ein Entzündungs-Targeting des dPGS auch bei malignen Tumoren genutzt werden [155].

1.5. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Bislang ist dPGS *in vivo* nicht hinsichtlich einer antiproliferativen Wirkung auf maligne Tumoren untersucht worden. Weiterhin sind Daten zur Pharmakokinetik von dPGS bezüglich der Akkumulation, Retention und Penetration bei malignen Tumoren im Tiermodell unbekannt. Auch *In-vitro*-Daten zu der zellulären Aufnahme, der Zytotoxizität und der Elimination kovalent gekoppelter dPGS-Zytostatika-Konjugate waren zu untersuchen. Bisher sind noch keine Optimierungen des dPGS in Bezug auf die Drug-Targeting-Eigenschaften bei Tumoren durchgeführt worden. Die vorliegende Arbeit wurde damit in der frühen Phase des Drug-Targeting-Designs, direkt nach der ersten rationalen Synthese, durchgeführt.

Ausgehend von den Einschränkungen der Zytostatika, den Anforderungen an Drug-Targeting-Systeme, den dargestellten Begründungen zur Untersuchung von dPGS sowie den fehlenden Erkenntnissen zur Anwendbarkeit von dPGS als Drug-Targeting-System, soll in dieser Arbeit die Fragestellung untersucht werden:

Ist dendritisches Polyglycerolsulfat potentiell geeignet, als Drug-Targeting-System für Zytostatika angewandt zu werden?

Zur Beantwortung dieser Frage sollen die folgenden Unterpunkte betrachtet werden:

- (I) Das Polymer dPGS soll an einem humanen Lungentumor in der Maus (Xenograft) hinsichtlich der Wirksamkeit und Verträglichkeit *in vivo* untersucht werden. Dazu sollen die Proliferation und Apoptose in den Tumoren quantifiziert werden. Es soll festgestellt werden, ob dPGS auf NF- κ B, einen wichtigen Transkriptionsfaktor der malignen Pathogenese, einen Einfluss ausübt.
- (II) Die Verteilung von dPGS im Tumorgewebe soll evaluiert werden. Dafür muss eine histologische Darstellungsmethode für unmarkiertes dPGS gefunden werden.
- (III) Aus einer Auswahl an kovalent gekoppelten dPGS-Zytostatika-Konjugaten soll ein Konjugat evaluiert werden, dessen *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-

Beziehung eine vergleichbare Wirksamkeit aufweist wie die freien Zytostatika PTX, CAB, MTX oder DXR.

- (IV) Für das gefundene Konjugat sollen auf ausgewählten Zelllinien detaillierte *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen erstellt werden.
- (V) Mithilfe von Fluorochrom-Markierungen soll das gefundene Konjugat hinsichtlich der zellulären Aufnahme und der Elimination an Zellen *in vitro* untersucht werden.
- (VI) Die Darstellung der Wirkmechanismen soll für das gefundene Konjugat im Vergleich zu Kontrollkonjugaten exemplarisch erfolgen.

Aus den Ergebnissen sollen Ableitungen für die mögliche Weiterentwicklung des dPGS-Drug-Delivery-Systems gezogen werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Übersicht über genutzte Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 1

Übersicht über genutzte Geräte und deren Hersteller.

Beschreibung	Bezeichnung	Hersteller bzw. Firma
Akkupipettierhilfe	Accupipex	Karl Hecht GmbH, Sondheim
Durchflusszytometer	FACS®Calibur™	BD Becton Dickinson® AG, Franklin Lakes, USA
Feinanalysenwaage	Feinanalysenwaage AW 22-4	Sartorius® AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Leica® DMLB und DMR mit HBO 50	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskopkamera I	RTKE spot	Diagnostic Instruments Inc., Sterlin Heights, MI, USA
Mikroskopkamera II	moticom2500	Motic® Electric Group Co. Ltd., Xiamen, China
Fluoreszenzreader	Lambda Fluoro 320 microplate reader	MWG Biotech® AG, Ebersberg
Inkubator	Labotect® Incubator C200	Labotect® Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf
Inversmikroskop	Leica® DMIL	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	LSM-5 Exciter, AxioImager M1	Carl Zeiss® MicroImaging GmbH, Jena
Kryomikrotom	Kryomikrotom CM1850	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar
Kühlzentrifuge	Kühlzentrifuge Typ 1707	Hettich®-Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Lichtmikroskop	Leitz® HMLUX 3	Leitz® GmbH, Wetzlar
Mikroplattenreader	anthos htII microplate reader	anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Multistep-Pipette	Ripette®	Ritter GmbH, Schwabmünchen
Paraffineinbettungsautomat	Histocentre 2	Shandon Labortechnik® GmbH, Frankfurt am Main
Paraffinmikrotom	Paraffinmikrotom R2125	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar
pH-Meter	pH-Meter MP220	Mettler-Toledo® GmbH, Gießen
Pipetten	Eppendorf Research®-Pipetten	Eppendorf® AG, Hamburg
Sicherheitswerkbank	SterilGARD® III Advance	The Baker Company, Sanford, USA
Spektrophotometer	Beckman® DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman® Instruments GmbH, München
Vortexer	press-to-mix 34524	Snijders Analysers B.V., Tilburg, NL

Wasserbad	Wasserbad, Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik® mbH, Burgwedel
Zellzählsystem	Casy® Cell Counting System, Modell TTC	Schärfe System, Reutlingen

2.1.2. Zellkulturmaterialien

Tabelle 2

Übersicht über genutzte Materialien der Zellkultur mit Artikelnummer und Bezugsquelle.

Bezeichnung	Artikelnr.	Bezugsquelle
Accutase	L11-007	PAA® Laboratories GmbH, Pasching, AT
bovine Albumin-Fraktion V	8076.2	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Casy®-Ton Lösung für Casy®-Systeme	43001	Innovatis® AG, Bielefeld
deionized Phosphate Buffered Saline	P04-36500	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach
Dulbecco's Modified Eagles Medium	P04-04500	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach
Einfrierbehälter Nalgene® Mr. Frosty™ Cryo Freezing Container	5100-0001	Nalgene® Labware by Thermo Fischer Scientific Inc., Roskilde, DK
EndoPrime Kit (HUVEC-Medium)	U050-042	PAA® Laboratories GmbH, Pasching, AT
Fetale Bovine Serum, from South America, COS: CEP 2002-167	3302-P102305	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach
L-Glutamin; 200 mM	P04-80100	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach
McCoy's 5A modifiziertes Flüssigmedium	F1015	Biochrom® AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin; 10.000 I.E. Penicillin/ml; 10 mg Streptomycin/ml	P06-07100	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach
Phorbol-12-myristat-13-acetat	524400	Calbiochem®-Merck4Biosciences, Merck® KGaA, Darmstadt
Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium	P04-17500	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach
steril water for cell culture	P04-991500	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat; 0,25 %/0,02 %; w/o Ca ²⁺ ; w/o Mg ²⁺	P10-020100	Pan-Biotech™ GmbH, Aidenbach

2.1.3. Zelllinien

Tabelle 3

Übersicht über Herkunft der genutzten Zelllinien.

Bezeichnung	Artikelnr.	Bezugsquelle
A2780	-	AG Kratz, Zentrum f. Tumorbiologie, Freiburg i. Brsg. AG Dervedde,
A431	-	Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin Zentralinstitut f. Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
A549	ACC107	DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig AG Grötzinger,
HCT-116	-	Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum Med. Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie
HUVEC	C-12200	PromoCell® GmbH, Heidelberg AG Grötzinger,
QGP-1	-	Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum Med. Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie
SK-Hep1	-	AG Grötzinger, Charité Berlin – Campus Virchow Klinikum Med. Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie AG Dervedde,
U937	-	Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin Zentralinstitut f. Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie

2.1.4. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 4

Übersicht über genutzte Chemikalien/Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen.

Bezeichnung	Artikelnr.	Bezugsquelle
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	CT01-5	Millipore®, Temecula, USA
(3-Aminopropyl)triethoxysilan	A3648	Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (Stocklösung; $\beta = 5\text{mg/ml}$)	6335.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aceton; $\geq 99,5\%$ zur Synthese	5025.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Alcianblau 8GS (C.I. 74240)	3082.2	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dako® Fluorescence Mounting Medium	S3023	Dako® A/S, Glostrup, DK
Deckgläser, rechteckig; 24x50 mm	1870.2	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Deckgläser, rund; 12 mm Durchmesser	P231.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dimethyl-Sulfoxide-Hybri® Max	D2650	Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, USA
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat; > 99 % p.a.	4984.2	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eosin-G-Lösung; 0,5 %; wässrig	X883.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol; ≥70 %; vergällt	T913.3	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol; ≥96 %; vergällt	T171.4	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol; ≥99,8 %; vergällt	K928.4	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Filterpapier MN615 (Macherey-Nagel)	L875.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerin; ≥99,5 % p.a.	3783.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Greiner® Bio One-Zellkultur Multiwell-Platten; 24 wells; steril	CE56.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Greiner® Bio One-Zellkultur Multiwell-Platten; 96 wells; steril	KL43.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Greiner® Bio One-Zellkulturflaschen mit Filter- Schraubverschluss; 75 cm ² ; steril	CE49.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hyaluronidase; testikulär	9980.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	9866.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat; > 99 % p.a.	3904.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	N069.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver; Blotting grade	T145.2	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Neo-Clear® Xylol-Ersatz	1.098.435.000	Merck® KGaA, Darmstadt
Objektträger SuperFrost® Plus (Menzel Gläser)	H867.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd	0335.2	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Propidium iodide solution ($\beta = 1\text{mg/ml}$ in water)	P4864	Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, USA
Ribonuclease A from bovine pancreas	R6513	Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, USA
Roti®-Histokitt II; synthetisches Einschlußmittel	T160.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo®-Spritzenfilter; 0,2 μm Porengröße; Polytetrafluorethylen-Membran	P815.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo®-Spritzenfilter; 0,22 μm Porengröße; Cellulosemischester-Membran	KH54.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure; $c = 1\text{ mol/l}$; Maßlösung	K025.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Standard-Objektträger, geschliffen 90°	H870.1	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TissueTek®	TTEK	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Toluidine blue O (C.I: 52040)	T0394	Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, USA
Triton® X-100	3051.3	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.1.5. Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 5

Übersicht über genutzte Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen.

Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Cleaved Caspase-3 (Asp 175) (5A1E) Rabbit mAb	9664S	Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Donkey Anti- Rabbit (IgG H + L)	711-165-152	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Donkey Anti- Mouse (IgG H + L)	715-165-151	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA
Monoclonal Anti- α -Tubulin; Clone B-5-1-2; produced in mouse ascites fluid; IgG ₁	T5168	Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, USA
Rabbit anti-human Ki-67 Antigen	A0047	Dako® A/S, Glostrup, Denmark
Rabbit Polyclonal anti-NF- κ B-p65	NB100-82083	Novus Biologicals® Ltd., Cambridge, UK

2.2. Untersuchte chemische Wirkstoffe und Konjugate

Die genutzten Substanzen sind vergleichend in Tabelle 6 dargestellt. Die Wirkstoffe PTX, CAB, MTX und DXR wurden käuflich erworben (Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals [HK] Ltd., Hongkong) und in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Aqua dest. gelöst und aliquotiert ($c = 1 \text{ mmol/l}$) bei $T = -20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Die Synthese von dPG, dPGS, deren Konjugaten sowie ICC-Markierungen erfolgte durch die mivenion® GmbH, Berlin. dPGS-Derivate wurden in Aqua dest. gelöst ($c = 1 \text{ mmol/l}$), aliquotiert und bei $T = -20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. ICC-markierte Substanzen wurden mit Trehalose lyophilisiert (P. Welker, mivenion® GmbH, Berlin) und lichtgeschützt bei $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Die Rücklösung der Substanzen erfolgte in Aqua dest. bzw. in DMSO. Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen ICC-markierter Substanzen wurden vermieden. Die Arbeit mit fluoreszenzmarkierten Substanzen sowie mit DXR bzw. DXR-Konjugaten erfolgte bestmöglich lichtgeschützt.

Für das Konjugat dPGSamin-PTX-(6) wurde ein molares Verhältnis von $n = 1,4 \text{ mol PTX/1 mol dPGS}$ ermittelt (A. Sousa Hervés, ehem. Inst. f. Chemie und Biochemie, Freie Universität, Berlin) [155]. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen sind dementsprechend korrigiert worden. Für andere Konjugate wurde von den in Tabelle 6 genannten molaren Verhältnissen ausgegangen. Die Stoffmengenkonzentration bezieht sich, mit Ausnahme der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen, auf das Gesamtmolekulargewicht.

Tabelle 6

Übersicht über genutzte Wirkstoffe, dPGS und deren Konjugate hinsichtlich des chemischen Aufbaus, Sulfatierungsgrades und Molekulargewichts.

DS: Sulfatierungsgrad; *M*: Molekulargewicht; dPGS: dendritisches Polyglycerolsulfat; dPG: dendritisches Polyglycerol; ICC: Indocarbocyanin; PTX: Paclitaxel; CAB: Chlorambucil; MTX: Methotrexat; DXR: Doxorubicin. Sulfatierung/Aminogruppen/Azidgruppen prozentual als Anteil der gesamten funktionellen Gruppen angegeben.

Nr.	Bezeichnung	chemische Kurzbeschreibung/Linkerverbindungen	Konjugation	DS	<i>M</i>
[1]	dPGS	dPGS; ohne Aminogruppen und ohne Azidgruppen	n. a.	90 %	≈ 13000 Da
[2]	dPGSamin	dPGS; mit 10–15 % freien Aminogruppen; unkonjugiert	n. a.	80 %	≈ 13000 Da
[3]	dPGSazid	dPGS mit 10–15 % freien Azidgruppen; unkonjugiert; Kontrolle zu Substanz Nr. [13] und [25]	n. a.	80 %	≈ 13000 Da
[4]	dPGSamin-K1	dPGS mit 10–15 % freien Aminogruppen; unkonjugiert; Kontrolle zu Substanz Nr.: [14; 15] und [26; 27]	n. a.	80 %	≈ 8000 Da
[5]	dPGSamin-K2	dPGS mit 10–15 % freien Aminogruppen; unkonjugiert; Kontrolle zu Substanz Nr.: [16; 17] und [28; 29]	n. a.	80 %	≈ 13000 Da
[6]	dPGSamin-K3	dPGS mit 10–15 % freien Aminogruppen; unkonjugiert; Kontrolle zu Substanz Nr.: [18; 30; 32; 34]	n. a.	80 %	≈ 13000 Da
[7]	dPGSamin-70 % Sulfat	dPGS mit 10–15 % freien Aminogruppen; unkonjugiert	n. a.	70 %	≈ 11700 Da
[8]	dPGSamin-45 % Sulfat	dPGS mit 10–15 % freien Aminogruppen; unkonjugiert	n. a.	45 %	≈ 8000 Da
[9]	dPGSamin-15 % Sulfat	dPGS mit 10–15 % freien Aminogruppen; unkonjugiert	n. a.	15 %	≈ 6000 Da
[10]	dPGSamin-ICC	dPGSamin mit ICC (NHS-Ester); Amidbindung; dPGS mit 15 % freien Aminogruppen	$\frac{0,4 \text{ mol ICC}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 13000 Da
[11]	Paclitaxel (PTX)	Paclitaxel	n. a.	n. a.	854 Da

[12]	PTX-ICC	PTX-Succinat mit ICCamin konjugiert; Esterbindung am PTX; Amidbindung am ICC; Amidverlinkung	$\frac{1 \text{ mol ICC}}{1 \text{ mol PTX}}$	n. a.	≈ 1700 Da
[13]	dPGSazid-PTX-(1)	dPGSazid mit PTX-Succinat-Propargylamid; Esterbindung am PTX; Triazol am dPGS; dPGSazid mit 10–15 % freien Azidgruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 14000 Da
[14]	dPGSamin-PTX-(2)	dPGSamin mit PTX-Succinat-Maleimidoethylamid; Esterbindung am PTX; Iminothiolan am dPGS; Thioether-Bindung; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 9000 Da
[15]	dPGSamin-PTX-(3)	dPGSamin mit PTX-Succinat; Esterbindung am PTX; Amidbindung am dPGS; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 9000 Da
[16]	dPGSamin-PTX-(4)	dPGSamin mit PTX-Succinat-Maleimidoethylamid; Esterbindung am PTX; Iminothiolan am dPGS; Thioether-Bindung; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 14000 Da
[17]	dPGSamin-PTX-(5)	dPGSamin mit PTX-Succinat (NHS-Ester); Esterbindung am PTX; Amidbindung am dPGS; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 14000 Da
[18]	dPGSamin-PTX-(6)	dPGSamin mit PTX-Succinat (NHS-Ester); Esterbindung am PTX; Amidbindung am dPGS; dPGSamin aus automatisiertem Batchprozess; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1,4 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 14200 Da
[19]	dPGSamin-PTX-(6)-45 % Sulfat	dPGSamin mit PTX-Succinat (NHS-Ester); Esterbindung am PTX; Amidbindung am dPGS; 45 % Sulfatierungsgrad; dPGSamin aus automatisiertem Batchprozess dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	45 %	≈ 9400 Da
[20]	dPGSamin-PTX-(6)-15 % Sulfat	dPGSamin mit PTX-Succinat (NHS-Ester); Esterbindung am PTX; Amidbindung am dPGS; 15 % Sulfatierungsgrad; dPGSamin aus automatisiertem Batchprozess; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	15 %	≈ 7300 Da
[21]	dPGSamin-PTX-(6)-ICC	wie dPGSamin-PTX-(6); zusätzlich ICC-Konjugation über Amidbindung; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX} + 0,2 \text{ mol ICC}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 14300 Da
[22]	dPGamin-PTX	dPGamin mit PTX-Succinat (NHS-Ester); Esterbindung am PTX; Amidbindung am dPGS; keine Sulfatierung; dPGamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX}}{1 \text{ mol dPG}}$	0 %	≈ 6200 Da
[23]	dPGamin-PTX-ICC	wie dPGamin-PTX; zusätzlich ICC-Konjugation über Amidbindung; dPGamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol PTX} + 0,2 \text{ mol ICC}}{1 \text{ mol dPG}}$	0 %	≈ 6800 Da
[24]	Chlorambucil (CAB)	Chlorambucil	n. a.	n. a.	304 Da

[25]	dPGSazid-CAB-(1)	dPGSazid mit CAB-Propargylamid; Amidbindung am CAB; Triazolbindung am dPGS; dPGSazid mit 10–15 % freien Azidgruppen	$\frac{1 \text{ mol CAB}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 13500 Da
[26]	dPGSamin-CAB-(2)	dPGSamin mit CAB-Maleimidoethylamid; Iminothiolan am dPGS; Amidbindung am CAB; Thioether-Bindung; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol CAB}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 8500 Da
[27]	dPGSamin-CAB-(3)	dPGSamin mit CAB (NHS-Ester); Amidbindung am dPGS; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol CAB}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 8500 Da
[28]	dPGSamin-CAB-(4)	dPGSamin mit CAB-Maleimidoethylamid; Iminothiolan am dPGS; Amidbindung am CAB; Thioether-Bindung; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{2 \text{ mol CAB}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 14000 Da
[29]	dPGSamin-CAB-(5)	dPGSamin mit CAB (NHS-Ester); Amidbindung am dPGS; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{2 \text{ mol CAB}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 14000 Da
[30]	dPGSamin-CAB-(6)	dPGSamin mit CAB (NHS-Ester); Amidbindung am dPGS; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{7 \text{ mol CAB}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 15100 Da
[31]	Methotrexat (MTX)	Methotrexat	n. a.	n. a.	454 Da
[32]	dPGSamin-MTX-(2)	dPGSamin mit MTX (NHS-Ester); α/δ -Mischung; Amidbindung am dPGS; 15 % freie Aminogruppen; dPGSamin aus automatisiertem Batchprozess; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{2 \text{ mol MTX}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 12000 Da
[33]	Doxorubicin (DXR)	Doxorubicin	n. a.	n. a.	544 Da
[34]	dPGSamin-DXR-(1)	dPGSamin mit DXR-Succinat (NHS-Ester); Amidbindung am dPGS; Esterbindung am DXR; dPGSamin aus automatisiertem Batchprozess; dPGSamin mit 10–15 % freien Aminogruppen	$\frac{1 \text{ mol DXR}}{1 \text{ mol dPGS}}$	80 %	≈ 12200 Da

2.3. Untersuchungen zur Wirksamkeit von dPGS *in vivo*

2.3.1. Xenograftransplantation von A549-Zellen

Die Untersuchung der Wirkung von dPGS *in vivo* wurde an athymischen NMRI:nu/nu-Mäusen durchgeführt. Diese weisen eine Mutation im *forkhead-box-N1 (Foxn1)*-Gen auf Chromosom 11 (Maus) auf [167, 168]. Der Transkriptionsfaktor Foxn1 ist vermutlich an der Thymusepithelzell-differenzierung sowie an der Vaskularisation der Thymusanlage beteiligt [169-171]. Dementsprechend fehlt homozygot mutierten Tieren ein entwickelter Thymus [172], wodurch es zur unvollständigen Ausreifung von Thymozyten zu T-Lymphozyten kommt. Homozygote Mäuse weisen deshalb verminderte Lymphozytenzahlen auf [173]. Bei Untersuchungen *in vivo* konnten aus dem Ductus thoracicus keine T-Zellen gewonnen werden [173]. T-Zellen sind jedoch für die adaptive Immunantwort essentiell.

Durch die Firma EPO (Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH, Berlin) erfolgte eine xenogene, ektopische Transplantation von humanen Lungenkarzinomzellen der A549-Zelllinie, Passage 13, in einer Gesamtmenge von $0,7 \times 10^7$ Zellen/Maus durch subkutane Injektion. Je sechs Tiere wurden mit $D = 10$ mg/kg Körpergewicht (b.w.) dPGS oder mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS, gelöst in $V = 100$ μ l phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), behandelt. Die Kontrolltiere erhielten $V = 100$ μ l PBS ($n = 6$). Der Therapieversuch erfolgte für drei Behandlungszyklen von je fünf Tagen (Tag 12–16; 19–23; 26–30). Als Therapiebeginn wurden „palpable Tumoren“ festgelegt. Es erfolgte eine Nachbeobachtungsperiode nach Therapieabschluss für zwei Wochen. Die Tiere wurden hinsichtlich des Gewichts, Verhaltens und des Tumorumfanges untersucht. Am Tag 44 nach Transplantation der Tumorzellen wurden die Tiere getötet, die Tumoren *in toto* reseziert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das Experiment erfolgte nach den in der Bundesrepublik Deutschland gültigen Gesetzen zum Tierschutz in Verantwortung der Firma EPO GmbH. Die Transplantation der Tumorzellen, die Behandlung und die Beobachtung der Tiere sowie die Entnahme und Kryokonservierung der Tumoren erfolgten vollständig durch die Firma EPO GmbH. Die Tumorgewebe und Rohwerte der Messungen (Körpergewicht; Tumorumfänge) wurden zur weiteren Untersuchung zur Verfügung gestellt.

2.3.2. Immunhistochemische und histologische Färbungen der Tumorgewebe

Herstellung der Gewebeschnitte

Histologische Untersuchungen der Tumorgewebe wurden an $h = 4 \mu\text{m}$ dünnen Kryoschnitten durchgeführt (SuperFrost® Ultra Plus Objektträger). Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte mithilfe des Kryomikrotoms Leica® CM 1850 (F. Serowka, mivenion® GmbH, Berlin).

Immunhistochemische Färbung (IHC) von Ki-67, Caspase-3 und NF- κ B

Die Gewebeschnitte der Tumoren wurden bis zur Färbung bei $T = -25 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor Beginn der Färbung wurden diese in Aceton fixiert ($t = 5 \text{ min}$; $T = -25 \text{ }^\circ\text{C}$), für $t = 30 \text{ min}$ bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet und vor der Applikation des Primärantikörpers mit PBS rehydriert.

Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in der Feuchtkammer (Verdünnung 1:200 in PBS [Ki-67; Caspase] bzw. Milch [$\beta = 5 \text{ g Milchpulver}/100 \text{ ml PBS}$; nur NF- κ B]). Tabelle 7 zeigt die verwendeten Antikörper und Inkubationszeiten. Anschließend wurden die Präparate mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit [IgG H + L] Antikörper; 1:200; $t = 1 \text{ h}$; RT) markiert. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte in PBS (Ki-67; Caspase-3) bzw. in Milch (nur NF- κ B). Nach erneutem Spülen (PBS) wurde die Kerngegenfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Stocklösung $\beta = 5 \text{ mg/ml}$; in PBS) mit den in Tabelle 7 genannten Modifikationen durchgeführt.

Tabelle 7

Übersicht über Primärantikörper, Inkubationsbedingungen und DAPI-Färbungen zur immunhistochemischen Darstellung von Ki-67, Caspase-3 und NF- κ B bei A549-Tumorgeweben.

RT: Raumtemperatur.

Nachweis	Primärantikörper	Inkubation	DAPI-Färbung
Ki-67	Rabbit anti-human Ki-67 Antigen	$t = 1 \text{ h}$; RT	1:1000; $t = 5 \text{ min}$; RT
Caspase-3	Cleaved Caspase-3 (Asp 175) (5A1E) Rabbit mAb	$t = 1 \text{ h}$; RT	1:250; $t = 30 \text{ min}$; RT
NF- κ B	Rabbit Polyclonal anti-NF- κ B-p65	in Milchp./PBS; $t = 1 \text{ h}$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$	1:1000; $t = 5 \text{ min}$; RT

Die Präparate wurden mit Glycerin/PBS oder mit Fluorescence Mounting Medium eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop DMLB (Kamera: RTKE spot) untersucht. Die Einstellung der Belichtungszeiten erfolgte anhand mehrerer Aufnahmen und wurde konstant belassen (Vergrößerung 100x; Tabelle 8).

Tabelle 8

Übersicht über Belichtungszeiten bei der Erstellung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der Tumorgewebe. Immunhistochemische Färbung von Ki-67, Caspase-3 und NF- κ B, markiert mit CyTM3-Sekundärantikörper. Kernfärbung mit DAPI.

Antigen	Belichtungszeit Cy TM 3-Fluoreszenz	Belichtungszeit DAPI
Ki-67	2000 ms	100 ms
Caspase-3	3000 ms	130 ms
NF- κ B	5000 ms	130 ms

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden mit dem Programm MetaVue 5 erstellt (Molecular Devices®, Sunnyvale, California, USA). Die Auswahl der zu fotografierenden Struktur erfolgte nach zuvor festgelegten Kriterien über den relativen Anteil von Nekrose/vitales Gewebe bzw. Randbereich/vitales Gewebe.

Für die Auswertung der Bilder von Ki-67 und Caspase-3 wurde die Software ImageJ 1.41 (National Institutes of Health, USA) genutzt. Mit ImageJ erfolgten die Trennung der Farbkanäle und die Hintergrundentfernung durch Einstellung von konstant belassenen Schwellenwertgrenzen. Positive Signale (gemessen als Pixel) wurden im Histogramm dargestellt. Zur Auswertung von NF- κ B wurden die mikroskopischen Aufnahmen hinsichtlich der Überlagerungen von Zellkernen und NF- κ B-Färbung untersucht, die sich violett darstellen. Es erfolgte die manuelle Auszählung der violetten Zellkerne an einem 27“-Monitor bei konstanten Monitoreinstellungen in einem abgedunkelten Raum bei gleicher Vergrößerung der Bilder. Die Auszählung erfolgte dreimalig für jedes Bild unter Anwendung der Zellzählfunktion des Programmes ImageJ 1.41. Das dreimalige Auszählen eines Bildes wurde mit zeitlichem Abstand und unter „Verblindung“ der zuvor ausgezählten Werte durchgeführt. Der Median der Auszählung wurde bestimmt. Die Ermittlung der Pixelzahlen für DAPI erfolgte analog zu Ki-67 und Caspase-3 durch ImageJ 1.41.

Histologische Färbung mit Toluidinblau

Für die Färbung der Gewebeschnitte mit Toluidinblau wurden diese wie zuvor beschrieben fixiert und rehydriert. Eine frisch gelöste und filtrierte Toluidinblaulösung ($\beta = 1$ mg/ml in $c = 0,5$ mol/l HCl) wurde über Nacht bei RT auf den Geweben inkubiert. Nach Spülen in Aqua dest. erfolgten die Gegenfärbung mit Eosin-G-Lösung ($t = 3$ s), erneutes Spülen in

Aqua dest. und die Entwässerung über die aufsteigende Alkoholreihe mit Neo-Clear® als Intermedium ($t = 3 \times 10$ min). Der Einschluss erfolgte mit Roti®-Histokitt II. Zur Vermeidung des Herauslösens von Toluidinblau wurden die Alkoholreihe und Spülvorgänge zügig durchlaufen. Die Präparate wurden am Mikroskop Leica® DMLB (Kamera: RTKE spot) mikroskopiert.

Histologische Färbung mit Alcianblau

Das Färbeprotokoll für die Alcianblaufärbung entspricht grundlegend der Methode zur Anfärbung von Sulfatgruppen nach Lev et Spicer [174].

Die Fixierung und Rehydrierung erfolgte wie zuvor dargestellt. Zur Senkung des Gewebe-pH-Wertes wurden die Gewebe nach der Rehydrierung in $c = 0,5$ mol/l HCl ($pH \approx 0,3$; $t = 5$ min) inkubiert. Mit einer zeitnah gelösten, steril filtrierten Alcianblaulösung ($\beta = 10$ mg/ml in $c = 0,5$ mol/l HCl) wurden die Gewebeschnitte gefärbt ($t = 30$ min; RT); anschließend mindestens dreimalig in $c = 0,5$ mol/l HCl gespült und die Objektträgerkanten auf Filterpapier abgepresst, um eventuell verbliebene Alcianblaulösung zu entfernen. Der letzte Waschschrift bestand aus einer Spülung in HCl ($t = 5$ min; $c = 0,5$ mol/l HCl), dem Abpressen auf Filterpapier und der Wässerung der Objektträger für einige Minuten. Die Zellkerngegenfärbung erfolgte mit einer filtrierten Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung ($t = 15$ min; RT). Die Präparate wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in das Intermedium Neo-Clear® ($t = 3 \times 10$ min) überführt und mit Roti®-Histokitt II eingedeckt.

Einige Gewebe wurden zusätzlich vor der Alcianblaufärbung mit Hyaluronidase inkubiert ($t = 1,5$ h; $T = 37$ °C in der Feuchtkammer; testikuläre Hyaluronidase: $\beta = 0,5$ mg/ml in vorgewärmtem Phosphatpuffer nach Sørensen; $pH = 6,98$; Pufferansatz entsprechend [175]).

Die mikroskopische Fotodokumentation erfolgte am Mikroskop Leica® DMR (Kamera: moti-cam2500).

2.4. Allgemeine Zellkultur

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur erfolgten unter Anwendung steriler Methoden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2.

2.4.1. Allgemeine Zellkultur, Sub- und Dauerkultur

Tumorzelllinien wurden bis Passage 35 und die HUVEC-Zelllinie bis zur Passage 8 genutzt. Die Medien (Dulbecco's Modified Eagle-Medium [DMEM-Medium], Roswell Park Memorial Institute-Medium [RPMI-Medium], McCoy's 5A-Medium) wurden mit fetalem Kälberserum (fetal

calf serum [FCS]) und Penicillin/Streptomycin supplementiert

($\sigma = \frac{50 \text{ ml FCS} + 5 \text{ ml Penicillin/Streptomycin}}{500 \text{ ml Medium}}$) und das RPMI-Medium zusätzlich mit L-Glutamin

($\sigma = \frac{5 \text{ ml L-Glutamin}}{500 \text{ ml Medium}}$) versetzt. Die Supplementierung des EndoPrime-Base-Mediums für

HUVEC-Zellen erfolgte entsprechend den Herstellervorgaben.

Sämtliche Zelllinien wurden bei $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem 5 % CO_2 /Luft-Gemisch und bei vollständiger Befeuchtung im Wärmeschrank kultiviert.

Subkultivierung von adhärennten Tumorzelllinien

Zur Subkultivierung wurde das Medium vollständig entnommen, die Zellen mit PBS gespült und mit $V = 2 \text{ ml}$ Trypsin/Ethylendiamintetraacetat-Lösung (T/E) für $t = 5\text{-}10 \text{ min}$ bei RT inkubiert. Durch Abklopfen erfolgte das restlose Lösen der Zellen. Mit Zugabe von $V = 12 \text{ ml}$ Medium wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Zellsuspension nach Resuspension im Zentrifugenröhrchen pelletiert ($v = 1150 \text{ rpm}$; $t = 7 \text{ min}$; Kühlzentrifuge 1707; Standardeinsatz). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in zellspezifischem Medium resuspendiert und entsprechend der Teilungsrate in einer neuen Kulturflasche mit $V \approx 20 \text{ ml}$ Medium ausgesät.

Analog dazu erfolgte das Ablösen der HUVEC-Zellen durch Inkubation mit $V = 3 \text{ ml}$ Accutase ($t = 3\text{-}4 \text{ min}$; RT), Abklopfen und der Aufnahme in PBS. Nach dem Zentrifugieren (s. o.) erfolgte die Teilung und Aussaat durch Aufnahme der Zellen in supplementiertes EndoPrime-Medium. Nicht für die Erhaltungskultur benötigte Zellen wurden in direktem Anschluss in Experimenten genutzt.

Subkultivierung von U937-Suspensionszellen

Die Subkultivierung der U937-Suspensionszellen erfolgte durch Entnahme von Medium und Zellen entsprechend dem Teilungsgrad und dem Auffüllen mit neuem RPMI-Medium auf $V = 30 \text{ ml}$.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Subkonfluente Zellen wurden mit PBS gewaschen und nötigenfalls mit T/E bzw. Accutase abgelöst, gewaschen und abzentrifugiert. Die aufgelockerten Pellets wurden in vorgekühltem Einfriermedium (FCS mit $\varphi = 10 \text{ \% DMSO}$) aufgenommen und im Einfrierbehälter eine Stunde bei $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$, einige Stunden bei $T = -20 \text{ }^\circ\text{C}$ und über Nacht bei $T = -80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am folgenden Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Regelmäßig wurden $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/Röhrchen in $V = 3 \text{ ml}$ Einfriermedium eingefroren.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, im Wasserbad erwärmt, in vorgewärmtes Medium aufgenommen und anschließend abzentrifugiert ($v = 1150 \text{ rpm}$; $t = 7 \text{ min}$; Kühlzentrifuge 1707; Standardeinsatz). Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Aussaat mit einer Dichte von rund 2×10^6 Zellen in eine neue Kulturflasche. Die erste Subkultivierung wurde nach einigen Tagen durchgeführt.

2.4.2. Zelllinien

Die nachfolgende Übersicht charakterisiert die genutzten Zelllinien hinsichtlich der Herkunft und spezieller Kulturbedingungen. Sämtliche Zelllinien sind humanen Ursprungs.

A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden aus einem Lungenkarzinom gewonnen [176]. Diese zeigen Eigenschaften alveolarer Pneumozyten Typ II (lamellar bodies) und produzieren Lecithin [177-179]. Die Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert und zweimal wöchentlich $\approx 1:10$ geteilt.

A431-Zellen

A431-Zellen wurden aus einem Plattenepithelkarzinom der Vulva isoliert [176]. Es handelt sich um eine adhärent wachsende Zelllinie, die zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:12–1:16 in DMEM-Medium subkultiviert wurde.

A2780-Zellen

Bei A2780-Zellen handelt es sich um Zellen eines unbehandelten humanen Ovarialkarzinoms [180]. Die Zelllinie wächst adhärent in RPMI-Medium und wurde zweimal wöchentlich 1:8 geteilt.

U937-Zellen

U937-Zellen repräsentieren ein histiozytisches Lymphom [181]. (Der Begriff „histiozytisches Lymphom“ entspricht nicht mehr der aktuellen Terminologie der Lymphome [182].) Die Zellen wachsen nichtadhärent als Zellsuspension [181] und können bei Kultivierung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in Richtung Makrophagen differenziert und adhärirt werden [183]. Diese müssen jedoch als immatur angesehen werden [183]. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium mit einer zweimaligen Subkultivierung pro Woche (Teilungsgrad 1:15–1:20).

SK-Hep-1-Zellen

SK-Hep-1-Zellen sind Zellen, die aus dem Aszites eines Leber-Adenokarzinompatienten etabliert wurden [184]. Sie besitzen keine hepatozytären Eigenschaften, sondern sind endothelialen

Ursprungs [184]. Die Subkultivierung erfolgte in DMEM-Medium zweimal wöchentlich ($\approx 1:10$).

HCT-116-Zellen

HCT-116-Zellen wurden aus einem Kolonkarzinom isoliert [185]. Die adhärent wachsenden HCT-116-Zellen wurden in McCoy's 5A-Medium kultiviert und zweimal wöchentlich 1:8-1:10 geteilt.

QGP-1-Zellen

Bei QGP-1-Zellen handelt es sich um Zellen eines Somatostatinoms, welche neben Somatostatin auch Carcinoembryonales Antigen produzieren [186, 187]. Die QGP-1-Zellen wurden in RPMI-Medium kultiviert und zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 geteilt.

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC-Zellen)

Jaffe et al. isolierten Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur (HUVEC-Zellen) [188]. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase des Wachstums beträgt $t = 92$ h [188]. HUVEC-Zellen treten frühzeitig in die Seneszenz über. Sie wurden in EndoPrime-Medium kultiviert und bei einer Konfluenz von ≈ 70 % geteilt (1:2-1:3).

2.5. Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Mit Hilfe verschiedener Methoden ist es möglich, Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen *in vitro* zu erstellen. Die Ermittlung der Zellviabilität beruht häufig auf der Reaktion von Tetrazolium-Salzen zu Formazanen [189]. Ausgehend von den gewonnenen Viabilitätswerten können „inhibitory concentration 50“-Werte (IC_{50} -Werte) errechnet werden.

2.5.1. Definition von IC_{50}

Der IC_{50} -Wert ist ein errechneter Parameter, um die Wirksamkeit von Wirkstoffen auszudrücken und zu vergleichen [190]. Je nach Berechnungsmethode ist es notwendig, zwischen absolutem IC_{50} - oder relativem IC_{50} -Wert zu unterscheiden, wobei sich der Vergleichspunkt ändert (100%-Kontrolle gegenüber Testsubstanzmaximum) [190]. In der vorliegenden Arbeit werden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen nicht als „Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration“, sondern als „Viabilität in Abhängigkeit von der Konzentration“ dargestellt. Diese Darstellung wird vielfach auch durch andere Arbeitsgruppen genutzt [122, 191]. Grund für diese Darstellung sind die untersuchten Wirkstoffe (Zytostatika) und deren Wirkung. Der IC_{50} -Wert ist demnach

diejenige Konzentration, bei der die Viabilität nach Substanzinkubation im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle um 50 % vermindert war.

2.5.2. Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen *in vitro*

Zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen *in vitro* wurde der MTT-Test angewandt.

Theoretischer Hintergrund zum MTT-Test

Der MTT-Test und der Zusammenhang zwischen Farbstoffumsatz/optischer Dichte und Zellzahl wurden erstmals durch Mosmann beschrieben [192]. Grundlage dessen ist die Reaktion des gelblichen Tetrazols 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem schwer löslichen, blau-violetten Formazanprodukt [192]. Dieser Reduktionsschritt geschieht vorwiegend NADH-, NADPH- und in geringerem Maße auch Succinat-abhängig [189, 193]. Entgegen ursprünglicher Annahmen, können nur rund 25–45 % der Formazanprodukte in Mitochondrien bzw. an deren Membranen gefunden werden [194]. Die Reduktion des Farbstoffes erfolgt außerdem in Plasmamembranen, im endoplasmatischen Retikulum und dem Zytosol, nicht jedoch im Zellkern [193, 194].

Die Absorption der gelösten Formazanprodukte ist für die Zellzahlen von 200–50.000 Zellen direkt proportional (EL₄.3-Lymphomzellen) [192].

Durchführung des MTT-Tests im Rahmen dieser Arbeit

Das Protokoll eines MTT-Tests entspricht weitestgehend den Herstellervorgaben (Millipore™) sowie dem Protokoll nach Mosmann [192].

Nach der entsprechenden Inkubation der Substanzen in 96-Multiwell-Platten wurden zu je $V = 100 \mu\text{l}$ vorliegendem Medium/well $V = 10 \mu\text{l}$ MTT-Testreagenz zugegeben ($\beta = 5 \text{ mg/ml}$; gelöst in PBS, sterilfiltriert; bei $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ lichtgeschützt gelagert). Im Wärmeschrank erfolgte die Inkubation für $t = 4 \text{ h}$. Anschließend wurde die Reaktion durch eine $c_{\text{eq}} = 0,04 \text{ N}$ HCl/2-Propanol-Lösung abgestoppt. Dazu wurde bei adhärennten Zelllinien $V = 50 \mu\text{l}$ Medium ohne Zellaspiration abgenommen und $V = 150 \mu\text{l}$ der HCl/2-Propanol-Lösung hinzugefügt. Bei Suspensionszelllinien wurde jedem well $V = 100 \mu\text{l}$ des Lösungsmittels hinzugegeben, ohne vorher Medium zu entfernen. Für das nachfolgend beschriebene Screening auf Zytotoxizität wurde vor dem Abstoppen kein Medium entnommen, sondern nur $V = 100 \mu\text{l}$ der HCl/2-Propanol-Lösung hinzugefügt. Nach gründlicher Resuspension mithilfe einer Multikanalpipette erfolgte

die Messung der Absorption mit dem Mikroplattenreader anthos htII innerhalb einer Stunde bei $\lambda_1 = 570$ nm und $\lambda_2 = 620$ nm als Referenzfilter ($OD_{570-620}$; optische Dichte).

Für detaillierte Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen, nicht jedoch für das Screening, erfolgte die Messung des Absorptionswertes von Zellen mit Medium ohne MTT-Reagenz, aber mit Abstopplösung, um die unspezifische Absorption des Hintergrundes zu ermitteln (Lösungsmittel, Zellen, Medium). Es ergab sich dabei ein Hintergrund von $OD_{570-620} = 0,012$ (DMEM-Medium), $OD_{570-620} = 0,005$ (RPMI-Medium) bzw. $OD_{570-620} = 0,016$ (HUVEC-Medium).

Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und Errechnung von IC_{50} -Werten

Für die Erstellung der *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurden Kontrollen (Zellen mit Medium, ohne Wirkstoff) genutzt, deren $OD_{570-620}$ als Ausdruck der metabolischen Aktivität mit einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt wurde. Die Berechnung der Viabilität erfolgte entsprechend Gleichung (1).

$$(1) \text{ Viabilität [\%]} = \frac{(\text{Median/Mittelwert } (OD_{570-620} [\text{Testkonzentration}]) - \text{Hintergrund})}{(\text{Median/Mittelwert } (OD_{570-620} [\text{Mediumkontrolle}]) - \text{Hintergrund})} \times 100 \%$$

Die Darstellung der *in-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und die Errechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mit GraphPad Prism® (Version 6 für Windows®, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Die Errechnung der IC_{50} -Werte wurde nach Normalisierung durch die Rechenoperation „log(inhibitor) vs. normalized response – variable slope“ durchgeführt.

Für das Zytotoxizitätsscreening wurden die IC_{50} -Werte aus den Konzentrations-Wirkungs-Graphen grafisch ermittelt, ohne die genannte Rechenoperation durchzuführen. Wenn die Möglichkeit vorhanden war, einfachere Regressionsgleichungen in Microsoft® Excel® anzeigen zu lassen, wurden die IC_{50} -Werte rechnerisch ermittelt, sofern sie außerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches lagen.

2.5.3. Überprüfung der dPGS-Zytostatika-Konjugate auf Zytotoxizität *in vitro*

Zytotoxizitätsscreening

Das Zytotoxizitätsscreening vergleicht eine größere Anzahl an Substanzen hinsichtlich der Zytotoxizität.

Dafür wurde eine Inkubationszeit von $t = 48$ h ohne die vorhergehende Adhärenz der Zellen über Nacht ausgewählt. Die Zellen wurden aus der Erhaltungskultur entnommen und entsprechend Tabelle 9 in $V = 50$ μ l zellspezifischem Medium in 96-Multiwell-Platten ausgesät. Unterschiedliche Zellzahlen sind notwendig, um Absorptionswerte im gewünschten Bereich zu erhalten (oh-

ne Sättigungsplateau, keine zu niedrigen Absorptionen). Die dafür notwendigen Zellzahlen wurden zuvor experimentell ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 9

Übersicht über die verwendete Zellzahl für das Zytotoxizitätsscreening in Mikrotiterplatten.

Zelllinie	A2780	A431	A549	HCT-116	SK-Hep-1	QGP-1	U937
Zellen/well	5×10^3	$2,5 \times 10^3$	3×10^3	4×10^3	$4,5 \times 10^3$	5×10^3	8×10^3

Geringfügige Anpassungen der genannten Zellzahlen waren im Verlauf der Versuchsreihe zum Ausgleich von Wachstumsunterschieden notwendig. Der Vergleich wurde durch den Bezug der Zytotoxizität auf die Kontrollreihen ermöglicht. Nach einer Ruhephase von $t \approx 4$ h erfolgte die Zugabe der in DMEM-Medium gelösten Substanzen (alle Zelllinien). PTX bzw. dPGS-PTX-Konjugate sowie MTX und dPGSamin-MTX-(2) wurden in einer Zielkonzentration von $c = 1; 10; 100$ nmol/l eingesetzt, während CAB bzw. dPGS-CAB-Konjugate im Bereich von $c = 0,1; 1; 10$ μ mol/l untersucht wurden. Für DXR und dPGSamin-DXR-(1) wurden Konzentrationen von $c = 1; 10; 100; 1000$ nmol/l gewählt. Für jede Konzentration wurde eine Probenzahl von $n = 8$ verwendet, wobei für jede Substanz eine Kontrollreihe (Medium) genutzt wurde. Die Inkubation erfolgte für $t = 48$ h bzw. $t = 96$ h (nur MTX und dPGS-MTX-Konjugate) mit anschließendem MTT-Test. Die Versuche wurden bis zu fünfmal wiederholt.

Einfluss der Inkubationszeit auf die Zytotoxizität von PTX und dPGSamin-PTX-(6)

Für die Errechnung des IC_{50} -Wertes in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurden A549- und A431-Zellen wie beschrieben aus der Erhaltungskultur entnommen und mit den in Tabelle 10 genannten Zellzahlen in $V = 100$ μ l DMEM-Medium ausgesät.

Tabelle 10

Angabe der ausgesäten Zellzahlen zur Untersuchung des Einflusses der Inkubationszeit auf den IC_{50} -Wert.

Zelllinie	$t = 24$ h	$t = 48$ h	$t = 72$ h
A431	$2,5 \times 10^3$ Zellen/well	$1,5 \times 10^3$ Zellen/well	$0,8 \times 10^3$ Zellen/well
A549	$3,5 \times 10^3$ Zellen/well	2×10^3 Zellen/well	1×10^3 Zellen/well

Geringfügige Anpassungen der Zellzahlen waren aufgrund des unterschiedlichen Wachstums der Erhaltungskultur notwendig. Die Zugabe der Substanzen dPGSamin-PTX-(6) und PTX erfolgte nach vorheriger Entnahme von $V = 50$ μ l Medium am nächsten Tag. Durch Zugabe des gleichen Volumens wurden die Substanzen mit einer Zielkonzentration von

$c = 0,001\text{--}1000$ nmol/l inkubiert (gelöst in DMEM-Medium). Je 96-Multiwell-Platte wurden drei Kontrollreihen ohne Substanz und je Konzentration eine Probenzahl von $n = 6$ genutzt. Nach Abschluss der Inkubationszeiten ($t_1 = 24$ h; $t_2 = 48$ h; $t_3 = 72$ h) wurde der MTT-Test wie zuvor beschrieben durchgeführt. Der Versuch wurde dreifach bzw. vierfach wiederholt. Die Randwells wurden zur Evaporationsverminderung mit PBS aufgefüllt.

Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) auf HUVEC-Zellen

Zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von PTX und dPGSamin-PTX-(6) auf nicht-malignen HUVEC-Zellen wurden diese mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/well in $V = 100$ μ l supplementiertem EndoPrime-Medium ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen über Nacht erfolgte die Entnahme von $V = 50$ μ l Medium und die Zugabe der Substanzen PTX und dPGSamin-PTX-(6) in $V = 50$ μ l supplementiertem EndoPrime-Medium für eine Inkubationszeit von $t = 72$ h (Zielkonzentration: $c = 0,01\text{--}1000$ nmol/l). Je Platte sind drei Kontrollreihen genutzt worden. Nach Abschluss der Inkubation erfolgte der zuvor dargestellte MTT-Test. Die Versuche wurden vierfach wiederholt. Der Anteil von FCS ist aufgrund von Wachstumsproblemen der Erhaltungskultur teilweise variiert worden.

Einfluss der Sulfatierung von dPGS auf die Zytotoxizität von dPGSamin-PTX-(6)

An ausgewählten Konjugaten sollte der Einfluss der Sulfatierung auf die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei A431-Zellen untersucht werden.

Dafür wurden A431-Zellen aus der Erhaltungskultur entnommen und mit einer Dichte von $2,5 \times 10^3$ Zellen/well ausgesät. Der grundlegende Aufbau des Experimentes glich dem zuvor beschriebenen Screening (keine Adhärenz über Nacht). Die Substanzen (dPGSamin-PTX-(6) und dessen niedriger sulfatierte Derivate; PTX; dPGamin-PTX; dPGSamin) wurden in DMEM-Medium verdünnt und im Bereich von $c = 0,1\text{--}1000$ nmol/l inkubiert. Je 96-well-Platte wurden drei Kontrollreihen genutzt und je Konzentration eine Probenanzahl von $n = 8$. Der MTT-Test wurde nach einer Inkubationszeit von $t = 48$ h wie beschrieben durchgeführt. Der Versuch vierfach wiederholt.

Einfluss der ICC-Konjugation auf die Zytotoxizität

Der Einfluss der ICC-Konjugation auf die Zytotoxizität sollte anhand von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bei A431-Zellen untersucht werden. Dafür wurden PTX, PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6) und dPGSamin-PTX-(6)-ICC auf A431-Zellen inkubiert. Diese wurden in DMEM-Medium mit einer Dichte von 2×10^3 Zellen in $V = 100$ μ l/well ausgesät und

über Nacht adhäriert. Am folgenden Tag erfolgte die Entnahme von $V = 50 \mu\text{l}$ DMEM-Medium ohne Zellaspiration und die Zugabe des gleichen Volumens mit Substanzen (Zielkonzentration: $c = 0,1\text{--}1000 \text{ nmol/l}$). Je Mikrotiterplatte wurden drei Kontrollreihen genutzt. Nach Zugabe der Substanzen erfolgten die Inkubation für $t = 48 \text{ h}$ und der zuvor beschriebene MTT-Test. Der Versuch wurde drei bzw. vierfach wiederholt.

2.6. Färbungen mit Toluidinblau und Alcianblau *in vitro*

2.6.1. Toluidinblaufärbung verschiedener dPGS-Varianten

Für die Färbung von dPGS-Varianten wurden U937-Zellen mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/well in einer 24-Multiwell-Platte auf unbeschichteten, sterilen Deckgläsern ausgesät, mit RPMI-Medium + $c = 10 \text{ nmol/l}$ PMA über Nacht adhäriert und in Richtung Makrophagen differenziert [183]. Die Substanzen dPGS, dPGSamin, dPGSamin-PTX-(6), dPGamin-ICC und PTX-ICC wurden in RPMI-Medium + $c = 10 \text{ nmol/l}$ PMA verdünnt und mit einer Zielkonzentration von $c = 1 \mu\text{mol/l}$ für fünf Tage auf den Zellen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Deckgläser mit warmem PBS gespült und die Zellen mit einer Formaldehyd-Lösung fixiert ($\beta = 4 \text{ g}$ Paraformaldehyd [PFA]/100 ml PBS; $\text{pH} = 7,4$; $t = 10 \text{ min}$ auf Eis). Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbung der Zellen mit einer frisch filtrierten Toluidinblaulösung ($\beta = 1 \text{ mg/ml}$ in $c = 0,5 \text{ mol/l}$ HCl) über Nacht bei RT. Anschließend wurden die Deckgläser kurz in Aqua dest. gespült, für $t = 3 \text{ s}$ mit einer Eosin-G-Lösung gegengefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils nur wenige Sekunden entwässert. Als Intermedium wurde Neo-Clear® für $t = 5 \text{ min}$ genutzt und die Präparate anschließend mit Roti®-Histokitt II eingedeckt.

2.6.2. Alcianblaufärbung unterschiedlich stark sulfatierter dPGS-Moleküle

Die Färbungstheorie zur Darstellung von Sulfatgruppen beruht auf Lev et Spicer [174] und wurde zur Zellfärbung *in vitro* angepasst. Für die Alcianblaufärbung unterschiedlich stark sulfatierter dPGS-Polymere wurden U937-Zellen für vier Tage mit PMA ($c = 10 \text{ nmol/l}$) auf unbeschichteten, sterilen Deckgläsern in 24-Multiwell-Platten adhäriert und in Richtung immaturer Makrophagen differenziert [183]. Es erfolgte ein Mediumwechsel am Tag 2 nach Aussaat (RPMI-Medium + $c = 10 \text{ nmol/l}$ PMA). Die Substanzen dPGS, dPGSamin, dPGSamin-70 % Sulfat, dPGSamin-45 % Sulfat, dPGSamin-30 % Sulfat und dPGSamin-15 % Sulfat wurden für $t = 48 \text{ h}$ auf den Zellen inkubiert (Zielkonzentration: $c = 1 \mu\text{mol/l}$; in

RPMI-Medium + $c = 10 \text{ nmol/l}$ PMA). Anschließend erfolgten die Abnahme des Mediums und die Fixierung der Zellen mit einer Formaldehyd-Lösung ($\beta = 4 \text{ g PFA/100 ml PBS}$; $pH = 7,4$; $t = 10 \text{ min}$ auf Eis). Für die Alcianblaufärbung wurden die Deckgläser einmalig mit Aqua dest. gewaschen, in HCl inkubiert ($c = 0,5 \text{ mol/l}$; $t = 5 \text{ min}$) und für $t = 30 \text{ min}$ mit Alcianblau ($\beta = 10 \text{ mg/ml}$ in $c = 0,5 \text{ mol/l HCl}$) gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen der Deckgläser mit HCl ($c = 0,5 \text{ mol/l}$), vorsichtigem Abpressen auf Filterpapier und kurzem Spülen in Aqua dest. wurde die Gegenfärbung mit einer Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung durchgeführt ($t = 15 \text{ min}$; RT). Nach erneutem Spülen in Aqua dest., der Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und der Inkubation in Neo-Clear®-Intermedium ($t = 5 \text{ min}$) erfolgte das Eindecken mit Roti®-HistoKit II.

2.7. Analyse ICC-markierter dPGS-Konjugate

Die Methodik zur Untersuchung des Einflusses der ICC-Markierung auf die Zytotoxizität ist in Kapitel 2.5.3. beschrieben.

2.7.1. Absorptionsanalyse

Nach Rücklösung der lyophilisierten Substanzen PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC mit Aqua dest. oder DMSO (Zielkonzentration: $c = 10 \text{ } \mu\text{mol/l}$) erfolgte die Absorptionsmessung im Spektrophotometer Beckman® DU530 UV/VIS im Bereich von $\lambda_1 = 400 \text{ nm}$ bis $\lambda_2 = 800 \text{ nm}$ mit einem Messabstand von $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$. Beide Lösungsmittel wurden als Hintergrundmessung einbezogen.

2.7.2. Fluoreszenzanalyse

Die Substanzen PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC wurden zur Rücklösung und Verdünnung in DMSO oder Aqua dest. aufgenommen ($c = 0,1\text{--}10 \text{ } \mu\text{mol/l}$). Zur Fluoreszenzmessung wurde der Fluoreszenzreader Lambda Fluoro 320 microplate reader (Klinik für Dermatologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte) mit einem Exzitationsfilter $\lambda_{Ex} = 485/20 \text{ nm}$ und einem Emissionsfilter $\lambda_{Em} = 590/20 \text{ nm}$ verwendet. Die Hintergrundfluoreszenzmessung erfolgte mit DMSO bzw. Aqua dest. ohne Substanzzugabe.

2.8. Aufnahme und Elimination von dPGS-Konjugaten *in vitro*

2.8.1. Durchflusszytometrische Analysen zur Aufnahme von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGamin-PTX-ICC und dPGSamin-ICC

Für die Untersuchung der Aufnahme von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGamin-PTX-ICC und dPGSamin-ICC wurde die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting; FACSCalibur™) genutzt. Dazu wurden A431-Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/well in 24-Multiwell-Platten mit DMEM-Medium ausgesät und zur Adhärenz über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die o. g., zuvor lyophilisierten Konjugate frisch gelöst und in DMEM-Medium verdünnt auf den Zellen inkubiert (Zielkonzentration im well: $c = 1 \mu\text{mol/l}$ bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht). Nach den Inkubationszeiten ($t = 0,25 \text{ h} - 48 \text{ h}$; 17 Messpunkte) wurden das Medium entfernt, die Zellen dreifach mit $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ kaltem PBS gewaschen und mit T/E ($V = 200 \mu\text{l T/E}$; $t \approx 5 \text{ min}$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$) abgelöst. Die Zellen wurden anschließend mit Medium in Rundbodenröhrchen überführt, mit kaltem PBS gewaschen und abzentrifugiert ($\vec{a} = 250g$; $t = 8 \text{ min}$; $T = 8 \text{ }^\circ\text{C}$). Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte ein weiterer, gleicher Waschschrift, jedoch ohne Mediumzugabe. Abschließend wurden die Zellen in $\varphi = 3 \%$ FCS in PBS aufgenommen und in einem FACSCalibur™-Durchflusszytometer gemessen (Duplikatmessung). Zur Auswertung wurde das Programm CellQuest™ Pro 4.0.2 verwendet. Der Versuch wurde mit dem gleichen Protokoll wiederholt.

2.8.2. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von dPGSamin-PTX-(6)-ICC

Aussaat von Zellen auf (3-Amino-propyl)triethoxysilan-beschichtete Deckgläser

Zur Aussaat von Zellen auf sterilen Deckgläsern wurden Letztere in einer 24-Multiwell-Platte mit einer frisch gelösten, sterilfiltrierten Aminosilan-Lösung ($\sigma = 150 \mu\text{l}$ (3-Amino-propyl)triethoxysilan/50 ml H_2O ; $\approx 1 \text{ ml/Deckglas}$) für $t = 30 \text{ s}$ beschichtet, die Lösung entfernt und die Deckgläser für einige Stunden in der Sterilwerkbank getrocknet. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Dichte von $2,5 - 5 \times 10^5$ Zellen/well in $V = 500 \mu\text{l}$ bzw. $V = 1000 \mu\text{l}$. Zur Adhärenz wurden die Zellen über Nacht nur mit Medium inkubiert.

Aufnahmeanalyse von dPGSamin-PTX-(6)-ICC

Die Aussaat der A431-Zellen erfolgte auf (3-Aminopropyl)triethoxysilan-beschichteten Deckgläsern mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/well (s. o.). Das Polymer dPGSamin-PTX-(6)-ICC wurde in Medium verdünnt ($c = 1 \mu\text{mol/l}$) und für $t_1 = 10 \text{ min}$; $t_2 = 30 \text{ min}$; $t_3 = 1 \text{ h}$; $t_4 = 3 \text{ h}$ und

$t_5 = 24$ h bei $T = 37$ °C auf den Zellen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Deckgläser in den wells wurden mit PBS auf Eis gewaschen und die Zellen mit einer Formaldehyd-Lösung ($\beta = 4$ g PFA/100 ml PBS; $pH = 7,4$; $t = 10$ min) lichtgeschützt auf Eis fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt (1:500 in PBS; sterilfiltriert, $t = 15$ min, RT) und die Präparate mit Fluorescence Mounting Medium eingedeckt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop DMLB (Kamera: RTKE spot) mit konstanten Belichtungszeiten ($t = 50$ ms für DAPI; $t = 1000$ ms für ICC).

2.8.3. Durchflusszytometrische Analyse der Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC

Die *In-vitro*-Eliminationsanalyse der Substanzen dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC erfolgte analog zur Aufnahmeanalyse mithilfe der Durchflusszytometrie. Es wurden A431-Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 bzw. 2×10^5 Zellen pro well in $V = 500 \mu\text{l}$ DMEM-Medium in 24-Multiwell-Platten ausgesät und über Nacht adhärirt. Anschließend erfolgte die Zugabe von $V = 500 \mu\text{l}$ DMEM mit den o. g., rehydrierten, zuvor lyophilisierten Substanzen (Zielkonzentration: $c = 1 \mu\text{mol/l}$). Die Konjugate wurden für $t = 24$ h auf den Zellen inkubiert, danach das Medium vollständig abgenommen, die wells zweifach mit warmem PBS gewaschen und $V = 1000 \mu\text{l}$ konjugatfreies DMEM-Medium zugegeben ($= t_0$). Es erfolgte die erneute Inkubation für verschiedene Inkubationszeiten ($t = 0,5$ h–48 h; gemessen ab t_0). Anschließend wurde das Medium vollständig entfernt, die Zellen mit $V = 200 \mu\text{l}$ T/E ($t = 7$ min; $T = 37$ °C) abgelöst und mit Medium in Rundbodenröhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Abzentrifugieren ($\vec{a} = 350 g$; $t = 5$ min; $T = 6$ °C) erfolgten die Aufnahme der Zellen in $\phi = 3$ % FCS in PBS und die Analyse in einem FACSCalibur™-Durchflusszytometer.

Das Experiment wurde als Triplet je Zeit und Substanz durchgeführt und einmalig wiederholt. Die Einstellungen des FACSCalibur™-Durchflusszytometers wurden bei der Messung konstant belassen und die Ergebnisse mit dem Programm CellQuest™ Pro 4.0.2 ausgewertet.

2.8.4. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von dPGSamin-DXR-(1)

Die Untersuchung der Aufnahme von DXR und dPGSamin-DXR-(1) erfolgte mit A431-Zellen auf (3-Amino-propyl)triethoxysilan-beschichteten Deckgläsern (6×10^5 Zellen/well; Adhärenz über Nacht; Deckglasbeschichtung siehe Kapitel 2.8.2.). Anschließend wurden die Zellen für $t_1 = 10$ min; $t_2 = 30$ min, $t_3 = 1$ h, $t_4 = 3$ h und $t_5 = 6$ h mit DXR bzw. dPGSamin-DXR-(1), ver-

dünnt in DMEM-Medium, inkubiert ($c = 1 \mu\text{mol/l}$ bezogen auf Gesamtmolekulargewicht). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einer Formaldehyd-Lösung fixiert ($\beta = 4 \text{ g PFA/100 ml PBS}$; $pH = 7,4$; $t = 10 \text{ min}$) und die Kerne mit DAPI gegengefärbt ($1:500$ in PBS; $t = 15 \text{ min}$; sterilfiltriert). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten am DMLB-Fluoreszenzmikroskop (Kamera: RTKE spot) mit den in den Tabellen 11 und 12 genannten Belichtungszeiten. Ein quantitativer Vergleich zwischen den beiden Substanzen erfolgte nicht.

Tabelle 11

Belichtungszeiten für die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmeanalyse von DXR.

Objektiv	DAPI	DXR
40x	25 ms	1300 ms
65x	10 ms	250 ms

Tabelle 12

Belichtungszeiten für die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmeanalyse von dPGSamin-DXR-(1).

Objektiv	DAPI	dPGSamin-DXR-(1)
40x	15 ms	1000 ms
65x	10 ms	220 ms

2.9. Nachweis des Wirkmechanismus von dPGSamin-PTX-(6)

2.9.1. Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus

Für die Analyse des Zellzyklus wurden A431-Zellen mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/well in $V = 500 \mu\text{l}$ DMEM-Medium ausgesät (24-Multiwell-Platten) und über Nacht zur Adhärenz inkubiert. Die Substanzen PTX, dPGSamin-PTX-(6), dPGSamin und dPGamin-PTX wurden in DMEM-Medium verdünnt und auf den Zellen inkubiert ($c = 10 \text{ nmol/l}$ bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht). Nach der Inkubationszeit ($t = 12 \text{ h}$) wurde das Medium entnommen, die wells mit PBS gespült, die Zellen mit T/E abgelöst ($V = 200 \mu\text{l T/E}$; $t \approx 7 \text{ min}$; $T = 37 \text{ °C}$), mit Medium in Rundbodenröhrchen überführt und abzentrifugiert ($\vec{a} = 350 \text{ g}$; $T = 6 \text{ °C}$; $t = 5 \text{ min}$). Es erfolgte ein zweiter Waschschriff mit PBS. Zur Fixierung wurde $\varphi = 70 \%$ Ethanol unter vorsichtigem Schütteln auf dem Vortexer zugegeben und über Nacht inkubiert ($T = 4 \text{ °C}$). Im Anschluss wurde das Ethanol abzentrifugiert, Ribonuclease A ($\beta = 50 \mu\text{g/ml}$ in $t = 15 \text{ min}$ abgekochtem PBS; $V = 500 \mu\text{l}$) zugegeben und inkubiert ($T = 37 \text{ °C}$; $t = 30 \text{ min}$). Nach abschließendem Waschen wurden die Zellen in $\varphi = 3 \%$ FCS in PBS aufgenommen und mit Propidiumiodid

(Zielkonzentration: $\beta = 50 \mu\text{g/ml}$) für $t \geq 20$ min auf Eis inkubiert. Die Messung von 50.000 Zellen erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur™ im Kanal FL-2 unter konstanten Einstellungen mit einer Messgeschwindigkeit von maximal 350 Zellen/s. Zur Auswertung wurde das Programm FCS Express™ 5.0.74 (De Novo Software, Glendale, CA, USA) verwendet. Genutzt wurde die Berechnung nach folgendem Modell: „manual fit“; „1 cycle“, „Order of S = 0“, „G₂/G₁ not fixed“, „with background fit“, „sliced nuclei“.

2.9.2. Beeinflussung der Tubulinverteilung durch PTX und dPGSamin-PTX-(6)

Zum Nachweis der veränderten Tubulinverteilung nach Inkubation von PTX bzw. dPGSamin-PTX-(6) wurden A431-Zellen mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/well auf (3-Aminopropyl)triethoxysilan-beschichteten Deckgläsern (siehe Kapitel 2.8.2.) in $V = 500 \mu\text{l}$ DMEM-Medium ausgesät und über Nacht adhäriert. Die Substanzen PTX, dPGSamin-PTX-(6), dPGSamin und dPGamin-PTX wurden mit weiteren $V = 500 \mu\text{l}$ DMEM-Medium auf den Zellen inkubiert (Zielkonzentration: $c = 100 \text{ nmol/l}$). Nach der Inkubation ($t = 16 \text{ h}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$) wurde das Medium entnommen, die Zellen dreifach mit kaltem PBS gewaschen, mit einer Formaldehyd-Lösung fixiert ($\beta = 4 \text{ g PFA/100 ml PBS}$; $\text{pH} = 7,4$; $t = 8 \text{ min}$) und über Nacht bei $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Formaldehyd-Lösung gelagert ($\beta = 0,1 \text{ g PFA/100 ml PBS}$; $\text{pH} = 7,4$). Anschließend erfolgten die Permeabilisierung mit einer Triton® X-100/PBS-Lösung ($\sigma = 500 \mu\text{l Triton® X-100/100 ml PBS}$; $t = 4 \text{ min}$), erneutes Waschen und das Blocken für $t = 45 \text{ min}$ mit Milch ($\beta = 1 \text{ g Milchpulver/20 ml PBS}$). Die Inkubation des Primärantikörpers Anti- α -Tubulin (1:4000 in Milch; Ansatz s. o.) erfolgte für $t = 1 \text{ h}$ bei RT. Nach erneutem Waschen wurde die Fluoreszenzmarkierung durch den anti-mouse-Cy™3-Antikörper (1:200 in Milch; Ansatz s. o.) für $t = 1 \text{ h}$ bei RT durchgeführt und die Zellkerne mit DAPI (1:500; in PBS; sterilfiltriert; $t = 15 \text{ min}$) gegengefärbt. Das Eindecken erfolgte mit Fluorescence Mounting Medium. Zur Verminderung unspezifischer Hintergrundsignale wurde die Milchpulver/PBS-Lösung mit einem Sterilfilter (Porengröße: $d = 0,2 \mu\text{m}$) gereinigt. Die Präparate wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 5 Exciter, AxioImager M1 und der Software Zen 2009, Carl Zeiss® MikroImaging GmbH, Jena, aufgenommen.

2.10. Statistische Methodik

Für statistische Darstellungen/Auswertungen wurden die folgenden Programme genutzt:

- IBM® SPSS® Statistics 19.0.0, SPSS® Inc., an IBM® Company, Armonk, New York, USA;

- GraphPad Prism® Version 6 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA;
- Microsoft® Office® 2010 Version 14.0.6112.5000, Microsoft® Corporation, Redmond, Washington, USA;
- CellQuest™ Pro, Version 4.0.2, BD® Biosciences, San Jose, California, USA;
- FCS Express™ 5.0.74, De Novo Software, Glendale, California, USA.

SPSS® ist für die Analyse der Tumervolumina und histologische Experimente des Tierversuches; GraphPad Prism® für die Errechnung der IC₅₀-Werte und Microsoft® Excel® für vergleichende Analysen ohne Signifikanztestungen sowie die Ermittlung der IC₅₀-Werte beim Zytotoxizitätsscreening angewandt worden. Die Berechnung der IC₅₀-Werte mit GraphPad Prism® 6 wurde auf Seite 38 erläutert. Primäre Datensätze von durchflusszytometrischen Darstellungen wurden durch CellQuest™ Pro erhoben. Die Zellzyklusanalyse erfolgte mit FCS Express™ 5.

Die zur Ermittlung der Signifikanz angewandten statistischen Testverfahren sind im Ergebnisteil nach den einzelnen Ergebnissen genannt. Grundlegend wurde das Signifikanzniveau mit $\alpha \leq 0,05$ angenommen (Einzeltestung). Es erfolgte die Anwendung der *Bonferroni-Korrektur*, wenn multiple Testungen an einem Datensatz durchgeführt wurden. Die entsprechenden Datensätze sind in den Ergebnissen gekennzeichnet. Wurden signifikante Ergebnisse aus dem Vergleich zweier 95 %-Konfidenzintervalle abgeleitet, so ist dies mit der Bezeichnung „*Intervallvergleich*“ gekennzeichnet. Dabei bestätigt keine Überlappung der 95 %-Konfidenzintervalle einen signifikanten Unterschied.

3. Ergebnisse

3.1. Behandlung von Lungentumoren mit dPGS *in vivo*

Die Untersuchungen zur Verträglichkeit und zum Einfluss von dPGS auf das Tumorwachstum wurden an einem humanen Lungentumor in der Maus ausgewertet. Es sollte auch die potentielle Anreicherung des Polymers und dessen Penetration in das Tumorgewebe analysiert werden. Das Modell bestand aus der Xenografttransplantation von A549-Lungentumorzellen in thymusaplastische Mäuse. Die Behandlung erfolgte in drei Gruppen: (A) Kontrollgruppe; (B) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS und (C) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS.

3.1.1. Körpergewicht und Verhalten der Tiere

Während der Behandlung und im Nachbeobachtungsintervall wurden die Tiere hinsichtlich der Surrogatparameter „Körpergewicht“ und „Verhalten“ beobachtet, um Aussagen zur Verträglichkeit *in vivo* ableiten zu können.

Für das absolute Körpergewicht am Tag 12 nach der Implantation der Tumorzellen (1. Behandlungstag) wurden die folgenden Werte erhoben (\tilde{x} = Median; \bar{x} = arithm. Mittel):

(A) Kontrollgruppe: $\tilde{x} = 25,6$; $\bar{x} = 26,6$; min = 24,2; max = 32,3 [g],

(B) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS: $\tilde{x} = 29,4$; $\bar{x} = 29,5$; min = 25,6; max = 33,1 [g],

(C) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS: $\tilde{x} = 31,4$; $\bar{x} = 31,8$; min = 28,7; max = 34,3 [g].

Die Kontrollgruppe und die mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelte Gruppe unterschieden sich am Tag 12 signifikant in ihrem Körpergewicht ($p = 0,026$; *Mann-Whitney-U-Test f. unabh. Stichproben*).

Der weitere Gewichtsverlauf der Tiere wurde als relatives Körpergewicht, bezogen auf Tag 12, untersucht (relatives Körpergewicht am Tag 12 = 1). Am Tag 44, dem Ende der Nachbeobachtungsperiode, wurden für das relative Körpergewicht der drei Gruppen folgende Werte ermittelt (\tilde{x} = Median; \bar{x} = arithm. Mittel):

(A) Kontrollgruppe: $\tilde{x} = 1,10$; $\bar{x} = 1,10$; min = 1,08; max = 1,15,

(B) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS: $\tilde{x} = 1,08$; $\bar{x} = 1,09$; min = 1,04; max = 1,17,

(C) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS: $\tilde{x} = 1,09$; $\bar{x} = 1,10$; min = 1,08; max = 1,14.

Zu keinem der Untersuchungszeitpunkte wurden signifikante Unterschiede des relativen Körpergewichtes zwischen den drei Gruppen nachgewiesen (*Kruskal-Wallis-Test f. unabh. Stich-*

proben). Die Daten der anderen Untersuchungszeitpunkte sind aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt.

Während der Behandlung und Nachbeobachtung ist keines der Tiere verstorben [195]. Anzeichen für toxische unerwünschte Arzneimittelwirkungen des dPGS sind nicht erkennbar geworden [195].

3.1.2. Veränderung der Tumorumina

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von dPGS *in vivo* wurde das Tumorumen der Lungentumoren analysiert.

Am Tag 12 nach Implantation (1. Behandlungstag) wurden für die absoluten Tumorumina folgende Werte ermittelt (\tilde{x} = Median; \bar{x} = arithm. Mittel):

(A) Kontrollgruppe: $\tilde{x} = 0,06$; $\bar{x} = 0,07$; min = 0,038; max = 0,123 [cm³],

(B) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS: $\tilde{x} = 0,062$; $\bar{x} = 0,063$; min = 0,05; max = 0,082 [cm³],

(C) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS: $\tilde{x} = 0,056$; $\bar{x} = 0,074$; min = 0,044; max = 0,124 [cm³].

Die drei Gruppen unterschieden sich damit in ihrem absoluten Tumorumen am Tag 12 nicht signifikant ($p = 0,956$; *Kruskal-Wallis-Test f. unabhang. Stichproben*). Innerhalb der Gruppen (A) und (C) waren jedoch große Spannweiten der absoluten Tumorumina am Tag 12 feststellbar.

Der weitere Verlauf des Tumorumens wurde als relatives Tumorumen (RTV) bezogen auf Tag 12 untersucht (RTV am Tag 12: $RTV_{12} = 1$). Abbildung 7 zeigt den Verlauf des RTV der einzelnen Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit.

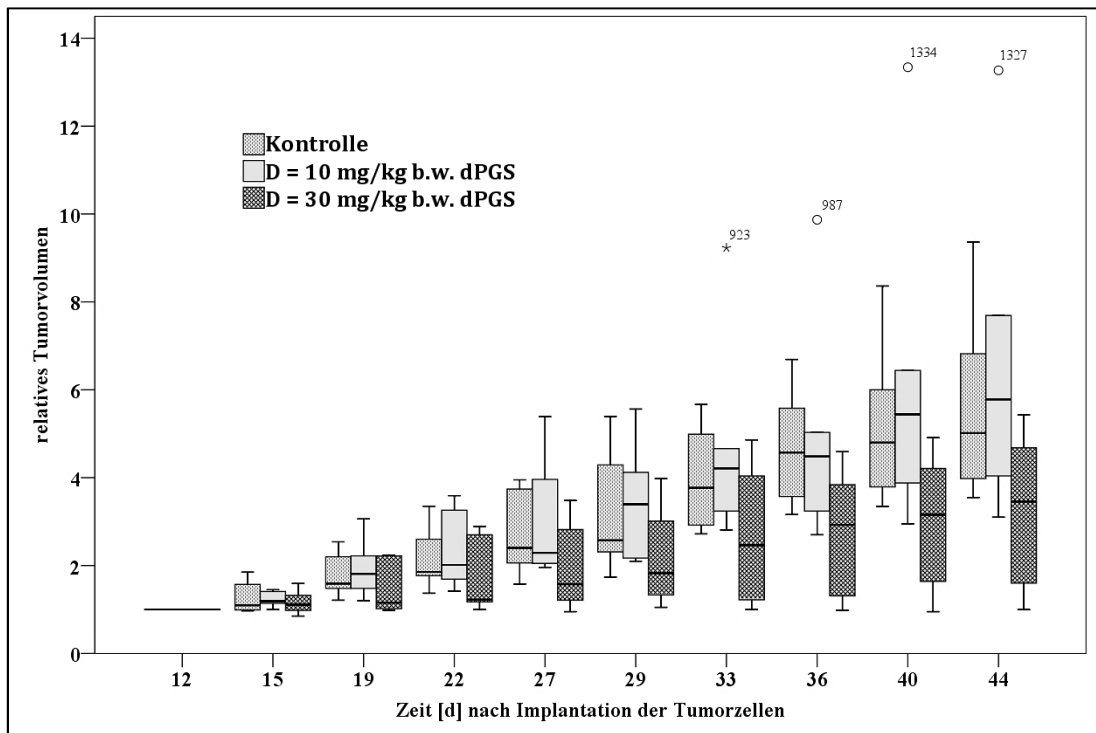


Abbildung 7

Die Behandlung mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS führte verglichen mit der Kontrollgruppe ab Tag 19 zu einer Verminderung des Medians der relativen Tumorummen (n. s.).

Darstellung der relativen Tumorummen, bezogen auf Tag 12, in Abhängigkeit von der Zeit (relatives Tumorummen am Tag 12: $RTV_{12} = 1$). Behandlung von A549-Lungentumoren in athymischen Mäusen mit (A) PBS (Kontrolle); (B) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS und (C) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS. Je Gruppe $n = 6$ Tiere.

Es wurden z. T. ausgeprägte Unterschiede der relativen Tumorummen innerhalb einer Gruppe festgestellt. Am Tag 33 (Ende der Behandlung am Tag 30) wurden in der Kontrollgruppe relative Tumorummen von $RTV = 2,7-5,7$ ($\bar{x} = 3,8$) und in der mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelten Gruppe $RTV = 1,0-4,9$ ($\bar{x} = 2,5$) gemessen. Am Ende der Nachbeobachtungsperiode (Tag 44) wurden für die Kontrollgruppe RTV in einem Bereich von $RTV = 3,6-9,4$ ($\bar{x} = 5,0$) und in der mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelten Gruppe relative Tumorummen von $RTV = 1,0-5,4$ ($\bar{x} = 3,5$) gefunden.

Die Kontrollgruppe und die mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelte Gruppe unterschieden sich in ihrem relativen Tumorummen am Tag 33 und am Tag 44 nicht signifikant (Tag 33: $p = 0,093$; Tag 44: $p = 0,093$; Mann-Whitney-U-Test f. unabh. Stichproben).

Die Mediane der RTV der mit $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS behandelten Gruppe waren teilweise höher als die Mediane der RTV der Kontrollgruppe (Abbildung 7). Das Tier B3

($D = 10 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$) zeigte ein gegenüber den anderen Tieren dieser Gruppe deutlich erhöhtes relatives Tumolvolumen (Ausreißer/Extremwert in Abbildung 7).

Es kann für jeden Tag separat der Quotient T/C (2) gebildet werden:

$$(2) T/C (Tag_k) = \frac{\text{Median des RTV } [D = \frac{30 \text{ mg}}{\text{kg}} \text{ b.w. dPGS-Gruppe (Tag}_k)]}{\text{Median des RTV [Kontrollgruppe (Tag}_k)]} \times 100 \% .$$

$k = 12; 15; 19; 22; 27; 29; 33; 36; 40; 44$

Der Quotient nahm vom Tag 12 ($T/C = 100 \%$) und dem Tag 19 ($T/C = 73 \%$) zum Tag 22 ($T/C = 66 \%$) ab. An den folgenden Messzeitpunkten verblieb der Quotient bei $T/C \approx 65 \%$ bei einem zweimaligen Anstieg auf $T/C = 71 \%$ (Tag 29) bzw. $T/C = 69 \%$ (Tag 44). Die vorwiegende Verminderung des Quotienten fand somit im Zeitraum der ersten beiden Behandlungszyklen statt (Tag 12–16; 19–23).

3.1.3. Untersuchung der Proliferation, Apoptose und des NF- κ B im Tumorgewebe

Immunhistochemische Darstellung der Proliferation durch Anti-Ki-67-Antikörper

Eine Beeinflussung des Tumolvolumens könnte durch eine verminderte Proliferation erklärt werden. Zur Darstellung der proliferierenden Gewebeanteile in den Tumoren wurde der Proliferationsmarker Ki-67 immunhistochemisch angefärbt. Ki-67-Protein wurde ursprünglich nur in proliferativ aktiven Zellen gefunden [196].

Abbildung 8 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

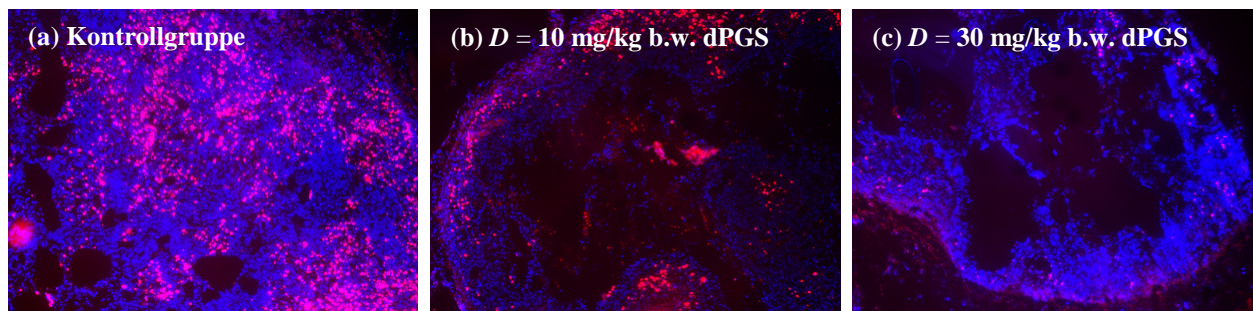


Abbildung 8

Die Behandlung mit dPGS verringerte die optische Dichte der proliferativ aktiven Zellen in den Tumorgeweben.

Repräsentative Aufnahmen von A549-Lungentumorgeweben der (a) Kontrollgruppe sowie der mit (b) $D = 10 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$ und (c) $D = 30 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$ behandelten Tiere. Kontrollbehandlung mit PBS. $n = 18$.

Immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 (rot) und Kerngegenfärbung mit DAPI (blau). Originale Vergrößerung 100x. Bilder hier gleichartig digital helligkeits- und kontrastverstärkt.

Mikroskopisch waren insbesondere im Zentrum der Tumoren in allen Gruppen Bereiche ohne Zellkernsignale erkennbar, die am ehesten nekrotischen oder apoptotischen Arealen entsprachen. Eine Quantifizierung dieser Bereiche war jedoch nicht möglich. Proliferativ aktive Zellen waren vorwiegend in Tumorrandbereichen sichtbar. Die optische Dichte proliferativ aktiver Zellen war bei Tumoren der $D = 30 \text{ mg/kg}$ b.w. dPGS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte durch Ermittlung der Ki-67-Fluoreszenz bezogen auf die DAPI-Fluoreszenz (Zellkerne). Dies entspricht dem Quotienten Q_K ([3]; $K = \text{Bildnummer}$).

$$(3) Q_K = \frac{(\text{Fluoreszenz Ki-67})_K}{(\text{Fluoreszenz DAPI})_K}$$

Abbildung 9 stellt die Analyse der einzelnen Gruppen dar.

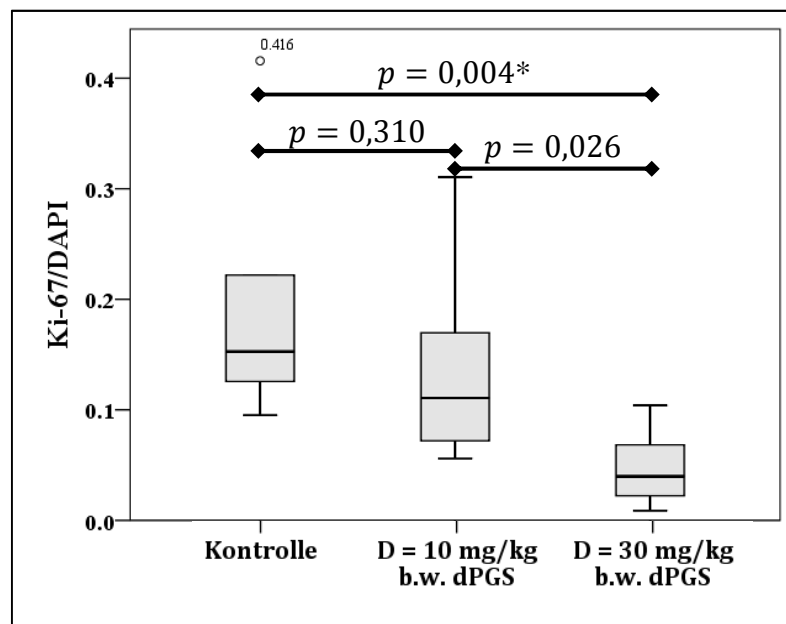


Abbildung 9

Die Behandlung mit $D = 30 \text{ mg/kg}$ b.w. dPGS reduzierte die Proliferation in mikroskopischen Aufnahmen der Lungentumoren signifikant ($p = 0,004$; Mann-Whitney-U-Test f. unabhang. Stichproben; Bonferroni-Korrektur).

Darstellung der Quotienten $Q_K = \frac{(\text{Fluoreszenz Ki-67})_K}{(\text{Fluoreszenz DAPI})_K}$, ($K = \text{Bildnummer}$), ermittelt aus mikroskopischen Aufnahmen von A549-Lungentumoren. Kontrollbehandlung mit PBS. Behandlung mit $D = 10 \text{ mg/kg}$ b.w. dPGS bzw. $D = 30 \text{ mg/kg}$ b.w. dPGS. $n = 18$ Tumoren. Ermittlung der Daten aus $n = 18$ mikroskopischen Aufnahmen.

Durch Analyse dieser Q_K -Quotienten wurden folgende Werte ermittelt ($\tilde{x} = \text{Median}$; $\bar{x} = \text{arithm. Mittel}$):

- (A) Kontrollgruppe $\tilde{x} = 0,153$; $\bar{x} = 0,194$; min = 0,095; max = 0,416,
 (B) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS $\tilde{x} = 0,111$; $\bar{x} = 0,138$; min = 0,056; max = 0,310,
 (C) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS $\tilde{x} = 0,040$; $\bar{x} = 0,047$; min = 0,009; max = 0,104.

Die Kontrollgruppe und die mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelte Gruppe unterschieden sich signifikant ($p = 0,004$; *Mann-Whitney-U-Test f. unabhang. Stichproben*)². Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,310$; *Mann-Whitney-U-Test f. unabhang. Stichproben*)². Auch beide Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,026$; *Mann-Whitney-U-Test f. unabhang. Stichproben*)².

Immunhistochemische Darstellung der Apoptose durch Anti-Caspase-3-Antikörper

Nach der Proliferation sollte auch der Einfluss einer dPGS-Behandlung auf die Apoptose untersucht werden. Für die Darstellung apoptotischer Gewebeanteile in den Lungentumoren wurde Caspase-3 angefärbt, die im Ablauf der Apoptose eine zentrale Stellung einnimmt [197].

Abbildung 10 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

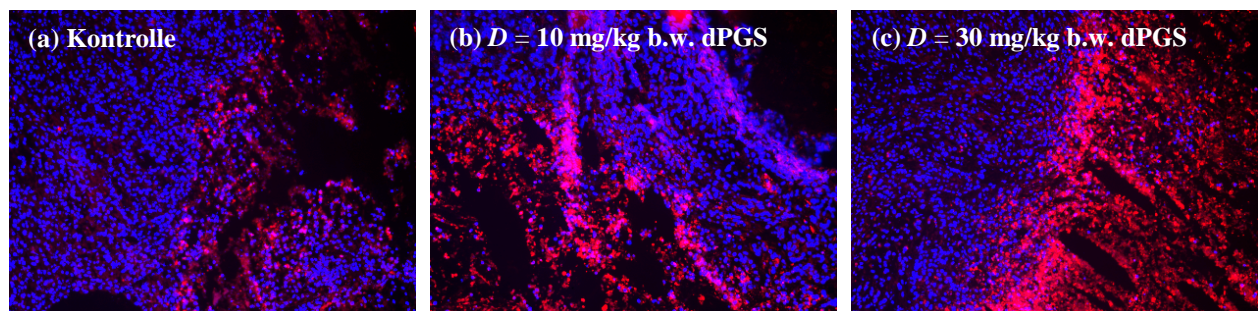


Abbildung 10

Die Behandlung mit dPGS erhöhte die optische Dichte von apoptotischen Signalen in den Tumoren.

Repräsentative Aufnahmen von A549-Lungentumorgewebe der (a) Kontrollgruppe sowie der mit (b) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS und (c) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelten Tiere. Kontrollbehandlung mit PBS. $n = 18$ Tumoren. Immunhistochemische Färbung mit Anti-Caspase-3-Antikorpere (rot) und Kerngegenfärbung mit DAPI (blau).

Originale Vergrößerung 100x. Alle Bilder hier gleichartig digital helligkeits- und kontrastverstärkt.

² Das Signifikanzniveau wurde mit der *Bonferroni-Korrektur* angepasst.

Caspase-3-positive Signale wurden insbesondere im Übergangsbereich von zentralen, apoptotischen/nekrotischen Bereichen zu zellkernmorphologisch intaktem Gewebe gefunden. Im Randbereich der Tumoren waren nur geringere Anteile an Caspase-3-positiven Signalen darstellbar. Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte durch Ermittlung der Caspase-3-Fluoreszenz bezogen auf die Zellkern-Fluoreszenz (DAPI). Dies entspricht dem Quotienten Q_K ([4]; K = Bildnummer).

$$(4) Q_K = \frac{(\text{Fluoreszenz Caspase-3})_K}{(\text{Fluoreszenz DAPI})_K}$$

Die Auswertung dieses Quotienten für die einzelnen Gruppen ist in Abbildung 11 gezeigt.

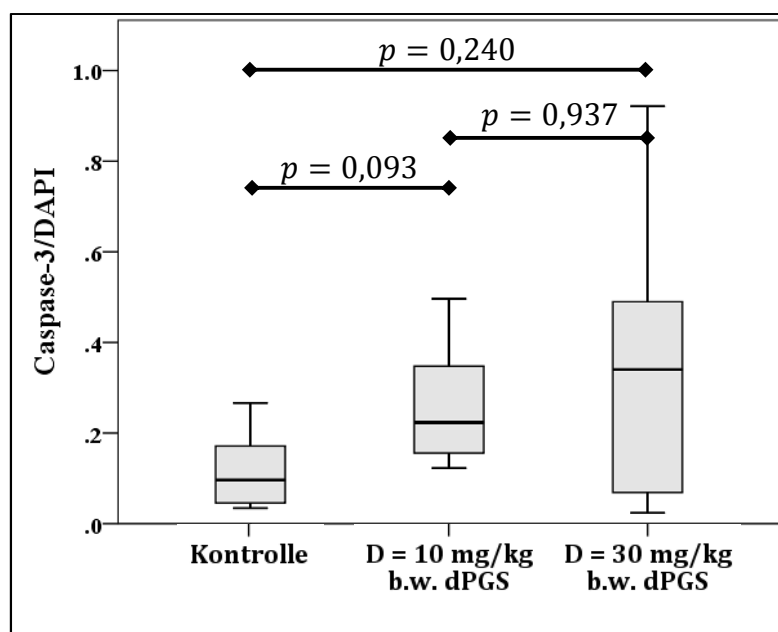


Abbildung 11

Nach Behandlung mit $D = 10$ bzw. 30 mg/kg b.w. dPGS war der Median der Caspase-3/DAPI-Fluoreszenz erhöht.

Darstellung der Quotienten $Q_K = \frac{(\text{Fluoreszenz Caspase-3})_K}{(\text{Fluoreszenz DAPI})_K}$, (K = Bildnummer), ermittelt aus mikroskopischen Aufnahmen von A549-Lungentumorgewebe. Kontrollbehandlung mit PBS. Behandlung mit $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS bzw. $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS. $n = 18$ Tumoren.

Ermittlung des Quotienten Q_K aus $n_A = 18$ (Kontrolle); $n_B = 17$ ($D = 10$ mg/kg b.w. dPGS) und $n_C = 15$ ($D = 30$ mg/kg b.w. dPGS) mikroskopischen Aufnahmen. Daten vor Analyse auf die jeweiligen Tiere aggregiert.

Durch Analyse der Q_K -Werte wurden folgende Werte ermittelt (\tilde{x} = Median; \bar{x} = arithm. Mittel):

(A) Kontrollgruppe $\tilde{x} = 0,097$; $\bar{x} = 0,119$; min = 0,034; max = 0,267,

(B) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS $\tilde{x} = 0,224$; $\bar{x} = 0,261$; min = 0,122; max = 0,496,

(C) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS $\tilde{x} = 0,340$; $\bar{x} = 0,364$; min = 0,024; max = 0,921.

Während die mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelte Gruppe im Median das höchste Caspase-3/DAPI-Verhältnis aufwies, zeigte die Kontrollgruppe den niedrigsten Median der Quotienten Caspase-3/DAPI.

Die $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS sowie die mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelte Gruppe unterschieden sich zur Kontrollgruppe hinsichtlich der Caspase-3/DAPI-Fluoreszenz nicht signifikant ($p = 0,093$ bzw. $p = 0,240$; *Mann-Whitney-U-Test f. unabh. Stichproben*)³. Beide Behandlungsgruppen unterschieden sich hinsichtlich der Caspase-3/DAPI-Fluoreszenz ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,937$; *Mann-Whitney-U-Test f. unabh. Stichproben*)³.

Immunhistochemische Darstellung der Verteilung von NF- κ B

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dPGS den Transkriptionsfaktor NF- κ B binden kann [157, 158], der eine zentrale Stellung in der Pathogenese maligner Tumoren einnimmt [34]. Die Darstellung von NF- κ B erfolgte zur Untersuchung der Anzahl und Verteilung positiver Zellkerne (aktive Form des Transkriptionsfaktors). Es sollte die Frage beantwortet werden, ob NF- κ B durch dPGS beeinflusst wird.

Abbildung 12 zeigt repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung.

³ Das Signifikanzniveau wurde mit der *Bonferroni-Korrektur* angepasst.

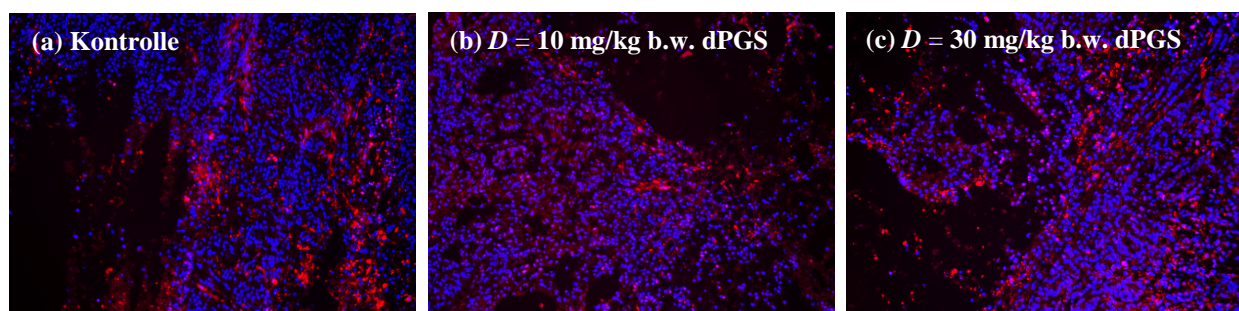


Abbildung 12

Die Verteilung der NF-κB-positiven Zellkerne war in den Geweben sehr inhomogen. Eine eindeutige Veränderung der Anzahl oder Verteilung der NF-κB-positiven Zellkerne konnte nicht erkannt werden.

Repräsentative Aufnahmen von A549-Lungentumorgewebe der (a) Kontrollgruppe sowie der mit (b) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS und (c) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelten Tiere. $n = 18$. Immunhistochemische Anfärbung mit Anti-NF-κB-p65-Antikörper (rot) und Kerngegenfärbung mit DAPI (blau). Das biologisch aktive NF-κB im Zellkern erscheint durch Überlagerung violett.

Originale Vergrößerung 100x. Alle Bilder hier gleichartig digital helligkeits- und kontrastverstärkt.

Es zeigte sich innerhalb der drei Gruppen eine inhomogene Verteilung von NF-κB in den Zellkernen. Eine eindeutige Veränderung der Anzahl oder der Verteilung von NF-κB-positiven Zellkernen konnte optisch nicht erkannt werden. Zwischen verschiedenen Bereichen innerhalb einer Aufnahme gab es in der Dichte von NF-κB-positiven Zellkernen teilweise erhebliche Unterschiede. Häufig waren NF-κB-positive Zellkerne in einem umschriebenen Bereich zu finden.

Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte durch Ermittlung der ausgezählten NF-κB-positiven Zellkerne bezogen auf die Zellkern-Fluoreszenz (DAPI). Dies entspricht dem Quotienten Q_K ([5]; $K =$ Bildnummer).

$$(5) Q_K = \frac{(\text{Anzahl NF-}\kappa\text{B-positiver Zellkerne})_K}{(\text{Fluoreszenz DAPI})_K}$$

Die daraus abgeleitete numerische Auswertung ist in Abbildung 13 dargestellt.

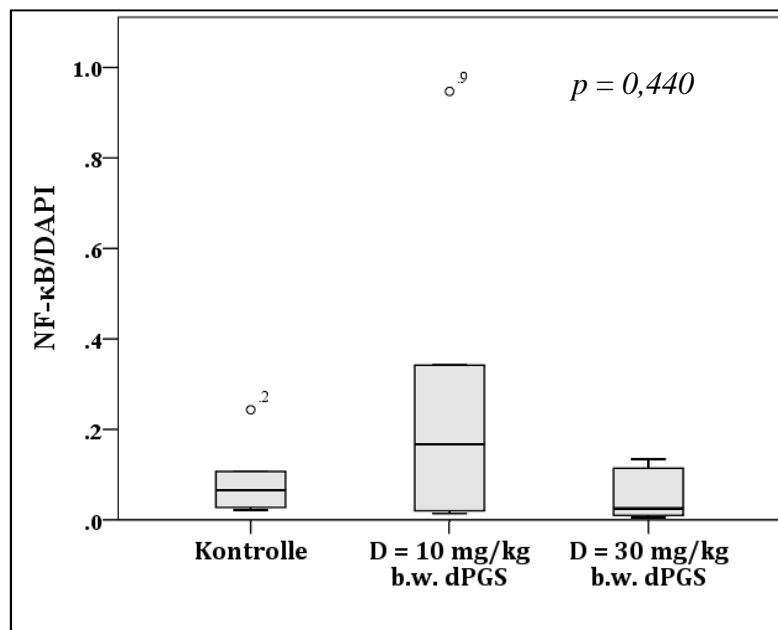


Abbildung 13

Die Zahl der NF-κB-positiven Zellkerne wurde durch die Behandlung mit dPGS nicht signifikant verändert ($p = 0,440$; *Kruskal-Wallis-Test f. unabh. Stichproben*).

Darstellung der Quotienten $Q_K = \frac{(\text{Anzahl NF-}\kappa\text{B-positiver Zellkerne})_K}{(\text{Fluoreszenz DAPI})_K}$, ($K = \text{Bildnummer}$), ermittelt aus mikroskopischen Aufnahmen von A549-Lungentumorgewebe. Kontrollbehandlung mit PBS. Behandlung mit $D = 10 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$ bzw. $D = 30 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$. $n = 18$ Tumoren. Ermittlung des Quotienten aus $n_A = 10$ (Kontrolle); $n_B = 8$ ($D = 10 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$) und $n_C = 6$ ($D = 30 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$) mikroskopischen Aufnahmen. Daten vor Analyse auf die jeweiligen Tiere aggregiert.

Zwischen den Gruppen zeigte sich hinsichtlich der Anzahl NF-κB-positiver Zellkerne kein signifikanter Unterschied ($p = 0,440$; *Kruskal-Wallis-Test f. unabh. Stichproben*).

3.1.4. Toluidinblau- und Alcianblaufärbung

Toluidinblau

Die Toluidinblaufärbung färbt Mastzellen metachromatisch violett an [198]. Grundlage der Färbung ist die Darstellung des Heparins in den Mastzellgranula [198]. Mithilfe der Toluidinblaufärbung sollte initial untersucht werden, ob die Behandlung mit dPGS einen Einfluss auf die Mastzellen ausübte.

Abbildung 14 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Tumorgewebe nach der Toluidinblaufärbung.

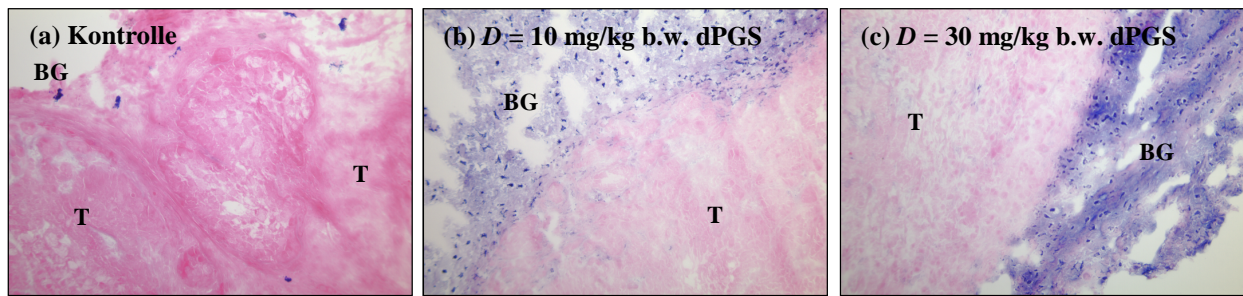


Abbildung 14

Nach Behandlung mit $D = 10$ und 30 mg/kg b.w. dPGS erhöhte sich die sichtbare Färbung des tumorumgebenden Bindegewebes mit Toluidinblau.

Repräsentative Aufnahmen der A549-Lungentumoren behandelt mit (a) PBS; (b) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS bzw. (c) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS. Toluidinblaufärbung und Gegenfärbung mit Eosin (rot).

Originale Vergrößerung 200x. BG: Bindegewebe; T: Tumorgewebe.

Nach der Toluidinblaufärbung zeigten sich in der Kontrollgruppe vereinzelte, im Bindegewebe und vorwiegend am Tumorausrand befindliche gefärbte Zellen, deren Morphologie Mastzellen entsprechen könnte.

In der mit $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS behandelten Gruppe war die sichtbare Färbung durch Toluidinblau deutlich verstärkt. Es zeigte sich eine erhöhte Anzahl gefärbter Zellen im tumorumgebenden Gewebe, nicht jedoch im Tumorgewebe selbst. Die Verteilung des Toluidinblaus war dabei homogen im Bindegewebe um den Tumor darstellbar. Ein vergleichbares Ergebnis war auch für die mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS behandelte Gruppe erkennbar, wobei die optische Färbintensität über der zuvor genannten Gruppe lag. In geringerem Maße färbten sich auch Bereiche innerhalb der Tumoren an. Letztgenannte Anfärbungen könnten Bindegewebe und Blutgefäße repräsentieren. Tumorzellen wurden in keiner Gruppe durch Toluidinblau angefärbt.

Alcianblau

Die folgenden Ergebnisse und Abbildungen sind bereits veröffentlicht worden: [199].

Mit der Methode nach Lev et Spicer kann Alcianblau genutzt werden, um stark sulfatierte Glykosaminoglykane anzufärben [174]. Da dPGS ebenfalls ein stark sulfatiertes Makromolekül ist [143], könnte es möglicherweise mit Alcianblau dargestellt werden.

Abbildung 15 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Alcianblaufärbung bei den Lungentumorgeweben.

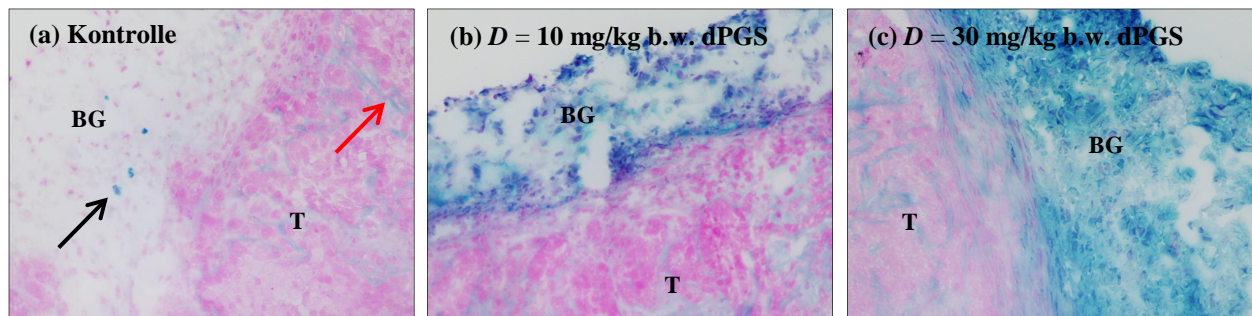


Abbildung 15

Nach der Behandlung mit $D = 10$ bzw. 30 mg/kg b.w. dPGS war eine verstärkte Anfärbung des tumorumgebenden Bindegewebes durch Alcianblau darstellbar.

Repräsentative Aufnahmen der A549-Lungentumoren behandelt mit (a) PBS; (b) $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS bzw. (c) $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS. Färbung der Gewebe mit Alcianblau und Gegenfärbung mit Kernechtrot. Originale Vergrößerung 200x. Kennzeichnung von möglichen Mastzellen ([a], schwarzer Pfeil) und intratumoralen, bindegewebigen Anteilen (roter Pfeil).

T: Tumorgewebe; BG: Bindegewebe.

In der Kontrollgruppe wurden Einzelzellen angefärbt, die vorwiegend im tumorumgebenden Bindegewebe am Tumorausßenrand lokalisiert sind (Abbildung 15 [a]; schwarzer Pfeil). Der Morphologie folgend könnten diese Mastzellen darstellen. Blutgefäße sowie die tumorumgebenden/durchziehenden Bindegewebe wurden nur schwach bläulich angefärbt (Abbildung 15 [a]; roter Pfeil).

In Geweben der mit $D = 10$ bzw. 30 mg/kg b.w. dPGS behandelten Tiere zeigte sich, neben der schwach-bläulichen Anfärbung von intratumoralem Bindegewebe, eine optisch deutlich intensive Alcianblaufärbung im Bindegewebe am Tumorausßenrand. Tumorzellen wurden nicht durch Alcianblau gefärbt. Die Verteilung der Alcianblaufärbung war mit den Ergebnissen der Toluidinblaufärbung vergleichbar.

Eine Hyaluronidasebehandlung vor der Alcianblaufärbung kann die Anfärbung von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat vermindern [200]. Abbildung 16 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Lungentumoren mit bzw. ohne Hyaluronidasebehandlung [Hy(+) bzw. Hy(-)].

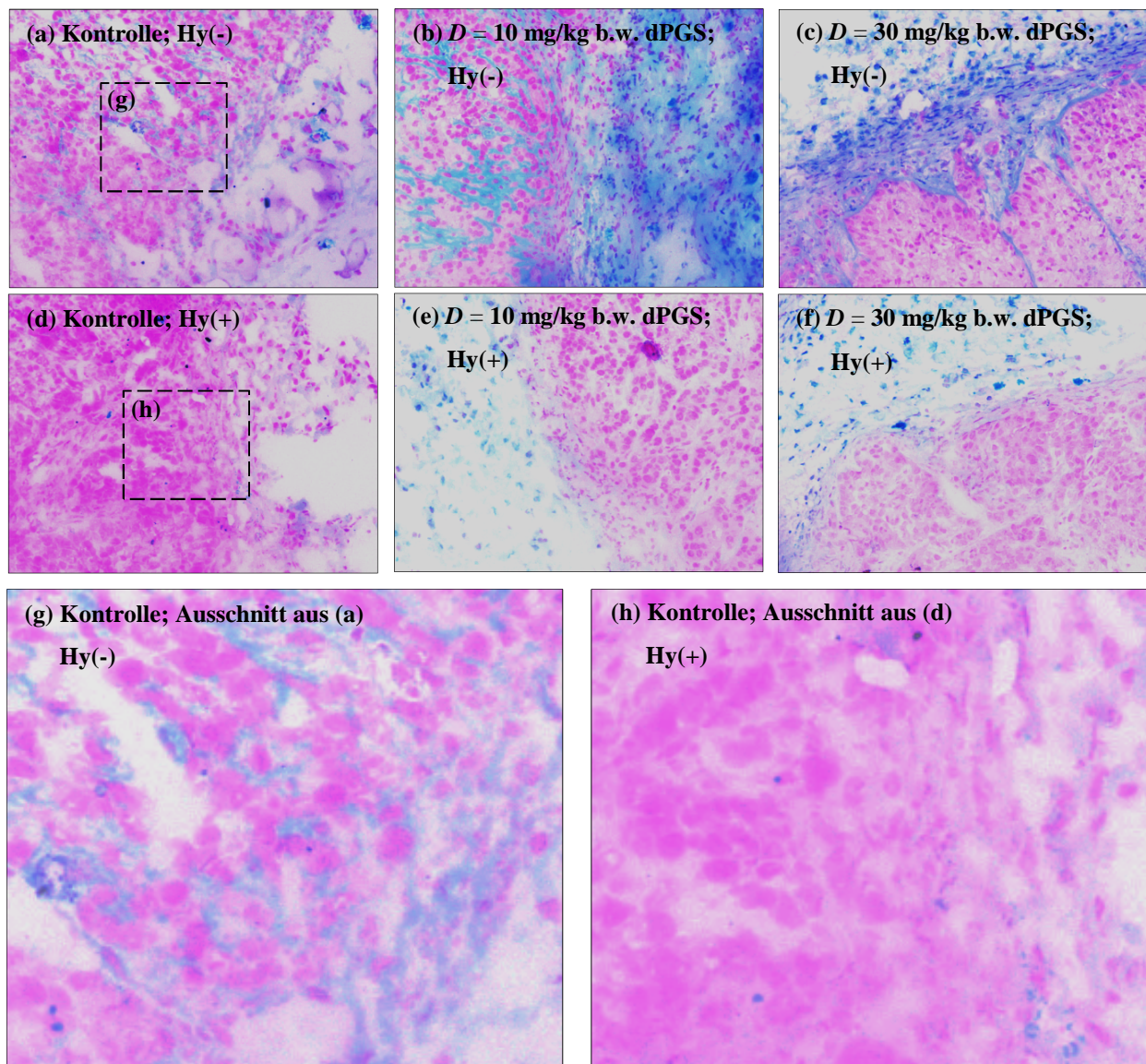


Abbildung 16

Eine Hyaluronidasevorbehandlung vor der Alcianblaufärbung verminderte den bindegewebigen, unspezifischen Hintergrund.

Repräsentative Aufnahmen der A549-Lungentumoren behandelt mit (a; d) PBS, (b; e) $D = 10 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$ bzw. (c; f) $D = 30 \text{ mg/kg b.w. dPGS}$. Färbung der Gewebe mit Alcianblau und Gegenfärbung mit Kernechtrot. (a–c; g) Kontrollen ohne Hyaluronidasebehandlung [Hy(-)], (d–f; h) mit Hyaluronidasebehandlung [Hy(+)]. Gegenfärbung mit Kernechtrot.

Originale Vergrößerung (a–f) 200x; (g; h) digitale Vergrößerung aus den Bildern (a) bzw. (d).

Alle Bilder hier gleichartig digital kontrast- und helligkeitsverbessert.

Die Hyaluronidasevorbehandlung verminderte die Anfärbung des tumordurchziehenden Bindegewebes deutlich. Bindegewebige Septen waren im Vergleich mit den zuvor gezeigten Ergebnissen kaum noch darstellbar. Vereinzelt Zellen verblieben jedoch gut sichtbar gefärbt.

In beiden behandelten Gruppen waren nach Hyaluronidasebehandlung am Tumorausßenrand Zellen sichtbar, die stark Alcianblau-positiv waren. Neben diesen Einzelzellen werden auch interstitielle Anteile des tumorumgebenden Gewebes dargestellt; dies jedoch mit optisch geringerer Färbeintensität verglichen zu Aufnahmen ohne Hyaluronidasebehandlung. Das Tumorgewebe selbst war frei von deutlichen Färbungen durch Alcianblau.

3.2. Untersuchungen der Zytotoxizität von dPGS-Konjugaten *in vitro*

Eine kovalente Bindung von Zytostatika (PTX, CAB, DXR, MTX) an dPGS (dPGSamin, dPGSazid) könnte die zuvor dargestellte Wirkung des dPGS *in vivo* verbessern und dieses möglicherweise als Drug-Targeting-System genutzt werden. Deshalb wurden verschiedene kovalente dPGS-Zytostatika-Konjugate synthetisiert (mivenion® GmbH, Berlin) und *in vitro* auf ihre Wirksamkeit untersucht.

3.2.1. Zytotoxizitätsscreening kovalenter dPGS-Zytostatika-Konjugate

Die Zytotoxizität kovalenter dPGS-Zytostatika-Konjugate wurde anhand von 14 Konjugaten auf 7 Zelllinien gescreent. Die ermittelten IC_{50} -Werte der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung sind in Tabelle 13 (Seite 64 f.) dargestellt.

PTX und dPGS-PTX-Konjugate

Die Zelllinien wiesen eine unterschiedliche Sensibilität für PTX auf. Die ermittelten IC_{50} -Werte befanden sich im Bereich von $IC_{50} = 2 \text{ nmol/l}$ (U937) bis $IC_{50} > 135 \text{ nmol/l}$ (SK-Hep-1). Die Wirksamkeit des dPGSazid-PTX-(1) und der Konjugate dPGSamin-PTX-(2 bzw. 3) war auf allen Zelllinien im Vergleich zu PTX vermindert. Bei SK-Hep-1- und A431-Zellen wies dPGSamin-PTX-(4) einen niedrigeren IC_{50} -Wert als PTX auf. Für dPGSamin-PTX-(5) zeigten sich bei den Zelllinien QGP-1, HCT-116, U937 und A431 IC_{50} -Werte, die vergleichbar mit PTX oder gegenüber PTX vermindert waren. Auch für dPGSamin-PTX-(6) konnte mit $IC_{50} = 15 \text{ nmol/l}$ bei A431-Zellen ein im Vergleich zu PTX ($IC_{50} = 95 \pm 78 \text{ nmol/l}$) vermindertes IC_{50} -Wert ermittelt werden. Zusätzlich war die Herstellung des dPGS-Anteils gegenüber den anderen dPGS-PTX-Konjugaten verbessert worden (automatisierter Batch-Prozess des dPGSamin). dPGSamin-PTX-(6) wurde deshalb für die weitere Analyse ausgewählt.

CAB und dPGS-CAB-Konjugate

Nur QGP-1- und A2780-Zellen wiesen für CAB IC_{50} -Werte im untersuchten Bereich auf. Für die anderen Zelllinien wurden die Werte zumindest teilweise mit Hilfsfunktionen ermittelt. Das

Konjugat dPGSazid-CAB-(1) zeigte bei U937- und A431-Zellen vergleichbare bzw. niedrigere IC_{50} -Werte als CAB. Die IC_{50} -Werte des dPGSamin-CAB-(5) waren mit den IC_{50} -Werten von CAB vergleichbar oder verbessert.

Im Vergleich dazu wiesen das hochbeladene dPGSamin-CAB-(6) sowie die Konjugate dPGSamin-CAB-(2 bzw. 3) i. d. R. keine oder eine im Vergleich zu CAB verminderte inhibitorische Wirkung auf.

MTX und dPGSamin-MTX-(2)

Ermittelte IC_{50} -Werte ergaben bei der Inkubation für $t = 48$ h bzw. $t = 96$ h für dPGSamin-MTX-(2) bei jeder Zelllinie eine im Vergleich zu MTX deutlich verminderte zytotoxische Wirkung. dPGSamin-MTX-(2) war nach $t = 48$ h Inkubationszeit bei keiner Zelllinie inhibitorisch wirksam und wies auch nach $t = 96$ h Inkubationszeit IC_{50} -Werte von $IC_{50} = 500$ nmol/l bis zu $IC_{50} > 2000$ nmol/l auf. Weder MTX noch dPGSamin-MTX-(2) zeigten eine Wachstumsinhibition bei HCT-116- oder SK-Hep-1-Zellen nach $t = 48$ h Inkubationszeit.

DXR und dPGSamin-DXR-(1)

Bei der Inkubation von DXR wurden IC_{50} -Werte von $IC_{50} = 35$ nmol/l (QGP-1) bis $IC_{50} = 450$ nmol/l (A549) ermittelt. Die Wirksamkeit von dPGSamin-DXR-(1) war im Vergleich zu DXR bei jeder Zelllinie deutlich vermindert. Die IC_{50} -Werte von dPGSamin-DXR-(1) entsprachen z. T. $IC_{50} > 10.000$ nmol/l, wobei der niedrigste IC_{50} -Wert mit $IC_{50} = 1300$ nmol/l (QGP-1) ermittelt wurde.

Tabelle 13

Übersicht über ermittelte IC₅₀-Werte von dPGS-Kontrollen, Zytostatika und dPGS-Zytostatika-Konjugaten. Dargestellt sind einzeln ermittelte IC₅₀-Werte bzw. Mittelwerte unabhängiger Versuche.

Kennzeichnung von Mittelwerten und Angabe der Standardabweichung mit „†“, n = 1–5 Experimente. Kennzeichnung von Werten, welche mittels nichtlinearer Regressionen ermittelt wurden, mit „‡“. Der IC₅₀-Wert lag dabei außerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches und wurde theoretisch bestimmt. n. i.: nicht inhibierend. -: Wert nicht ermittelt. (Mittel-)Werte, die > 5 waren, wurden auf 5 bzw. 10 gerundet.

Wirkstoff	Zelllinie							
		A549	A2780	QGP-1	HCT-116	U937	A431	SK-Hep-1
dPGSazid-K1	[μM]	n. i.	20‡	n. i.	-	n. i.	20‡	n. i.
dPGSamin-K1	[μM]	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.
dPGSamin-K2	[μM]	n. i.	45‡	20‡	n. i.	-	20‡	n. i.
dPGSamin-K3	[nM]	n. i.	> 100	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.
Paclitaxel (PTX)	[nM]	75±29†‡; n = 3	4±2†; n = 4	5±1†; n = 4	10±1†; n = 4	2±1†; n = 3	95±78†‡; n = 2	135‡;> 100; > 100
dPGSazid-PTX-(1)	[nM]	135‡	55	35	25	35	100	700
dPGSamin-PTX-(2)	[nM]	215‡	60	60	55	45	115‡	> 1000
dPGSamin-PTX-(3)	[nM]	130‡	35	80	50±31†; n = 2	20	100	125‡
dPGSamin-PTX-(4)	[nM]	100	35	25	20	5	15	90
dPGSamin-PTX-(5)	[nM]	100	15	10	5	4	65	> 100
dPGSamin-PTX-(6) ⁴	[nM]	125‡	40	35	25	10	15	175‡

⁴ IC₅₀-Wert korrigiert auf die Beladung des Polymers mit dem zytotoxisch aktiven Wirkstoffanteil (PTX)

Chlorambucil (CAB)	[μ M]	40 \pm 6 \ddagger ; n = 4	5 \pm 1 \ddagger ; n = 3	5 \pm 1 \ddagger ; n = 3	30 \pm 9 \ddagger ; n = 5	10 \pm 7 \ddagger ; n = 3	15 \pm 6 \ddagger ; n = 2	n. i.; n = 3
dPGSazid-CAB-(1)	[μ M]	35 \ddagger	6	5	20 \ddagger	5	5	n. i.
dPGSamin-CAB-(2)	[μ M]	n. i.	15 \ddagger	24 \ddagger	n. i.	30 \ddagger	n. i.	n. i.
dPGSamin-CAB-(3)	[μ M]	n. i.	25 \ddagger	100 \ddagger	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.
dPGSamin-CAB-(4) ⁵	[μ M]	100 \ddagger	10	10	30 \ddagger	10	20 \ddagger	30 \ddagger
dPGSamin-CAB-(5) ⁵	[μ M]	20	5	5	10	5	5	60 \ddagger
dPGSamin-CAB-(6)	[μ M]	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.
Methotrexat (MTX)								
<i>t</i> = 48 h	[nM]	140 \ddagger	> 100	65	n. i.	50	\ddagger 175	n. i.
dPGSamin-MTX-(2)	[nM]	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.
<i>t</i> = 48 h								
MTX								
<i>t</i> = 96 h	[nM]	30	15	10	-	5	10	-
dPGSamin-MTX-(2)	[nM]	> 2000	700	500	-	1600	840	-
<i>t</i> = 96 h ⁶								
Doxorubicin (DXR)	[nM]	450	90	35	230	45	250	260
dPGSamin-DXR-(1)	[nM]	n. i.	5000	1300	n. i.	> 10.000	> 10.000	> 10.000

Anmerkung: Die Konjugate dPGSamin-MTX-(1; 3–6) und dPGSamin-DXR-(2–6) wurden nicht synthetisiert.

⁵ IC₅₀-Wert korrigiert auf die Beladung des Polymers mit dem zytotoxisch aktiven Wirkstoffanteil (CAB)

⁶ IC₅₀-Wert korrigiert auf die Beladung des Polymers mit dem zytotoxisch aktiven Wirkstoffanteil (MTX)

3.2.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Zytotoxizität von PTX und dPGSamin-PTX-(6)

Die folgenden Ergebnisse und Graphiken sind bereits veröffentlicht worden: [155].

Im Screening zeigte das Konjugat dPGSamin-PTX-(6) insbesondere bei A431-Zellen gegenüber PTX eine verbesserte Wirksamkeit und wurde als Konjugat für detaillierte Untersuchungen ausgewählt.

Abbildung 17 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) bei A431-Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

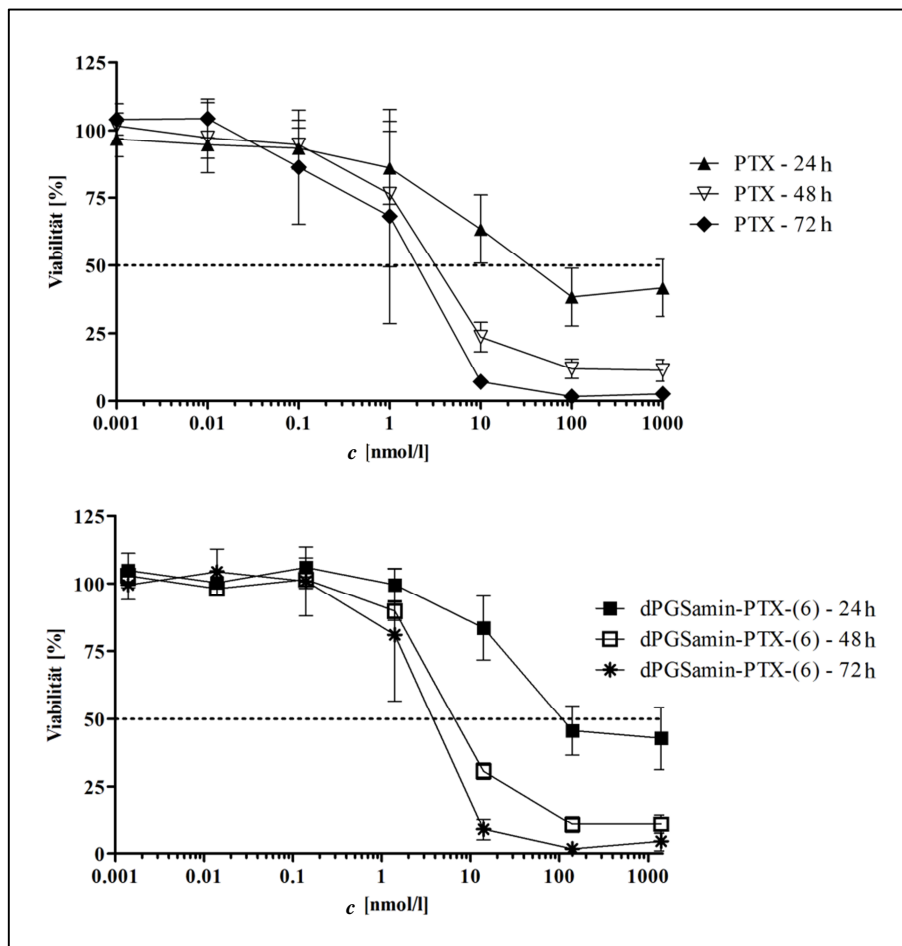


Abbildung 17

Mit zunehmender Inkubationszeit verringerten sich die IC_{50} -Werte für PTX und dPGSamin-PTX-(6). dPGSamin-PTX-(6) wies im Vergleich zu PTX höhere IC_{50} -Werte auf.

Darstellung der *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) bei A431-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. $n = 3$ (PTX) und $n = 4$ (dPGSamin-PTX-(6)).

Neben A431-Zellen (Vulvakarzinom) wurden auch A549-Zellen (Lungentumor) untersucht, da PTX klinisch bei Lungentumoren eingesetzt wird und die Wirksamkeit von dPGS *in vivo* an einem A549-Lungentumor im Mausmodell untersucht worden ist (Kapitel 3.1.). Aus den ermittelten Viabilitäten wurden IC₅₀-Werte für beide Zelllinien berechnet (Tabelle 14).

Tabelle 14

Übersicht über die errechneten IC₅₀-Werte für die Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) auf A431- und A549-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ($t = 24$ h; 48 h; 72 h). Angabe des 95 %-Konfidenzintervalls (95 % C. I.) und des Bestimmtheitsmaßes der Funktion (R^2).

n = Anzahl unabhängiger Versuche.

Zelle	Wirkstoff	$t = 24$ h			$t = 48$ h			$t = 72$ h		
		IC ₅₀ [nmol/l]	95 % C. I. [nmol/l]	R^2	IC ₅₀ [nmol/l]	95 % C. I. [nmol/l]	R^2	IC ₅₀ [nmol/l]	95 % C. I. [nmol/l]	R^2
A431	PTX (n = 3)	89,0	33,3–238	0,83	3,3	1,9–6	0,92	1,7	0,9–3,2	0,9
A431	dPGSamin-PTX-(6) (n = 4)	311	157–615	0,84	7,6	6–9,5	0,98	3,4	2,3–5,1	0,95
A549	PTX (n = 3)	240	93,2–618	0,85	14,5	7,3–28,9	0,92	2,6	1,3–5,3	0,91
A549	dPGSamin-PTX-(6) (n = 3)	591	286–1223	0,89	57,2	35,6–91,9	0,95	9,5	6,6–13,8	0,97

Für beide Wirkstoffe konnte bei beiden Zelllinien mit Zunahme der Inkubationszeit eine Verminderung der IC₅₀-Werte festgestellt werden.

Die IC₅₀-Werte von PTX waren bei beiden Zelllinien und zu jedem Messzeitpunkt im Vergleich zu den entsprechenden IC₅₀-Werten von dPGSamin-PTX-(6) vermindert. Die IC₅₀-Werte von PTX und dPGSamin-PTX-(6) der $t = 48$ h-Inkubation unterschieden sich bei A431-Zellen signifikant (PTX: IC₅₀ = 3,3 nmol/l; 95 % C. I. = 1,9–6 nmol/l; dPGSamin-PTX-(6): IC₅₀ = 7,6 nmol/l; 95 % C. I. = 6–9,5 nmol/l; *Intervallvergleich*). Auch die IC₅₀-Werte von PTX nach $t = 48$ h Inkubation bei A549-Zellen (IC₅₀ = 14,5 nmol/l; 95 % C. I. = 7,3–28,9 nmol/l) wiesen im Vergleich zu den IC₅₀-Werten von dPGSamin-PTX-(6) (IC₅₀ = 57,2 nmol/l; 95 % C. I. = 35,6–91,9 nmol/l) einen signifikanten Unterschied auf (*Intervallvergleich*). Ebenfalls signifikant unterschieden sich die IC₅₀-Werte bei A549-Zellen nach $t = 72$ h (PTX: IC₅₀ = 2,6 nmol/l; 95 % C. I. = 1,3–5,3 nmol/l; dPGSamin-PTX-(6): IC₅₀ = 9,5 nmol/l, 95 % C. I. = 6,6–13,8 nmol/l; *Intervallvergleich*).

Insbesondere bei PTX wurden hohe Intertestabweichungen der Viabilität bei einer Konzentration von $c = 1 \text{ nmol/l}$ gefunden.

3.2.3. Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) auf HUVEC-Zellen

Zur weiteren Einschätzung der *In-vitro*-Zytotoxizität von dPGSamin-PTX-(6) war die Evaluation bei nicht-malignen Zellen notwendig. Dafür wurden die Substanzen PTX und dPGSamin-PTX-(6) auf HUVEC-Zellen inkubiert. Abbildung 18 zeigt die ermittelten *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen.

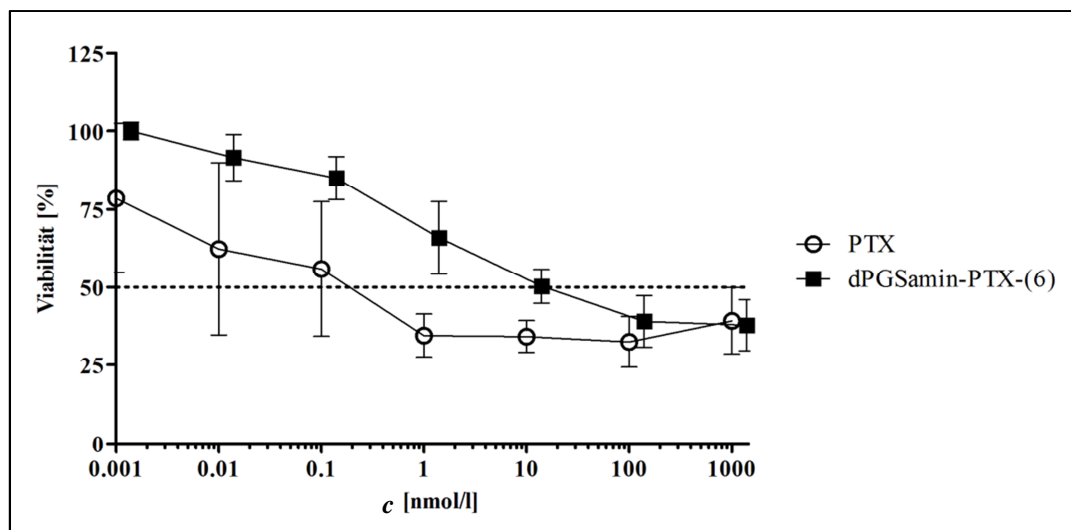


Abbildung 18

Das Konjugat dPGSamin-PTX-(6) zeigte im Vergleich zu PTX bei nicht-malignen HUVEC-Zellen eine verminderte zytotoxische Wirksamkeit.

Darstellung der *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) bei HUVEC-Zellen. Inkubationszeit: $t = 72 \text{ h}$. $n = 4$.

Durch Regression wurden die in Tabelle 15 gezeigten IC_{50} -Werte errechnet.

Tabelle 15

Übersicht über errechnete IC_{50} -Werte für die Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) bei HUVEC-Zellen. Inkubationszeit $t = 72 \text{ h}$. Angabe der 95 %-Konfidenzintervalle (95 % C. I.) und des Bestimmtheitsmaßes (R^2). $n = 4$.

Substanz	IC_{50} -Wert [nmol/l]	95 % C. I. [nmol/l]	R^2
PTX	0,45	0,05–4,2	0,23
dPGSamin-PTX-(6)	40,0	18,6–86,1	0,86

Der IC_{50} -Wert von PTX ($IC_{50} = 0,45 \text{ nmol/l}$; 95 % C. I. = 0,05–4,2 nmol/l) war bei der Inkubation auf HUVEC-Zellen gegenüber dem IC_{50} -Wert von dPGSamin-PTX-(6) ($IC_{50} = 40 \text{ nmol/l}$; 95 % C. I. = 18,6–86,1 nmol/l) signifikant vermindert (*Intervallvergleich*).

Hohe Intertestabweichungen der Viabilität, insbesondere bei $c \leq 0,1 \text{ nmol/l}$ PTX, führten zu hohen Viabilitätsspannweiten, in deren Folge das 95 %-Vertrauensintervall des IC_{50} -Wertes für PTX eine große Spannweite annahm. Bei dPGSamin-PTX-(6) waren im Vergleich zu PTX geringere Intertestabweichungen zu verzeichnen.

3.2.4. Einfluss der Sulfatierung auf die Zytotoxizität von dPGSamin-PTX-(6)

Teilergebnisse des folgenden Abschnittes sind bereits veröffentlicht worden: [155].

Im Vergleich zu dPGS-Fluorochrom-Konjugaten werden dPG-Fluorochrom-Konjugate nur marginal aufgenommen [144]. Anhand von *In-vitro*-Zytotoxizitätstests sollte untersucht werden, ob dPGamin-PTX im Vergleich zu dPGSamin-PTX-(6) demzufolge auch eine verminderte Wirkung aufweist.

Abbildung 19 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei A431-Zellen (aus Gründen der Übersicht sind nur einige Konjugate aufgeführt).

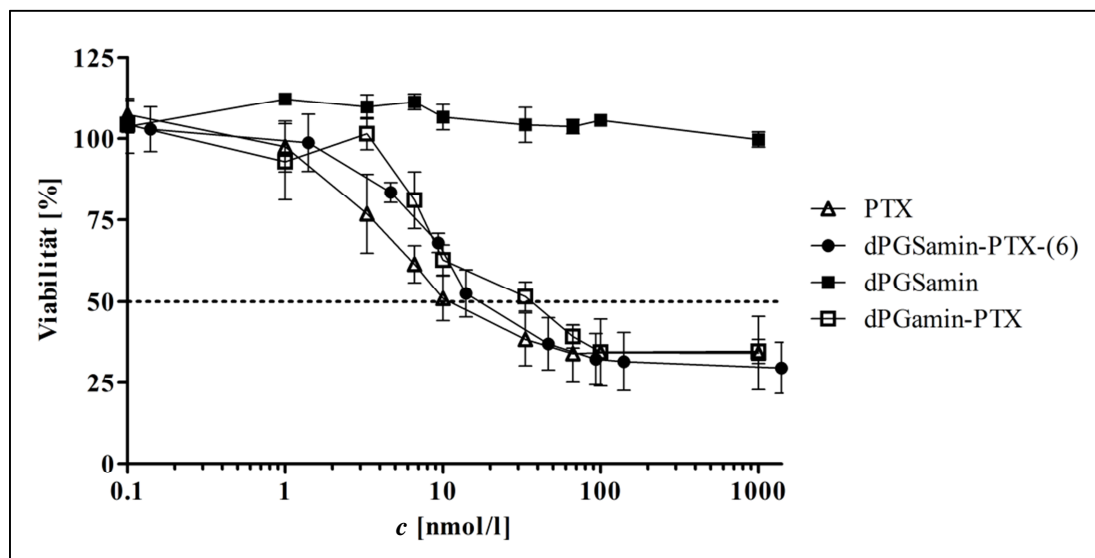


Abbildung 19

PTX und dPGSamin-PTX-(6) wiesen eine vergleichbare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung auf. Auch die Inkubation von dPGamin-PTX induzierte eine Viabilitätsminderung, während die Inkubation von dPGSamin zu keiner Abnahme der Viabilität führte.

Darstellung der *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von PTX, dPGSamin-PTX-(6), dPGamin-PTX und dPGSamin bei A431-Zellen. Inkubationszeit: $t = 48 \text{ h}$. $n = 3-4$.

Tabelle 16 fasst die errechneten IC_{50} -Werte der Konjugate zusammen.

Tabelle 16

Übersicht über errechnete IC_{50} -Werte für die Inkubation verschiedener Substanzen auf A431-Zellen ohne vorherige Adhärenz der Zellen über Nacht. Angabe des 95 %-Konfidenzintervalls (95 % C. I.), des Bestimmtheitsmaßes der Funktion (R^2) und der Anzahl unabhängiger Experimente (n). n. i.: nicht inhibierend.

Substanz	n	IC_{50} -Wert [nmol/l]	95 % C. I. [nmol/l]	R^2
PTX	n = 3	24,1	14,1–41,2	0,79
dPGSamin-PTX-(6)	n = 4	33,0	23,1–47,0	0,84
dPGSamin-PTX-(6)-45 % Sulfat	n = 4	44,4	31,8–62,0	0,84
dPGSamin-PTX-(6)-15 % Sulfat	n = 4	40,5	26,9–60,9	0,81
dPGamin-PTX	n = 3	50,1	31,6–79,5	0,82
dPGSamin	n = 3	n. i.	-	-

Die IC_{50} -Werte der unterschiedlichen Substanzen waren sowohl in den Konzentrations-Wirkungs-Diagrammen als auch in den berechneten IC_{50} -Werten im Konzentrationsbereich von $c = 10\text{--}100\text{nmol/l}$ lokalisiert. Für die Substanzen wurden IC_{50} -Werte in einem Konzentrationsbereich von $IC_{50} = 24,1\text{ nmol/l}$ (PTX) bis $IC_{50} = 50,1\text{ nmol/l}$ (dPGamin-PTX) errechnet. Die geringer sulfatierten Moleküle dPGSamin-PTX-(6)-45 % bzw. -15 % Sulfat ($IC_{50} = 44,4\text{ nmol/l}$ bzw. $IC_{50} = 40,5\text{ nmol/l}$) hatten gegenüber dem hochsulfatierten dPGSamin-PTX-(6) ($IC_{50} = 33,0\text{ nmol/l}$) einen erhöhten IC_{50} -Wert. Die 95 %-Vertrauensintervalle der IC_{50} -Werte dieser Konjugate überlagerten sich; es gab keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Inkubation mit dPGSamin konnte keine Abnahme der Viabilität gemessen werden.

Die zuvor dargestellten IC_{50} -Werte von PTX/dPGSamin-PTX-(6) bei A431-Zellen, die in der Zeitabhängigkeitsanalyse errechnet wurden ($t = 48\text{ h}$; Kapitel 3.2.2.), unterschieden sich signifikant von den hier gezeigten IC_{50} -Werten (*Intervallvergleich*). Die Präinkubationsbedingungen beider Experimente waren jedoch verschieden.

3.3. Färbungen mit Toluidinblau und Alcianblau *in vitro*

Zur weiteren Analyse mussten Methoden zur Darstellung von dPGS-Konjugaten genutzt werden. Wie an den Gewebeschnitten der Lungentumoren dargestellt, wurden mit der Toluidin- und der Alcianblaufärbung Methoden untersucht, die möglicherweise dPGS in histologischen Geweben nachweisen könnten. Die Protokolle sollten für *In-vitro*-Versuche etabliert und die Färbungen hinsichtlich der Färbeselektivität untersucht werden. Dazu wurden U937-Zellen mit PMA in die Richtung immaturer Makrophagen differenziert [183]. Es ist bekannt, dass Makrophagen/Kupfer-Zellen dPGS-Fluorochrom-Konjugate aufnehmen können [152, 161].

3.3.1. Toluidinblaufärbung nach Inkubation von dPGS-Konjugaten

Die Toluidinblaufärbung wurde nach Inkubation von dPGS, dPGSamin, dPGSamin-PTX-(6), dPGamin-ICC und PTX durchgeführt. Abbildung 20 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

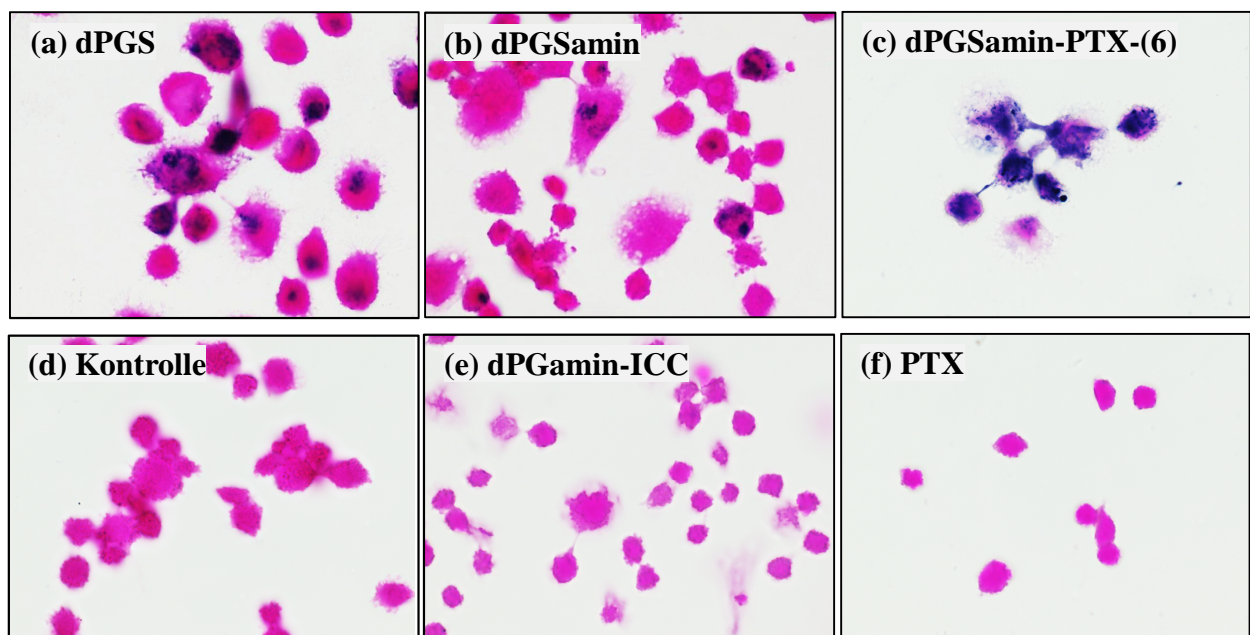


Abbildung 20

Nach der Inkubation von dPGS, dPGSamin und dPGSamin-PTX-(6) konnten differenzierte U937-Zellen mit Toluidinblau angefärbt werden.

Repräsentative Aufnahmen von differenzierten U937-Zellen, inkubiert für fünf Tage mit $c = 1 \mu\text{mol/l}$ (a) dPGS, (b) dPGSamin, (c) dPGSamin-PTX-(6), (e) dPGamin-ICC und (f) PTX. (d) Negativkontrolle. Färbung der Zellen mit Toluidinblau und Gegenfärbung mit Eosin (rot). Bild (f) aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt.

Originale Vergrößerung 1000x. Bilder gleichartig digital kontrast- und helligkeitsverstärkt.

Nach der Inkubation von dPGS und dPGSamin konnten gut abgrenzbare, mit Toluidinblau angefarbte Aggregationen in den Zellen dargestellt werden. Die Farbeintensität unterschied sich jedoch zwischen den einzelnen Zellen deutlich. Es konnten auch Zellen nachgewiesen werden, die nicht mit Toluidinblau angefarbt waren. Zusätzlich war die Verteilung der Färbung innerhalb der Zellen inhomogen. Auch nach Inkubation von dPGSamin-PTX-(6) wurde eine gut sichtbare Färbung der Zellen durch Toluidinblau nachgewiesen. Diese Färbung verteilte sich großflächig in den Zellen. Definierte Zellkompartimente waren methodisch bedingt bei keiner der Substanzen evaluierbar. Sowohl die Kontrollzellen als auch die mit dPGamin-ICC und PTX inkubierten Zellen wiesen keine nachweisbaren Anfärbungen durch Toluidinblau auf.

Bei den mit dPGSamin-PTX-(6) und PTX inkubierten Deckgläsern konnten nur noch wenige Zellgruppen nachgewiesen werden. Die anderen Inkubationen (dPGS, dPGSamin, dPGamin-ICC) wiesen gut erhaltene, mit der Kontrolle vergleichbare Zellpopulationen auf.

3.3.2. Alcianblaufärbung unterschiedlich stark sulfatierter dPGS-Derivate

Die Alcianblaufärbung auf PMA-differenzierten U937-Zellen wurde genutzt, um festzustellen, bis zu welchem Sulfatierungsgrad verschiedener dPGS-Polymere eine Färbung in den Zellen nachweisbar ist. Abbildung 21 zeigt repräsentative Aufnahmen.

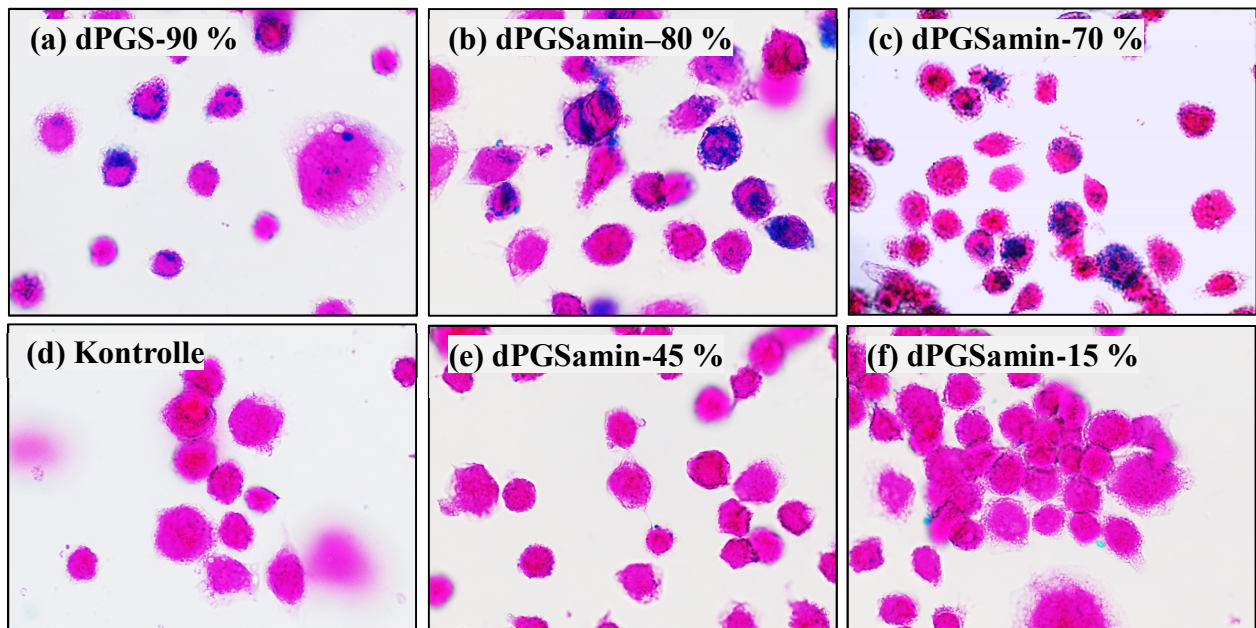


Abbildung 21

Nach der Inkubation von dPGS-Derivaten (Sulfatierungsgrad: DS = 70–90 %) auf PMA-differenzierten U937-Zellen konnten diese mit Alcianblau angefärbt werden.

Repräsentative Aufnahmen von U937-Zellen, differenziert mit PMA in Richtung immature Makrophagen. Inkubation von (a) dPGS, (b) dPGSamin-80 %, (c) dPGSamin-70 % Sulfat, (e) dPGSamin-45 % Sulfat und (f) dPGSamin-15 % Sulfat ($c = 1 \mu\text{mol/l}$; $t = 48 \text{ h}$). (d) Negativkontrolle. Färbung der Zellen mit Alcianblau und Gegenfärbung mit Kernechtrot.

Originale Vergrößerung 1000x. Bilder hier gleichartig digital helligkeits- und kontrastverstärkt.

Zu immaturren Makrophagen differenzierte U937-Zellen (PMA) färbten sich nach der Inkubation mit dPGS sowie dPGSamin (Sulfatierungsgrad: DS = 70–90 %) mit Alcianblau an. Optisch zeigten sich zwischen den Zellen, die mit dPGS oder mit dPGSamin (DS = 70–90 %) inkubiert worden waren, keine eindeutigen Unterschiede in der Färbung. Die angefärbten Zellkompartimente konnten nicht abgegrenzt werden. Dennoch wurde eine inhomogene Verteilung der intrazellulären Färbung deutlich. Die Färbeintensität unterschied sich jedoch bei gleich inkubierten Zellen erheblich. Es konnten z. T. auch Zellen nachgewiesen werden, die nicht oder nur gering mit Alcianblau angefärbt waren.

Bei Makrophagen, die mit dPGSamin-45 % und -15 % Sulfat inkubiert worden waren, konnte keine Alcianblaufärbung in den Zellen nachgewiesen werden. Die Kontrollzellen färbten sich nicht mit Alcianblau an, sondern waren nur einheitlich durch Kernechtrot gefärbt.

Auf allen Deckgläsern waren gut erhaltene Zellgruppen nachweisbar.

3.4. Analyse ICC-markierter dPGS-Konjugate

dPGS-Derivate können möglicherweise mit Toluidin- und Alcianblau angefärbt werden. Eine Quantifizierung dieser Färbemethoden war jedoch nicht möglich. Für Aufnahme- und Eliminationskinetiken war es deshalb notwendig, quantifizierbare Methoden durchführen zu können (Durchflusszytometrie). Deshalb wurden dPGS-Konjugate mit dem Fluoreszenzfarbstoff ICC markiert (mivenion® GmbH, Berlin).

3.4.1. Einfluss der ICC-Konjugation auf die Zytotoxizität

Durch eine ICC-Konjugation wird die Struktur der Grundsubstanz verändert. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Zytotoxizität durch eine ICC-Konjugation der Substanzen beeinflusst wird. Dafür wurden die Substanzen PTX und PTX-ICC sowie dPGSamin-PTX-(6) und dPGSamin-PTX-(6)-ICC auf A431-Zellen inkubiert.

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen sind in Abbildung 22 dargestellt.

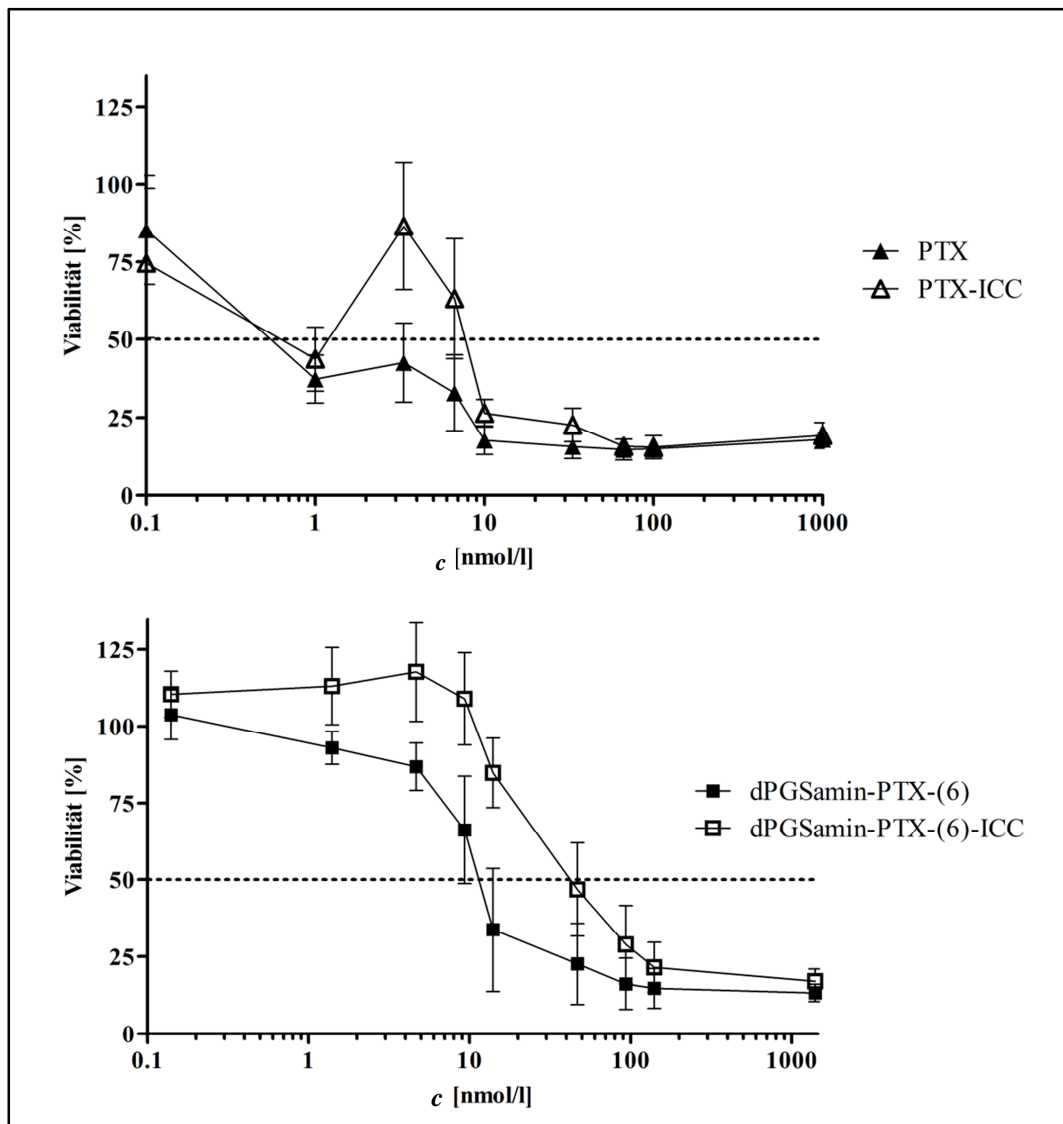


Abbildung 22

Die ICC-Konjugate PTX-ICC und dPGSamin-PTX-(6)-ICC wiesen im Vergleich zu PTX und dPGSamin-PTX-(6) erhöhte IC_{50} -Werte auf. Bei der Inkubation mit PTX und PTX-ICC kam es zu einer Abweichung vom regelhaften Verlauf einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ($c = 1$ nmol/l).

Darstellung der *In-vitro*-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Inkubation von PTX/PTX-ICC und dPGSamin-PTX-(6)/dPGSamin-PTX-(6)-ICC auf A431-Zellen. $n = 4$ (PTX; PTX-ICC) bzw. $n = 3$ (dPGS-Konjugate).

Aufgrund der in der Abbildung 22 erkennbaren Abweichung von einer regelhaften Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei PTX/PTX-ICC wurde diese Konzentration bei der Berechnung der IC_{50} -Werte ausgeschlossen. Die errechneten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17

Übersicht über errechnete IC_{50} -Werte für die Inkubation von PTX/PTX-ICC und dPGSamin-PTX-(6)/dPGSamin-PTX-(6)-ICC bei A431-Zellen. Angabe der Anzahl unabhängiger Versuche, der 95 % Konfidenzintervalle (95 % C. I.) und des Bestimmtheitsmaßes (R^2).

* Ausschluss der Konzentration $c = 1$ nmol/l in der Berechnung.

Substanz		IC_{50} -Wert [nmol/l]	95 % C. I. [nmol/l]	R^2
PTX*	n = 4	1,6	0,9–2,9	0,81
PTX-ICC*	n = 4	8,9	5,5–14,3	0,61
dPGSamin-PTX-(6)	n = 3	14,2	10,3–19,6	0,88
dPGSamin-PTX-(6)-ICC	n = 3	51,5	37–71,0	0,86

Der IC_{50} -Wert von PTX ($IC_{50} = 1,6$ nmol/l; 95 % C. I. = 0,9–2,9 nmol/l) war gegenüber PTX-ICC ($IC_{50} = 8,9$ nmol/l; 95 % C. I. = 5,5–14,3 nmol/l) signifikant vermindert (*Intervallvergleich*). Die Bestimmtheitsmaße von PTX ($R^2 = 0,81$) und PTX-ICC ($R^2 = 0,61$) unterschieden sich deutlich.

Der IC_{50} -Wert für dPGSamin-PTX-(6) ($IC_{50} = 14,2$ nmol/l; 95 % C. I. = 10,3–19,6 nmol/l) war gegenüber dem IC_{50} -Wert von dPGSamin-PTX-(6)-ICC ($IC_{50} = 51,5$ nmol/l; 95 % C. I. = 37,3–71,0 nmol/l) signifikant vermindert (*Intervallvergleich*). Die Bestimmtheitsmaße der Funktionen waren mit $R^2 = 0,88$ bzw. $R^2 = 0,86$ für beide Substanzen vergleichbar gut.

3.4.2. Absorptionsanalyse

Durch eine Konjugation können optische Eigenschaften von Farbstoffen geändert werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich die ICC-Konjugate hinsichtlich der Absorptionsspektren unterscheiden. Veränderungen der Absorption sind für die Durchführung und Interpretation fluoreszenzmikroskopischer und durchflusszytometrischer Daten von Bedeutung. Deshalb wurden die ICC-Konjugate dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC, dPGamin-PTX-ICC und PTX-ICC im Spektrophotometer analysiert. Um einen Vergleich mit Versuchen dieser Arbeit zu ermöglichen, in denen die Fluorochromkonjugate genutzt wurden, wurde die Konzentration bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht und nicht auf den molaren Anteil des ICC am Konjugat berechnet.

Abbildung 23 stellt die Absorptionsspektren der Konjugate dar.

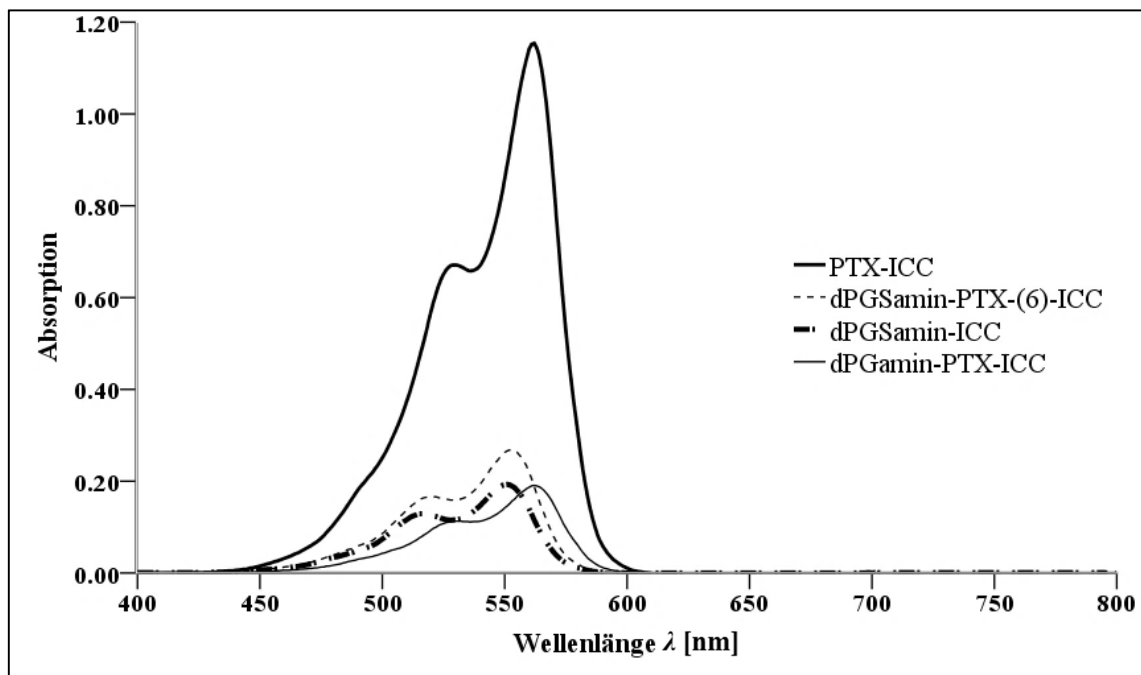


Abbildung 23

Die Konjugate unterschieden sich nur geringfügig in der Wellenlänge des Absorptionsmaximums. Darstellung der Absorptionsspektren für PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGamin-PTX-ICC und dPGSamin-ICC. $c = 10 \mu\text{mol/l}$ (bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht). Messbereich von $\lambda = 400\text{--}800 \text{ nm}$; Messabstand: $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$. $n = 1$.

In den Spektren zeigte sich, dass die Konjugate eine unterschiedlich starke Absorption und geringfügige Verschiebungen der Wellenlänge des Absorptionsmaximums aufwiesen. Die Absorptionsmaxima von dPGamin-PTX-ICC und PTX-ICC ($\lambda_{max} = 562 \text{ nm}$) waren um circa $\lambda = 10 \text{ nm}$ im Vergleich zu den beiden Konjugaten dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC ($\lambda_{max} = 551/552 \text{ nm}$) verschoben.

Die Absorptionsmaxima (A_{max}) für dPGamin-PTX-ICC und dPGSamin-ICC lagen im Bereich von $A_{max} \approx 0,19$ während sich die Absorptionsmaxima für dPGSamin-PTX-(6)-ICC ($A_{max} = 0,27$) und PTX-ICC ($A_{max} = 1,15$) davon unterschieden.

Für die Anregung bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ (FACSCalibur™: Argon-Laser-Linie $\lambda_{Argon} = 488 \text{ nm}$) ergaben sich für die Konjugate unterschiedliche prozentuale Anteile der maximalen Absorption (Tabelle 18).

Tabelle 18

Übersicht über die ICC-Konjugate PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC hinsichtlich des molaren Anteils von ICC am Gesamtmolekül, der Absorption (A) bei $c = 10 \mu\text{mol/l}$ (bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht) und der prozentualen Absorption im Vergleich zum jeweiligen Anregungsmaximum bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ (vgl. FACSCalibur™-Laserlinie).

Konjugat	ICC-Konjugation	A_{max}	A bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ [% der max. Absorption]
PTX-ICC	1 mol ICC/1 mol PTX	1,15; bei 562 nm	14 %
dPGSamin-PTX-(6)-ICC	0,2 mol ICC/1 mol dPGS	0,27; bei 552/553 nm	20 %
dPGSamin-ICC	0,4 mol ICC/1 mol dPGS	0,193; bei 551 nm	23 %
dPGamin-PTX-ICC	0,2 mol ICC/1 mol dPG	0,191; bei 562 nm	14 %

3.4.3. Fluoreszenzanalyse

Neben der Absorption sollten auch die Fluoreszenzintensitäten in Hinblick auf die FACSCalibur™-Konfiguration untersucht werden.

Abbildung 24 zeigt die Fluoreszenzemission bei $\lambda_{Em} = 590/20 \text{ nm}$ in Abhängigkeit von der Konzentration der genannten Konjugate ($\lambda_{Ex} = 485/20 \text{ nm}$).

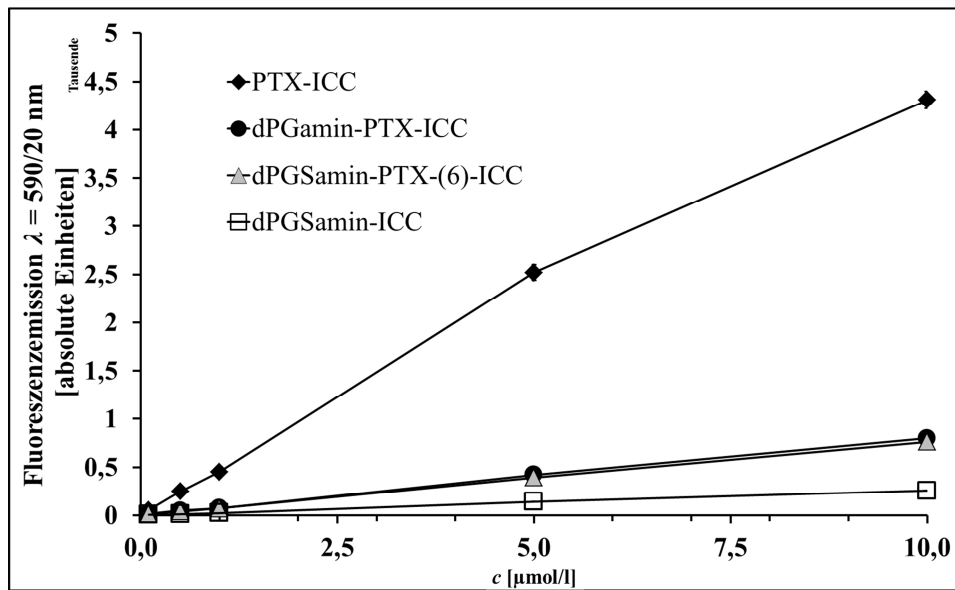


Abbildung 24

Die Konjugate PTX-ICC, dPGamin-PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC unterschieden sich in ihrer Fluoreszenz. Insbesondere bei PTX-ICC traten Quenching-Effekte bei $c = 10 \mu\text{mol/l}$ auf.

Darstellung der Fluoreszenzintensität der Substanzen PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGamin-PTX-ICC und dPGSamin-ICC in Abhängigkeit von der Konzentration (bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht). Anregung von $\lambda_{Ex} = 485/20 \text{ nm}$; Emissionsmessung $\lambda_{Em} = 590/20 \text{ nm}$. $n = 1$ (Quadrupel). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Die SD wird meist durch die Markierung überdeckt.

Die Fluoreszenz der Konjugate zeigte deutliche Unterschiede. Während PTX-ICC die größte Fluoreszenz (F ; [E]) aufwies ($F = 454 \text{ E}$ [$c = 1 \mu\text{mol/l}$]), zeigten die Konjugate dPGSamin-PTX-(6)-ICC ($F = 72 \text{ E}$ [$c = 1 \mu\text{mol/l}$]) und dPGamin-PTX-ICC ($F = 75 \text{ E}$ [$c = 1 \mu\text{mol/l}$]) vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Für das Konjugat dPGSamin-ICC konnte mit $F = 23 \text{ E}$ ($c = 1 \mu\text{mol/l}$) die niedrigste Fluoreszenz der vier Substanzen gemessen werden.

Der Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenz war dabei insbesondere für PTX-ICC nicht über den gesamten Stoffmengenbereich linear – es kam zum Quenching ($c = 10 \mu\text{mol/l}$). Wurde ein anderer Filtersatz genutzt ($\lambda_{Ex} = 530/25 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 590/20 \text{ nm}$), zeigten sich insgesamt höhere Fluoreszenzen und ein verstärktes Quenching (Daten nicht gezeigt).

3.5. Aufnahme und Elimination *in vitro*

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass dPGS-Fluorochrom-Konjugate in Tumorzellen aufgenommen werden [144, 153]. Zusätzlich war dPGSamin-PTX-(6) bei verschiedenen Zelllinien zytotoxisch wirksam (Kapitel 3.2.2.), sodass für dieses Konjugat von einer zellulären Aufnahme ausgegangen werden könnte.

3.5.1. Aufnahme von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC in A431-Zellen

Aufnahmeanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die folgenden Ergebnisse und Graphiken sind bereits veröffentlicht worden: [155, 199].

Für die Aufnahmeanalyse wurden die Substanzen PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC auf A431-Zellen inkubiert und die Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz untersucht (Durchflusszytometrie).

Abbildung 25 zeigt die gemessenen Fluoreszenzen ($t = 0,25\text{--}48$ h).

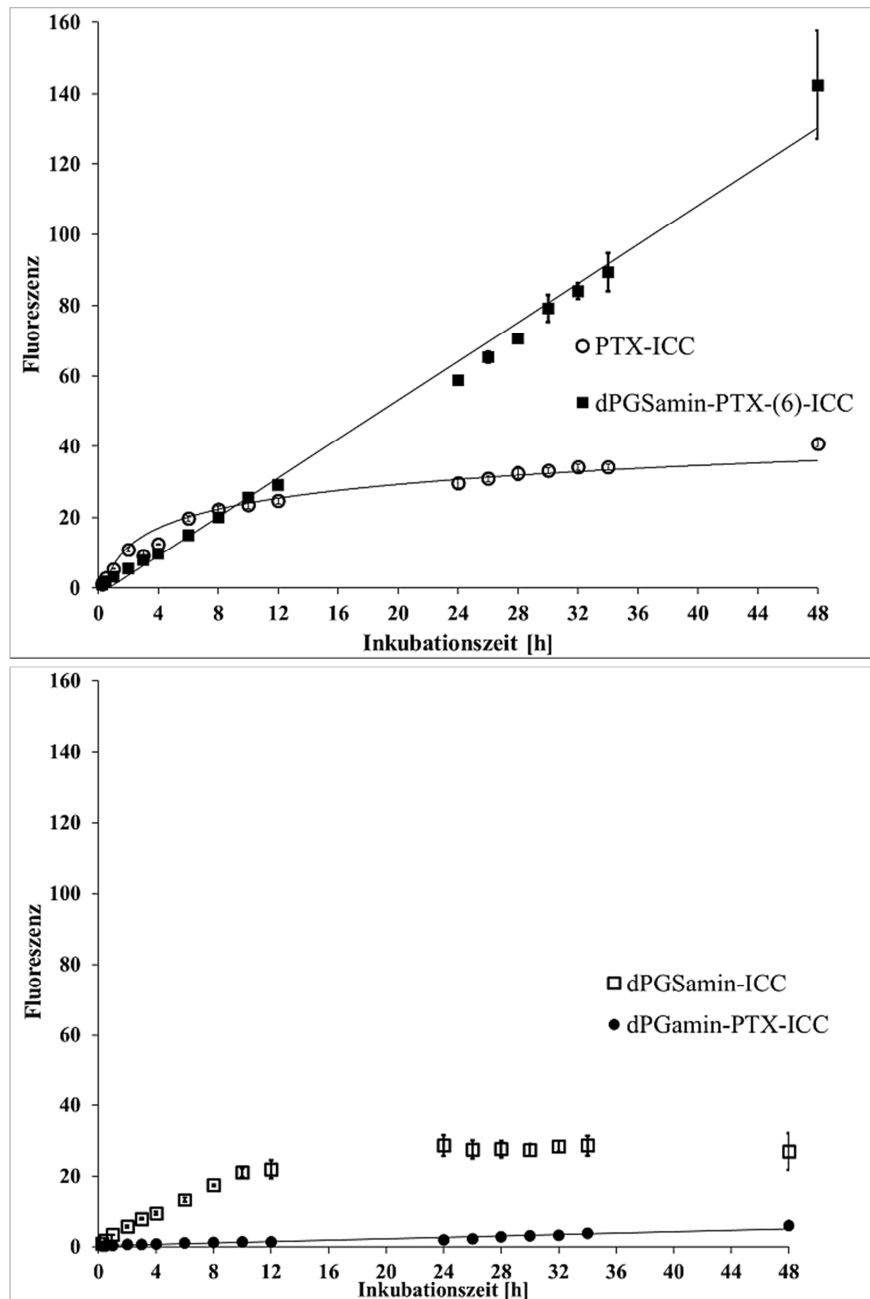


Abbildung 25

Die untersuchten Substanzen zeigten unterschiedliche Kinetiken der Fluoreszenzzunahme. Während die Fluoreszenz von PTX-ICC logarithmisch zunahm, zeigten mit dPGSamin-PTX-(6)-ICC inkubierte Zellen eine lineare Kinetik der Fluoreszenzzunahme ohne Sättigungsplateau.

Die Fluoreszenzzunahme bei dPGSamin-ICC-Inkubation erfolgte primär linear, stagnierte jedoch im Verlauf. Die Fluoreszenz von mit dPGamin-PTX-ICC inkubierten Zellen erhöhte sich insbesondere in den ersten Stunden nur geringfügig über das Kontrollniveau ($F = 0$).

Verlauf der Fluoreszenzintensität von A431-Zellen bei Inkubation von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (t). Dargestellt ist der Mittelwert von vier Messungen ± 1 SD aus $n = 2$ unabhängigen Experimenten. Aus Gründen der Übersicht sind die Graphen getrennt.

Die Fluoreszenzquantitäten können aufgrund unterschiedlich starker Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Konjugate nicht untereinander verglichen werden.

PTX-ICC-inkubierte Zellen zeigten eine logarithmische Zunahme der Fluoreszenz mit zwei Abweichungen von dieser Kinetik ($t = 2$ h; $t = 4$ h). Die prozentual größte Zunahme der Fluoreszenz für PTX-ICC konnte während der ersten acht Stunden Inkubationszeit verzeichnet werden. Es kam auch nach $t = 24$ h zu einer geringen Fluoreszenzzunahme, wobei sich die Aufnahme von PTX-ICC jedoch einem Sättigungsplateau annäherte.

Im Gegensatz dazu nahm die Fluoreszenz nach dPGSamin-PTX-(6)-ICC-Inkubation mit einer linearen Kinetik zu. Ein Sättigungsplateau oder eine Reduktion der Fluoreszenzzunahme konnten innerhalb von $t_{max} = 48$ h nicht nachgewiesen werden.

Die Kinetik der Fluoreszenzzunahme von dPGSamin-ICC war im Zeitintervall bis $t \approx 10$ h ebenfalls linear. Die Zunahme der Fluoreszenz verminderte sich jedoch im Vergleich zu den ersten Stunden und es wurde eine Sättigung der Fluoreszenzzunahme ab dem Zeitpunkt von $t \approx 24$ h gemessen.

Die Zunahme der Fluoreszenz von mit dPGamin-PTX-ICC-inkubierten Zellen erfolgte nur marginal. Insbesondere bei Inkubationszeiten mit $t < 12$ h wurden nur geringgradig über den Kontrollzellen liegende Fluoreszenzwerte ermittelt. dPGamin-PTX-ICC fluoreszierte in der Fluoreszenzanalyse, sodass hier von einer korrekten Fluoreszenz-Messung ausgegangen werden kann.

Im Verlauf der Inkubation von PTX-ICC und dPGSamin-PTX-(6)-ICC nahm die Menge an Zelldebris in den Scattergrammen zu (Daten nicht gezeigt). Bei höheren Inkubationszeiten wurde eine Verbreiterung der FL2-Height-Messhistogramme insbesondere bei PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGamin-PTX-ICC beobachtet (Daten hier nicht gezeigt) (vgl. [155]). Dies deutete auf eine zunehmende Diversität der Fluoreszenzsignalintensität in der gemessenen Zellpopulation hin. Bei der Inkubation von dPGSamin-PTX-(6)-ICC, PTX-ICC und dPGamin-PTX-ICC nahmen mit zunehmender Inkubationszeit die Zellgröße und -granularität (forward scatter/side scatter) im Vergleich zu dPGSamin-ICC zu (Daten nicht gezeigt).

Aufnahmeanalyse von dPGSamin-PTX-(6)-ICC in der Fluoreszenzmikroskopie

Die folgenden Ergebnisse und Abbildungen sind bereits veröffentlicht worden: [155, 201].

Die durch die Durchflusszytometrie ermittelten Werte für dPGSamin-PTX-(6)-ICC sollten mikroskopisch verifiziert werden, um die intrazelluläre Lokalisation genauer beurteilen zu können. Dazu wurden A431-Zellen mit dPGSamin-PTX-(6)-ICC inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Abbildung 26 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

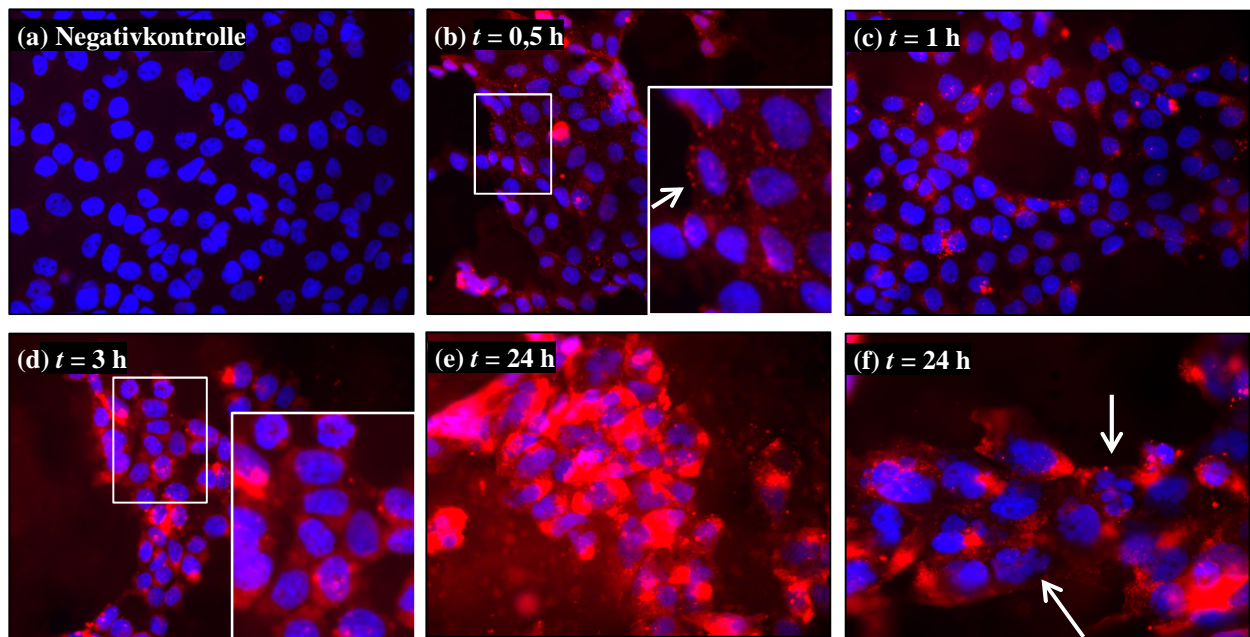


Abbildung 26

dPGSamin-PTX-(6)-ICC (rot) reichte sich im Verlauf der Inkubationszeit zunehmend intrazellulär an. Fragmentierte Zellkerne waren nach $t = 24$ h Inkubation erkennbar (Pfeilmarkierung in [f]). Repräsentative Aufnahmen von A431-Zellen nach Inkubation von $c = 1 \mu\text{mol/l}$ dPGSamin-PTX-(6)-ICC für $t = 0,5$ h; 1 h; 3 h; 24 h. (a) Negativkontrolle. Kernfärbung mit DAPI (blau); ICC (rot). Originale Vergrößerung: (a–e) 450x; (f) 650x. Ausschnitte in (b) und (d) digital vergrößert. Alle Bilder hier gleichartig digital helligkeits- und kontrastverstärkt.

Zu den Zeitpunkten $t = 0,5$ h und $t = 1$ h waren im Vergleich zu den späteren Untersuchungszeitpunkten nur geringe Fluoreszenzsignalintensitäten in den Zellen darstellbar. Insbesondere bei $t = 0,5$ h zeigte sich eine vermutlich plasmamembrannähe Lokalisation von verstärkten Fluoreszenzsignalen (Abbildung 26; Vergrößerung Bild [b]; Pfeilmarkierung). Nach $t = 3$ h Inkubationszeit waren bereits deutliche Fluoreszenzsignale von dPGSamin-PTX-(6)-ICC innerhalb der Zellen sichtbar (perinukleär). Eine hohe Fluoreszenzsignalintensität konnte nach $t = 24$ h Inkubationszeit gesehen werden. Die Zellkernareale zeigten sich fast vollständig fluoreszenzfrei. Einzelne Überlagerungen von Zellkern und dPGSamin-PTX-(6)-ICC-Fluoreszenz entstanden möglicherweise durch die nichtkonfokale Mikroskopiertechnik.

Nach der 24-stündigen Inkubation wiesen die Zellkerne Zeichen der Fragmentierung auf (Abbildung 26 [f]; Pfeilmarkierung). Die Zellkernform bei den anderen dargestellten Inkubationszeiten ist unregelmäßig, jedoch nicht fragmentiert. Die Negativkontrolle war von einer unspezifischen ICC-Fluoreszenz frei.

3.5.2. Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC *in vitro*

Die folgenden Ergebnisse und Graphiken sind bereits veröffentlicht worden: [155].

Die intrazelluläre Retention von Zytostatika ist ein wichtiger pharmakologischer Parameter. In vergleichbaren Voruntersuchungen mit einem dPGS-ICC-Derivat konnte, trotz einer verminderten Fluoreszenzintensität, auch noch nach $t = 48$ h Fluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden [161]. Aufgrund des zytotoxisch aktiven Anteils am dPGSamin-PTX-(6)-ICC sollte die intrazelluläre Retention im Vergleich zu dPGSamin-ICC untersucht werden. Dazu wurden A431-Zellen für $t = 24$ h mit beiden Konjugaten vorinkubiert und erhielten anschließend einen Mediumwechsel mit substanzfreiem Medium (Zeitpunkt t_0).

Abbildung 27 zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten ($t_0 =$ Zeitpunkt des Mediumwechsels; Fluoreszenz [F] zum Zeitpunkt t_0 : $F_{t_0} = 100$ %).

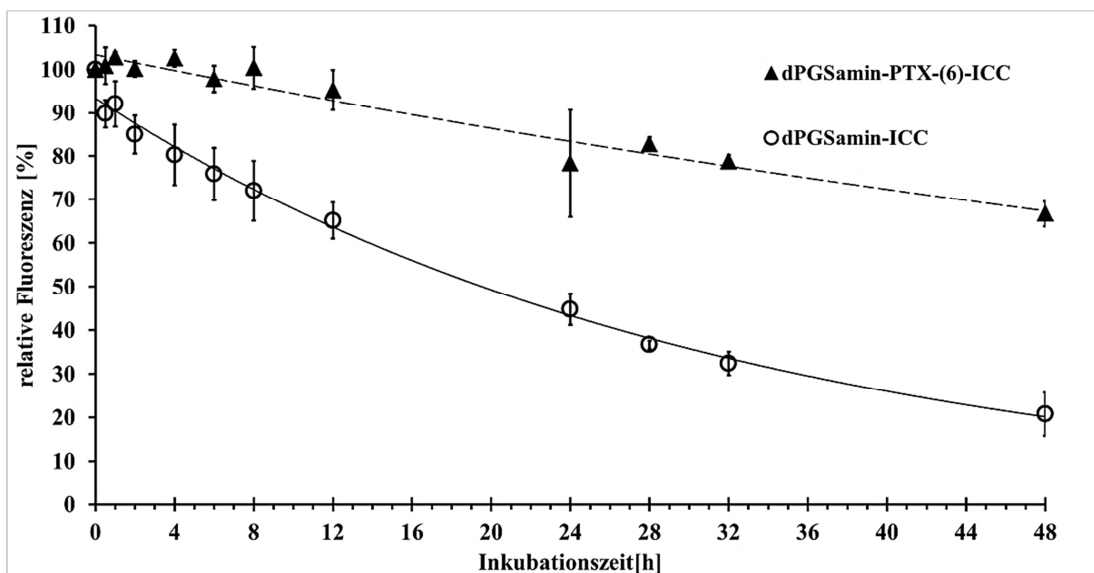


Abbildung 27

Im Vergleich zu dPGSamin-ICC verminderte sich die Fluoreszenz von dPGSamin-PTX-(6)-ICC aus A431-Zellen nur verlangsamt.

Darstellung der Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC aus A431-Zellen nach einer Vorinkubation für $t = 24$ h und anschließendem Mediumwechsel ($= t_0$). Dargestellt ist der Mittelwert der medianen Fluoreszenz von $n = 2$ unabhängigen Experimenten in Triplettsmessung \pm SD. Die Normierung erfolgte bezogen auf t_0 .

Die *In-vitro*-Elimination, gemessen als Verminderung der Fluoreszenz, von dPGSamin-PTX-(6)-ICC aus A431-Zellen war im Vergleich zu dPGSamin-ICC verlangsamt. Während die Halbwertszeit für dPGSamin-PTX-(6)-ICC $t_{1/2} > 48$ h betrug, konnte für dPGSamin-ICC eine Halbwertszeit von $t_{1/2} \approx 19$ h ermittelt werden.

Die Fluoreszenz der mit dPGSamin-PTX-(6)-ICC vorinkubierten Zellen blieb in den ersten Stunden undulierend konstant. Zum Zeitpunkt $t = 12$ h waren für dieses Konjugat $F_{t_{12h}} = 95 \pm 5$ % der Fluoreszenz von F_{t_0} messbar. Eine Fluoreszenz von $F = 67 \pm 3$ % des Ausgangswertes wurde $t = 48$ h nach Zugabe des substanzfreien Mediums gemessen.

Im Vergleich dazu war die Fluoreszenz von dPGSamin-ICC bereits nach den ersten 12 Stunden auf $F_{t_{12h}} = 65 \pm 4$ % abgesunken und betrug $t = 48$ h nach dem Mediumwechsel $F = 21 \pm 5$ % des Ausgangswertes.

3.5.3. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von dPGSamin-DXR-(1)

Das Konjugat dPGSamin-DXR-(1) wies im Zytotoxizitätsscreening im Vergleich zu DXR ein deutlich vermindertes zytotoxisches Potential auf. Es sollte untersucht werden, ob dPGS-amin-DXR-(1) in Zellen aufgenommen wurde und ob der DXR-Anteil des Polymers im Zellkern nachweisbar ist. Dafür wurden die Fluoreszenzeigenschaften von DXR genutzt [202] und A431-Zellen mit DXR und dPGSamin-DXR-(1) inkubiert.

Abbildung 28 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

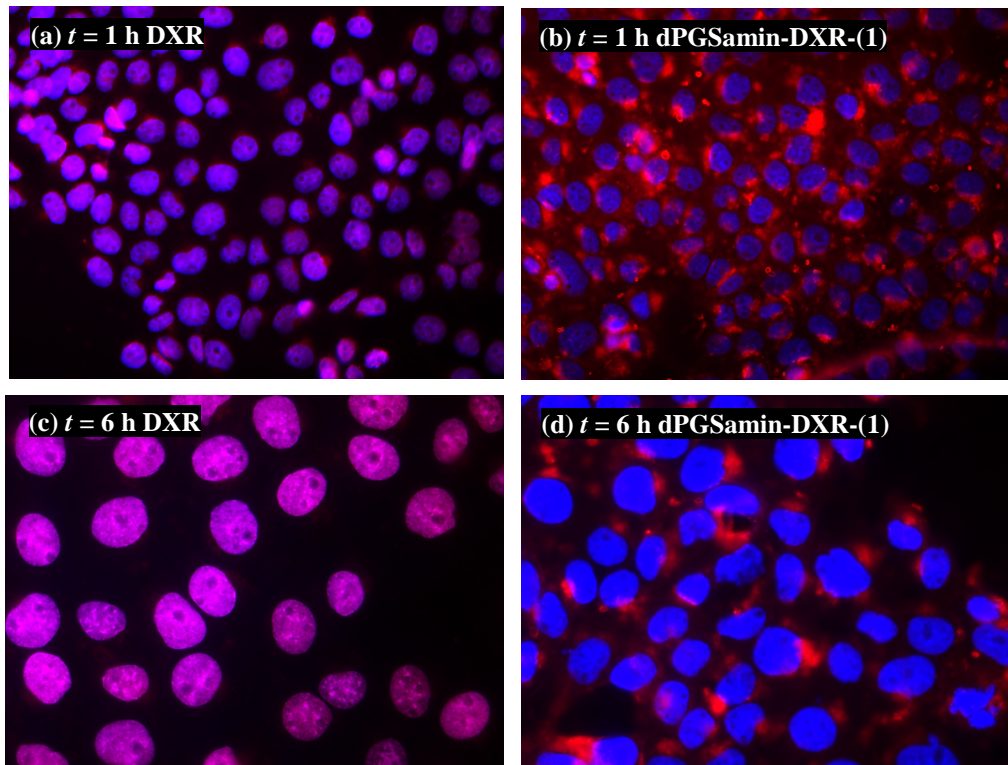


Abbildung 28

DXR-Fluoreszenz (rot) und Zellkernsignal (blau) überlagerten sich im Verlauf der Inkubationszeit. Die Fluoreszenz von dPGSamin-DXR-(1) verblieb perinukleär lokalisiert.

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von A431-Zellen nach Inkubation von DXR und dPGSamin-DXR-(1) für $t = 1$ h und $t = 6$ h ($c = 1 \mu\text{mol/l}$). Kernfärbung mit DAPI (blau). DXR (rot). Die Überlagerungen von Zellkern und DXR erscheinen violett.

Originale Vergrößerung 400x (a, b) bzw. 650x (c, d). Bilder hier gleichartig digital kontrast- und helligkeitsverstärkt.

Bereits nach einer Stunde Inkubation von DXR auf A431-Zellen zeigte sich eine geringe, unvollständige Überlagerung von Zellkernfärbung und der DXR-Fluoreszenz. Nach einer Inkubationszeit von $t = 6$ h konnte eine vollständige Überlagerung von Zellkernsignal und DXR dargestellt werden, wobei fluoreszenzmikroskopisch nur geringe DXR-Fluoreszenzen im zellkernumgebenden Bereich abgebildet wurden.

Nach der Inkubation von dPGSamin-DXR-(1) ($t = 1$ h) wurden Fluoreszenzsignale vorwiegend perinukleär nachgewiesen. Auch nach einer Inkubationszeit von $t = 6$ h zeigte sich keine eindeutige, großflächige Überlagerung der Fluoreszenzen, die auf einen Übergang von dPGSamin-DXR-(1)/des DXR-Anteils in den Zellkern hingewiesen hätten. Eine vereinzelte und nur geringe Überlagerung der Fluoreszenz von Zellkern und dPGSamin-DXR-(1) war auf die nichtkonfokale Mikroskopiertechnik zurückzuführen.

Für beide Substanzen konnte keine Veränderung der Zellkernmorphologie innerhalb des Inkubationszeitraumes festgestellt werden.

3.6. Nachweis der Wirkmechanismen für PTX und dPGSamin-PTX-(6) *in vitro*

3.6.1. G₂/M-Arrest nach Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6)

Die Wirkung von PTX wird u. a. durch die Stabilisierung der Mikrotubuli und dem daraus folgenden G₂/M-Arrest der Zellen vermittelt [58]. Zum Nachweis des G₂/M Arrestes wurden A431-Zellen mit PTX, dPGSamin-PTX-(6), dPGSamin und dPGamin-PTX inkubiert ($c = 10 \text{ nmol/l}$; bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht) und der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid-Färbung gemessen (Durchflusszytometrie).

Die zu einer korrekten Auswertung notwendige Eliminierung von Zell-Dubletten/Tripletten erfolgte durch ein Gate im FL2-Area/FL2-Width-Scattergramm (Abbildung 29 (a)). Als interne Messkontrolle wurde der lineare Zusammenhang von FL2-Area und FL2-Height genutzt, der sich in jeder Messprobe regelrecht linear darstellte (repräsentativ in Abbildung 29 [b]).

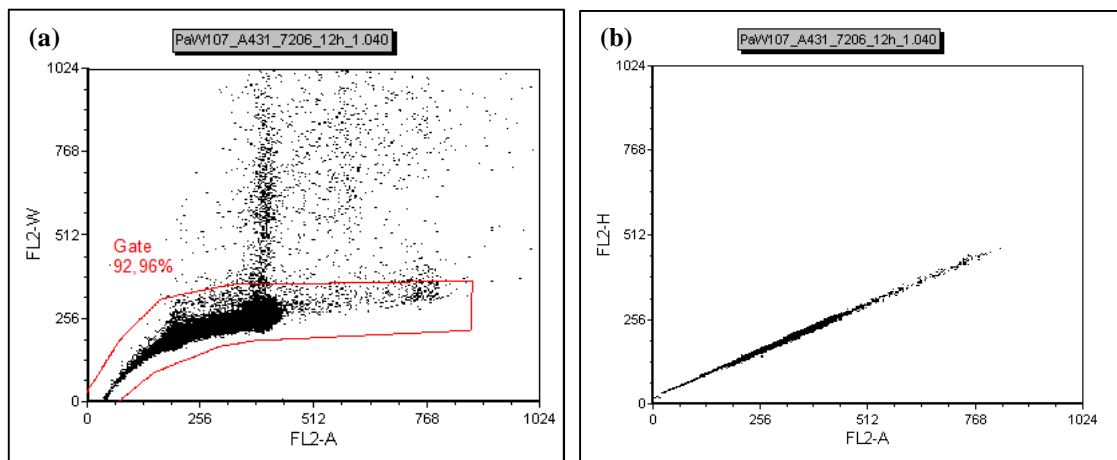


Abbildung 29

(a) Repräsentative Abbildung eines FL2-Area/FL2-Width-Scattergramms mit Darstellung des Gates zur Eliminierung von Zell-Dubletten/Tripletten ($t = 12 \text{ h}$; dPGSamin-PTX-(6); Probe 1).

(b) Repräsentative Darstellung des linearen Zusammenhangs von FL2-Area und FL2-Height als interne Messkontrolle zur korrekten Auswahl analysierter Zellen (gated nach Abbildung 29 [a]; $t = 12 \text{ h}$; dPGSamin-PTX-(6); Probe 1).

In Abbildung 30 sind repräsentative DNA-Gehaltsmessungen jeweils einer der drei Messungen dargestellt. Der gemittelte Anteil von Zellen in der G₂/M-Phase ist angegeben (Triplettmessung).

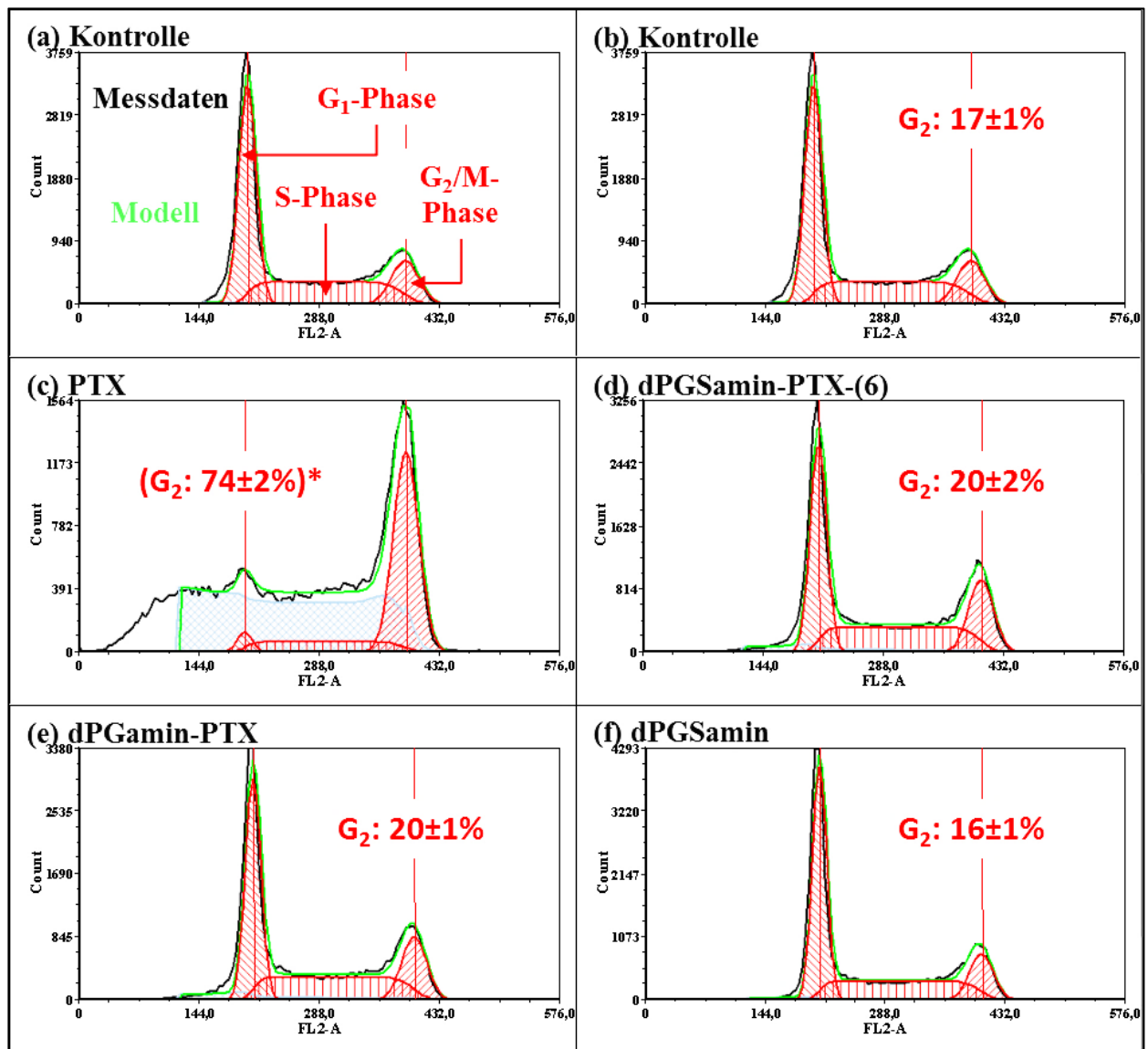


Abbildung 30

Nach der Inkubation von PTX für $t = 12$ h war ein im Vergleich zum G_1 -Anteil deutlich erhöhter G_2 -Anteil sichtbar, während nach der Inkubation von dPGSamin-PTX-(6) ein numerisch nur gering erhöhter G_2 -Anteil gefunden wurde. Ein dazu vergleichbares Ergebnis wurde auch bei dPGamin-PTX ermittelt, während dPGSamin zu keiner Erhöhung des G_2 -Anteils führte ($c = 10$ nmol/l bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht).

Repräsentative FL2-Area-Histogramme zur Darstellung des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid bei A431-Zellen und der Berechnung der Zellzyklusphasen nach Inkubation von PTX; dPGSamin-PTX-(6); dPGamin-PTX und dPGSamin. Mediuminkubation in der Kontrolle. Triplettmessung; Darstellung einer Messprobe je Messzeit mit Angabe des G_2 -Anteils (MW \pm SD).

Schwarze Linie: Messdaten; grüne Linie: genutztes Modell zur Berechnung; rote Linien: Einteilung des Modells in G_1/G_2 - und S-Phase bzw. Peak der G_1/G_2 -Phase.

* Das der Berechnung zugrunde liegende Modell war aufgrund eines erhöhten Hintergrund/Aggregat/Debris-Anteils im Vergleich zu den anderen Messwerten nur eingeschränkt interpretierbar und konnte nicht als adäquat angenommen werden [203]. Der erhöhte G_2 -Anteil, verglichen mit dem G_1 -Anteil, war jedoch eindeutig im Histogramm ersichtlich.

Anhand der DNA-Gehaltsmessungen wurden die Zellzyklusphasen ermittelt.

Für die Mediumkontrolle zeigte sich nach $t = 12$ h ein regelrechter Zellzyklus mit einem G₂/M-Anteil (G₂) von $G_2 = 17 \pm 1$ % (MW \pm SD). Nach einer PTX-Inkubation wurde im Histogramm ein gegenüber der G₁-Phase deutlich erhöhter G₂/M-Anteil gefunden. Die ermittelten numerischen Werte ($G_2 = 74 \pm 2$ %) waren jedoch aufgrund des deutlich erhöhten Hintergrund/Aggregat/Debris-Anteils in der Messung nur eingeschränkt interpretierbar [203] (*keine Signifikanztestung*). Der im Vergleich zum G₁-Anteil deutlich erhöhte G₂-Anteil war im oben gezeigten Histogramm jedoch eindeutig erkennbar.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe führten sowohl dPGSamin-PTX-(6) als auch dPGamin-PTX zu einem nur geringfügigen Anstieg des mittleren G₂/M-Anteils auf $G_2 = 20 \pm 2$ % bzw. $G_2 = 20 \pm 1$ % (*keine Signifikanztestung*).

Das Kontrollpolymer dPGSamin führte zu keiner numerischen Erhöhung der G₂/M-Fraktion ($G_2 = 16 \pm 1$ %).

3.6.2. Beeinflussung der Tubulinverteilung durch PTX und dPGSamin-PTX-(6)

Die folgenden Ergebnisse und Abbildungen sind bereits veröffentlicht worden: [155, 201, 204, 205].

Die Beeinflussung mikrotubulärer Strukturen durch PTX kann histologisch dargestellt werden [58]. Zum Nachweis, dass auch dPGSamin-PTX-(6) die Tubulinverteilung beeinflusst, wurden immunzytochemische Färbungen von α -Tubulin durchgeführt. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob auch dPGamin-PTX die Tubulinverteilung verändert.

Abbildung 31 zeigt repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen.

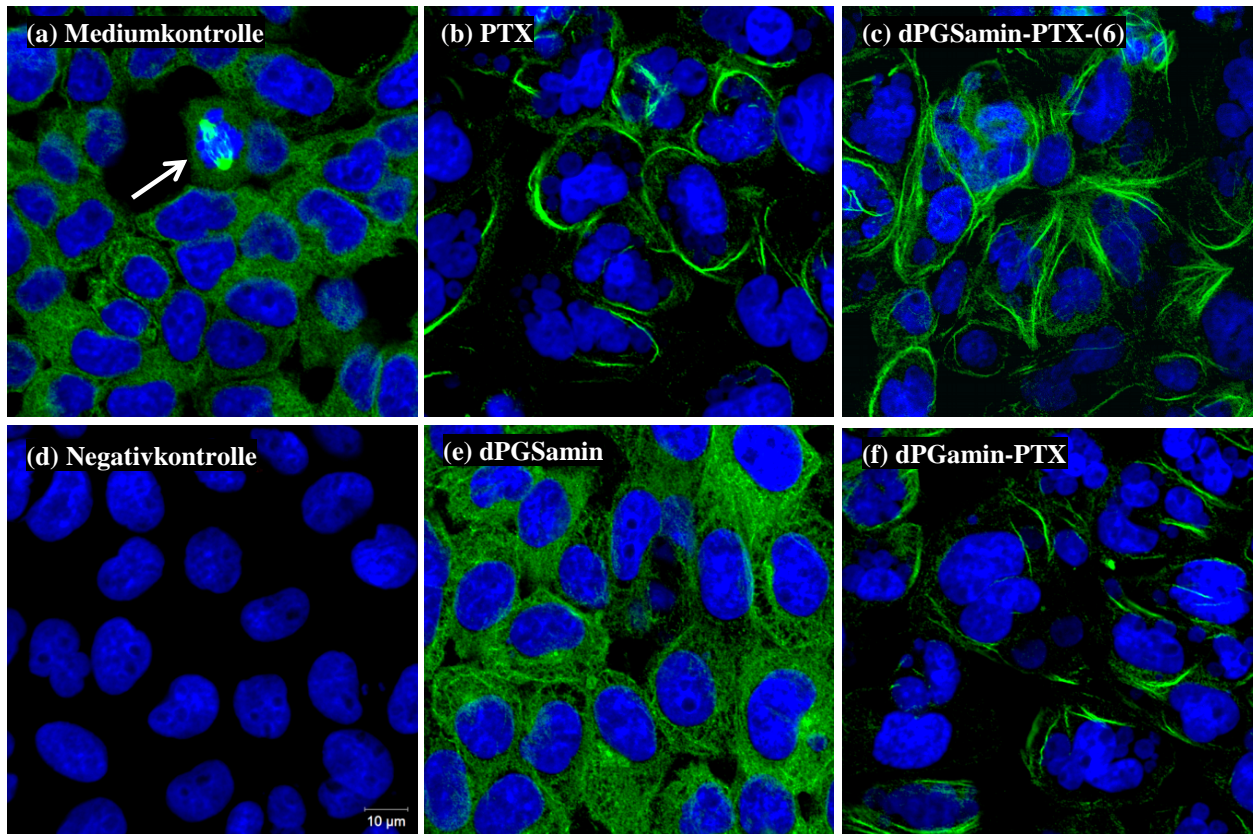


Abbildung 31

Nach Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6) stellte sich Tubulin in Bündeln aggregiert dar. Vergleichbare Tubulinveränderungen wurden auch durch dPGamin-PTX erreicht. dPGSamin beeinflusste die Verteilung von Tubulin nicht. Die Pfeilmarkierung in (a) weist auf eine mitotisch aktive Zelle.

Repräsentative konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von A431-Zellen inkubiert mit (a) Medium, (b) PTX, (c) dPGSamin-PTX-(6), (e) dPGSamin und (f) dPGamin-PTX ($c = 100 \text{ nmol/l}$; $t = 16 \text{ h}$). (d) Negativkontrolle ohne Primärantikörper. Immunzytochemische Färbung von α -Tubulin (grün) und Kernfärbung mit DAPI (blau).

Originale Vergrößerung 630x. Konfokale Aufnahmen auf Zellkernebene. Bilder hier gleichartig digital kontrast- und helligkeitsverstärkt.

Die Darstellung von α -Tubulin in der Mediumkontrolle zeigte eine gleichmäßige zelluläre Verteilung. Mitotisch aktive Zellen waren vereinzelt sichtbar (Abbildung 31 [a], Pfeilmarkierung) und deuteten auf eine proliferativ aktive Tumorzellpopulation hin. Die Zellkerne stellten sich unregelmäßig geformt, jedoch ohne Fragmentierungen dar.

Sowohl nach der Inkubation von PTX als auch von dPGSamin-PTX-(6) zeigte sich eine deutliche Reduktion des gleichmäßig verteilten Tubulinanteils und es wurde eine verstärkte Aggregation in Form von Tubulinbündeln sichtbar. Einige Zellkerne wiesen Fragmentierungen auf.

Auch nach der Inkubation von dPGamin-PTX zeigte sich eine Reduktion der gleichmäßig verteilten Tubulin-Anteile bei einer gleichzeitigen Aggregation von Tubulinbündeln. In diesem Prä-

parat waren ebenfalls deutlich fragmentierte Zellkerne sichtbar. Das histologische Bild gleicht damit der Inkubation von PTX und dPGSamin-PTX-(6).

Die Inkubation mit dPGSamin führte zu keiner sichtbaren Veränderung der Verteilung von Tubulin oder zu dessen Aggregation. Zellen und Zellkerne waren in Form und Größe mit denen der Mediumkontrolle vergleichbar.

Die Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) wies keine unspezifischen Signale auf.

4. Diskussion

4.1. Wirkung und Wirksamkeit von dPGS *in vivo*

Um Aussagen zur Anwendbarkeit, der Wirksamkeit und der potentiellen Anreicherung von dPGS in Tumoren treffen zu können, wurde dPGS an einem humanen Lungentumor im thymusaplastischen Mausmodell untersucht.

4.1.1. Wirkung und Wirksamkeit von dPGS

Einfluss der dPGS-Behandlung auf das Körpergewicht und das Verhalten der Tiere

Zur Untersuchung von UAW einer dPGS-Behandlung wurden Körpergewicht und Verhalten der Tiere als Surrogatparameter analysiert. Am Tag 12 nach Implantation der Tumorzellen (1. Behandlungstag) unterschieden sich die Tiere signifikant in ihrem Körpergewicht. Bei den relativen Körpergewichten konnte jedoch in den nachfolgenden Messungen zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Letale oder toxische Wirkungen der dPGS-Behandlung wurden nicht auffällig [195].

Die fehlenden toxischen/letalen Wirkungen und der mit der Kontrollgruppe vergleichbare relative Gewichtsverlauf deuteten auf eine gute *In-vivo*-Verträglichkeit des dPGS-Polymers hin und sind zu vorherigen Ergebnissen von dPGS-Derivaten in *In-vivo*- und *In-vitro*-Untersuchungen konform, die ebenfalls auf eine gute Verträglichkeit schließen ließen [144, 152, 154, 155]. Dem folgend könnte die zukünftig verabreichte Dosis erhöht werden [195].

Anzumerken ist, dass der Verlauf des Körpergewichtes nicht an gesunden Tieren, sondern an immuninkompetenten Mäusen mit einem Tumor-Xenograft untersucht worden ist, wodurch das Körpergewicht beeinflusst worden sein könnte. Für generelle Aussagen zum Einfluss von dPGS auf das Körpergewicht sind deshalb Untersuchungen an gesunden Tieren ohne Xenograft notwendig. Auch der Einfluss von dPGS auf die Tumorumfänge könnte die Körpergewichte beeinflusst haben. Die Tumorumfänge konnten jedoch nicht aus der Körpergewichtsanalyse eliminiert werden.

Trotz einer Nachbeobachtungsperiode (14 Tage) könnten UAW möglicherweise nicht nachgewiesen worden sein, da der Untersuchungszeitpunkt zu frühzeitig gewählt wurde [206]. Deshalb sind Langzeituntersuchungen mit einer dPGS-Behandlung notwendig. Gleichzeitig war die gewählte Tierzahl mit $n = 6$ Tieren/Gruppe sehr gering. Niedrig ausgeprägte Effekte könnten als nicht signifikant nachgewiesen bzw. bei seltenem Auftreten auch nicht registriert worden sein.

Zukünftig sollten zusätzlich Blutbild und die klinische Chemie als Surrogatparameter für den Einfluss von dPGS auf die Organfunktionen untersucht werden. Untersuchungen der Arbeitsgruppe zu dPGS-Therapien in anderen Modellen zeigten bislang auf diese keinen Einfluss [159]. Dennoch sind diese Parameter bei einer möglichst hohen Anzahl von Tieren und Modellen systematisch zu untersuchen, um seltene bzw. gering ausgeprägte Effekte feststellen zu können.

Einfluss der dPGS-Behandlung auf die Tumorumina

Da dPGS vielfältige biologische Wirkungen, bspw. Bindungsfähigkeiten für Zytokine und Wachstumsfaktoren, aufweist [157], sollte untersucht werden, ob das Polymer das Tumorstadium beeinflussen könnte.

Die Behandlung mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS verminderte den Median des relativen Tumorstadiums am Ende der Behandlungs- bzw. der Nachbeobachtungsperiode (n. s.). Im Vergleich zur Kontrollgruppe wies die mit $D = 10$ mg/kg b.w. dPGS behandelte Gruppe z. T. einen höheren Median der relativen Tumorumina auf. Eine dPGS-Behandlung beeinflusste damit vermutlich das Tumorstadium. Aufgrund fehlender Signifikanz ist dieses Ergebnis zu bestätigen und das Optimum der möglichen Dosis-Wirkungs-Beziehung in weiteren Untersuchungen zu bestimmen. Es wurde keine Reduktion des Medians der relativen Tumorumina unter den Ausgangswert am Beginn der Behandlung (Tag 12) gesehen. Die Wirkung von dPGS konnte damit als zytostatisch interpretiert werden [206]. Ursächlich für diese Wirkung könnten unterschiedliche Mechanismen sein. Das Polymer dPGS bindet VEGF ($K_d = 100$ nmol/l), HGF ($K_d = 6$ pmol/l) und TGF- β_1 ($K_d = 4$ pmol/l) [157]. Untergruppen des VEGF sind entscheidende Faktoren der Angiogenese und der Gefäßpermeabilität maligner Tumoren [207, 208]. HGF wirkt *in vitro* auf die hier untersuchten A549-Zellen proliferationsfördernd und könnte die Invasion begünstigen [209]. Gleichzeitig können A549-Zellen über IL-1 und basic fibroblast growth factor die HGF-Expression in Fibroblasten steigern [209], wodurch das Tumorstadium unterhalten werden würde. Das Polymer dPGS bindet auch TGF- β_1 ($K_d = 4$ pmol/l) [157], dessen Einfluss auf Tumoren stadiumabhängig und differenziert von tumorsuppressiven zu tumorsupportiven Effekten wechseln kann [210]. TGF- β_1 trägt außerdem zur Invasion/Metastasierung von A549-Zellen bei und fördert die epithelial-mesenchymale Transition [211-213]. Auch die Expression von VEGF bei A549-Zellen und Mausfibroblasten wird durch TGF- β gefördert [214]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass dPGS *in vitro* die Freisetzung von TGF- β_1 aus der A549-Zelllinie vermindert [159]. Die genannten Faktoren sind möglicherweise durch eine Bindung an dPGS biologisch inaktiviert worden, wodurch die Angiogenese und das Tumorstadium

tum im hier untersuchten Modell beeinflusst worden sein könnten. Die Sulfatgruppen besitzen eine zentrale Stellung in der Wirkungsvermittlung und der zellulären Aufnahme dendritischer Polyglycerolsulfate [144, 148, 152]. Die Ladungsabhängigkeit der Wirksamkeit von Polyglycerolen wird dadurch hervorgehoben [145]. Zusätzlich besitzen auch der Verzweigungsgrad und die Größe von Polyglycerolen Einfluss auf die Wirksamkeit [151, 215]. Es ist aus den genannten Gründen davon auszugehen, dass auch im hier untersuchten Modell die vermittelte Wirkung auf Lungentumoren von der hohen Sulfatierung abhängig ist. Letzteres könnte mit der Anreicherung des dPGS und durch die mögliche Bindung der Faktoren begründet werden. Auf die Anreicherung wird in den folgenden Kapiteln detailliert eingegangen.

Die genutzte Tierzahl wurde mit $n = 6$ je Gruppe sehr niedrig gewählt, wodurch die Signifikanz dieser biologisch äußerst relevanten Reduktion des Medians der relativen Tumorumfänge nicht nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich traten innerhalb der Gruppen große interindividuelle Unterschiede der relativen Tumorumfänge auf.

Die genutzte Therapiestrategie (Administration von dPGS ab beginnender Palpationsmöglichkeit der Tumoren) stellt im Vergleich zu einem späteren Administrationsbeginn die „Frühstadium-Strategie“ nach Kelland dar [206]. Diese reflektiert jedoch nicht die vorwiegende klinische Situation von Patienten [206]. Zusätzlich ist anzumerken, dass der Therapieversuch durch subkutane Injektionen erfolgt ist. Sollen dPGS-Wirkstoff-Konjugate über einen subkutanen Administrationsweg verabreicht werden, ist die Toxizität des kovalent gebundenen Wirkstoffs auf das subkutane Gewebe zu beachten (Zytostatika).

Das genutzte Modell der thymusaplastischen Maus stellt eine etablierte Methode dar [206]. Dennoch ist anzumerken, dass die subkutane Implantation der A549-Zellen nicht in humanes, sondern in murines Gewebe erfolgte [206]. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da die Wirkung des dPGS möglicherweise auf dem Einfluss auf tumorumgebende Gewebe/Faktoren beruhen könnte und nicht primär auf eine zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen zurückzuführen ist. Zusätzlich ist in einem thymusaplastischen Mausmodell die Lymphozytenzahl deutlich vermindert [173]. Das Immunsystem und im Speziellen intratumorale T-Zellen (cluster of differentiation [CD]; $CD4^+CD8^+$) haben jedoch einen prognostisch begünstigenden Einfluss auf das klinische Outcome von Patienten [216, 217]. Es ist unbekannt, ob dPGS die Leukozytenzahlen in/um Tumoren immunkompetenter Organismen beeinflussen würde, da dPGS die Leukozytenextravasation in Entzündungsgewebe reduzieren kann [148]. Da sich dPGS jedoch in Inflammationsgeweben anreichern kann [152, 154] und Karzinome/maligne Tumoren häufig mit Entzündungspro-

zessen verbunden sind (vgl. Übersichten [2, 28]), könnte dies zu der Akkumulation von dPGS um Tumorprozesse und zum erfolgreichen Drug-Targeting von zytotoxisch aktiven Wirkstoffen beitragen. dPGS bindet weiterhin an P- und L-Selektine [148] und könnte damit – vergleichbar mit Heparin im Tiermodell – zu einer möglicherweise verminderten Metastasierung beitragen [218]. Die Beeinflussung des Tumorumfanges und der Metastasierung durch dPGS ist in immunkompetenten Organismen deshalb nur unsicher einzuschätzen. Die theoretischen Mechanismen, insbesondere die Anreicherung, erscheinen jedoch für eine erfolgreiche Anwendung vielversprechend.

Für die weitergehende Evaluation sollte eine größere Tieranzahl je Gruppe gewählt, die Dosis von dPGS erhöht [195] und orthotope A549-Modelle (bspw. nach [219]) genutzt werden. Letzteres ist notwendig, da der Implantationsort Auswirkungen auf Tumorwachstum, Metastasierung und die Ansprechrate von Therapeutika haben kann [220, 221].

4.1.2. Einfluss der dPGS-Behandlung auf Proliferation, Apoptose und NF- κ B

Eine Beeinflussung der Tumorumfänge wäre durch eine verminderte Proliferation und/oder durch eine erhöhte Apoptose begründbar. Einen repräsentativen Mechanismus stellt möglicherweise auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B dar, der durch dPGS gebunden werden kann [157, 158] und sowohl in anti- als auch pro-apoptotische Signalkaskaden integriert ist [35, 38].

Einfluss der Behandlung mit dPGS auf die Proliferation

Die Behandlung der A549-Tumoren mit $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion von Ki-67-positiven Signalen bezogen auf die Zellkernfluoreszenz. Dieses Ergebnis war als Reduktion der Proliferation zu interpretieren und könnte ursächlich zur Beeinflussung der medianen Tumorumfänge beigetragen haben.

Ki-67 repräsentiert einen sehr gut etablierten und vielfach genutzten Proliferationsmarker [196, 222]. Dennoch ist anzumerken, dass auch nicht proliferierende Zellen trotz einer starken Expressionsverminderung Ki-67-positiv sein können [222], sodass dieses Ergebnis in anderen Experimenten zu bestätigen ist.

Für die Quantifizierung von IHC-Färbungen ist es notwendig, standardisierte Prozesse zu nutzen. Neben der Fixierungsmethode, der Antigenfreisetzung und der Wahl des spezifischen Antikörpers hat auch dessen Verdünnung Einfluss auf die Quantifizierung [223, 224]. In der vorliegenden Arbeit wurden standardisierte Protokolle, konstante Mikroskopeinstellungen sowie Auswer-

tungsmethoden genutzt (Schwellenwertgrenzen bei ImageJ) und die Bleicheffekte der Fluoreszenzfarbstoffe beachtet. Trotz sorgfältiger Auswahl konnte, biologisch bedingt (zu wenig vitales Gewebe, zu große Nekrosezone), nicht in jeder Aufnahme ein identisches Verhältnis von nekrotischem/apoptotischem zu zellkernmorphologisch intaktem Tumorgewebe untersucht werden. Die Ergebnisse waren deshalb nur im Zusammenhang mit der DAPI-Zellkernfärbung interpretierbar.

Einfluss der dPGS-Behandlung auf die Apoptose

Neben der Proliferation könnte eine gesteigerte Apoptose mögliche Ursache einer Tumorumfangverminderung sein. Deshalb wurde die aktivierte Caspase-3 untersucht, die als Effektor-Caspase zentral in den Apoptoseprozess integriert ist [197].

Die Behandlung der Lungentumoren mit $D = 10$ und 30 mg/kg b.w. dPGS erhöhte den Median der Caspase-3/DAPI-positiven Signale (n. s.). Dies könnte auf eine erhöhte Apoptoserate hindeuten und wäre mit den Resultaten der medianen Tumorumfänge bei $D = 30$ mg/kg b.w. dPGS konform. Das Ergebnis bleibt jedoch zu bestätigen. Neben der Wirkung als Effektor-Caspase [197] kann Caspase-3 jedoch auch die Zellmigration/Metastasierung von A549-Zellen begünstigen [225]. Gleichzeitig fördert sie die Produktion von Prostaglandin E_2 , welches die (Re-)Proliferation von Tumorzellen unterstützen kann [226, 227]. Die Auswirkungen einer dPGS-Behandlung auf Zellmigration und Prostaglandin- E_2 -Produktion sollten demzufolge genauer studiert werden.

Auf die methodischen Diskussionspunkte (Tierzahl, Signifikanz, Quantifizierung von immunhistochemischen Färbungen) wurde zuvor bereits eingegangen. Sie gelten hier analog.

Einfluss der dPGS-Behandlung auf NF- κ B

NF- κ B und dessen Signalkaskaden stehen in Zusammenhang mit der Progression, der Neoangiogenese, der Metastasierung sowie der Resistenzgewinnung von Tumoren [228]. Gleichzeitig ist die Rolle des NF- κ B in der Apoptose uneindeutig [35, 38]. Zusätzlich kann durch die gleichzeitige Blockierung des NF- κ B-Signalweges gemeinsam mit dem Akt-Signalweg die Zytostatikawirksamkeit erhöht werden [229]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften des NF- κ B sollte untersucht werden, ob dPGS die Anzahl oder die räumliche Verteilung von aktiviertem, im Zellkern vorhandenem NF- κ B beeinflusst.

In der Analyse konnte jedoch kein eindeutiger numerischer bzw. räumlicher Unterschied der NF- κ B-positiven Zellkerne zwischen den drei Gruppen am Ende der Beobachtungsperiode gefunden werden. Inwiefern die Bindung von dPGS an NF- κ B während der Behandlungsperiode

stattgefunden hat, war jedoch nicht evaluierbar. Ob dPGS *in vivo* Einfluss auf die Verteilung von NF- κ B in den Tumoren hatte, konnte deshalb nicht beurteilt werden.

4.1.3. Nachweis sulfatierter Moleküle mit Alcian- und Toluidinblau

Initial sollten Mastzellen als Immuneffektoren in Tumoren untersucht werden, da auch Nacktmäuse kutane Mastzellen besitzen [230]. Die Toluidinblaufärbung ist für die Färbung von Mastzellen und Muzinen bekannt [198, 231] und wird zur Darstellung dieser Zellen in der Arbeitsgruppe genutzt. Die Alcian- und Toluidinblaufärbungen sollten jedoch auch für die Zellfärbung *in vitro* etabliert werden. Vorteil der Alcianblau- gegenüber der Toluidinblaufärbung ist die Unlöslichkeit der Färbungspräzipitate in flüssigen Milieus [232]. Durch die Anwendung der Modifikation der Alcianblaufärbung nach Lev et Spicer könnte die selektive Anfärbung von Sulfatgruppen [174] genutzt werden, um dPGS möglicherweise selektiv darzustellen. Theoretische Evidenz wird auch durch die Toluidinblau-Mastzellfärbung erbracht, deren Ergebnis auf der Färbung von Heparin in den Mastzellgranula beruht, welches, wie dPGS [143], ein anionisches, sulfatiertes Makromolekül repräsentiert [218]. Die Färbung des ebenfalls sulfatierten Wirkstoffes Suramin durch Alcianblau ist bekannt [233] und bestätigt das theoretische Prinzip, Wirkstoffe mit histologischen Farbstoffen anzufärben.

Bei der Färbung mit Toluidin- und Alcianblau wurde eine vermehrte Färbung peritumoral gefunden, wenn die Tiere mit dPGS behandelt worden waren. Neben den mikroskopisch gut abgrenzbaren Zellen waren in beiden Behandlungsgruppen flächenhafte, bindegewebige Strukturen peritumoral angefärbt.

In vitro färbt Toluidinblau Zellen, die mit dPGS, dPGSamin sowie dPGSamin-PTX-(6), nicht jedoch mit unsulfatiertem PTX oder dPGamin-ICC inkubiert wurden. Weitere *In-vitro*-Untersuchungen zeigten die Möglichkeit der Zellfärbung mit Alcianblau, wenn Zellen zuvor mit dPGS (Sulfatierungsgrad mind. 70 %) inkubiert wurden. Niedrig bzw. unsulfatierte dPGS/dPG-Derivate konnten hier als Negativkontrolle interpretiert werden, da diese nur in geringerem Maße und dPG nur marginal in Tumorzellen (A549) aufgenommen werden [144]. Insgesamt deuteten die Ergebnisse der histologischen und zytologischen Färbungen mit Alcian- und Toluidinblau auf eine selektive Anfärbung von dPGS(amin) hin. Dies konnte durch die selektive Färbung von dPGS in einem zellfreien System bestätigt werden (Gelelektrophorese mit Alcianblaufärbung; unveröffentlichte Daten; P. Welker, mivenion® GmbH, Berlin). Die Alcianblaufärbung wurde zwischenzeitlich mit lichtmikroskopisch-autoradiographischen Aufnahmen (dPG³⁵S) in der Le-

ber korreliert und zeigte eine gute Übereinstimmung von Alcianblaufärbung und Autoradiographie in Kupffer-Zellen [160].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Alcianblaufärbung, modifiziert nach Lev et Spicer [174], eine einfache, schnell durchführbare und preiswerte Methode gefunden, dPGS-Derivate histologisch und zytologisch nachzuweisen. Da das Färbeergebnis in wässrigen Milieus stabil ist [232], können auf eine Alcianblaufärbung folgend weitere histologische Färbungen erfolgen. Die Methode ist unabhängig von Fluorochrom-Markierungen und den damit einhergehenden Strukturänderungen des Moleküls. Die Alcianblaufärbung kann somit auch an Geweben bereits abgeschlossener Tierversuche zur nachträglichen Untersuchung v. a. pharmakokinetischer Fragestellungen genutzt werden. Die Hyaluronidasevorbehandlung nach [200] verbessert die Färbeselektivität durch Reduktion des unspezifischen Hintergrundes. Sie ist deshalb standardisiert vor der Färbung durchzuführen. Alcianblaufärbungen ergänzen somit ideal das bekannte Darstellungsspektrum von dPGS (Radiographie; Fluorochrom-Markierung) [144, 152-154, 160], wobei jedoch die beiden letztgenannten Methoden vermutlich sensitiver sind.

Für Alcianblaufärbungen wurden keine Quantifizierungsmethoden etabliert. Methodiken zur Glykosaminoglykanquantifizierung könnten dafür jedoch einen Ansatz darstellen [234, 235].

4.1.4. Verteilung von dPGS innerhalb der Tumoren

Erst durch die zuvor diskutierten Färbungen von dPGS mit Alcian- und Toluidinblau wurde die Analyse der Verteilung des dPGS im Tumor ermöglicht.

Am Ende der Nachbeobachtungsperiode konnte dPGS peritumoral histologisch nachgewiesen werden. Eine vergleichbar deutliche Anfärbung von Zellen/Strukturen innerhalb des Tumorgewebes konnte jedoch nicht gesehen werden.

Es bestätigte sich damit, dass dPGS 14 Tage nach Abschluss der Behandlung als sulfatiertes Molekül im tumorumgebenden Bindegewebe vorlag. Daraus kann auf eine Akkumulation und Retention von dPGS um den Tumor geschlossen werden. Für eine Anwendung als Drug-Targeting-System stellen beide Aspekte elementare Parameter dar. Gleichzeitig könnte der histologische Nachweis 14 Tage nach der letzten dPGS-Administration auf einen nur langsamen Abbau/Abtransport aus dem tumorumgebenden Gewebe hindeuten. Inwiefern jedoch nach der letzten Administration eine Freisetzung des Wirkstoffes aus dem subkutanen Injektionsdepot erfolgt ist, konnte in die Interpretation nicht einbezogen werden, u. a. weil diese subkutanen Gewebe für eine Untersuchung nicht mehr zur Verfügung standen.

Der fehlende, vergleichbar deutliche Nachweis von dPGS innerhalb der Tumoren könnte auf einer verminderten intratumoralen Anreicherung beruhen. Neben der Vaskularisierung und Permeabilität sind für die Verteilung von Makromolekülen innerhalb maligner Tumoren die Diffusion, Bindung und Konvektion des Makromoleküls, funktionelle und anatomische Vaskularisationsinhomogenitäten, unterschiedliche Perfusionsraten, der erhöhte interstitielle Druck und der Flüssigkeitsabstrom aus dem Tumor von entscheidender Bedeutung [130, 131, 133, 135, 236]. Es wäre aus diesen Gründen möglich, dass sich das Polymer dPGS nicht oder nur in geringem Maße innerhalb des Tumors verteilt hat und deshalb nur im tumorumgebenden Bindegewebe dargestellt werden konnte. Denkbar wäre jedoch auch der falsch negative Nachweis des dPGS. Dies könnte mit einer gegenüber anderen Methoden verminderten Sensitivität der Alcianblaufärbung begründbar sein.

Die deutlich gefärbten Zellen im tumorumgebenden Bindegewebe der Behandlungsgruppen könnten, der Färbemethode und dem mikroskopischen Bild entsprechend, Mastzellen (Heparin in Granula) und Makrophagen (phagozytiertes dPGS) darstellen. Zur Differenzierung der Mastzellen und Makrophagen im tumorumgebenden Bindegewebe wäre eine Immunhistochemie möglich (CD117 bzw. CD68), um Aussagen zu den peritumoralen Immuneffektoren treffen zu können.

4.2. Untersuchung der Zytotoxizität von dPGS-Konjugaten *in vitro*

Durch die nachgewiesene Anreicherung von dPGS um die Tumoren und der nicht evidenten Toxizität werden pharmakologische Voraussetzungen zur Anwendung von dPGS als Drug-Targeting-System erfüllt. Deshalb sollten im zweiten Abschnitt dieser Arbeit dPGS-Konjugate untersucht werden. Dies erfolgte mit dPGS-Zytostatika-Konjugaten (mivenion® GmbH, Berlin), da Zytostatika eine nur geringe therapeutische Breite haben, jedoch häufig eine hohe Wirksamkeit aufweisen [42].

Der zu der *In-vitro*-Untersuchung genutzte und beschreibende Begriff „Zytotoxizität“ stellt eine Reduktion der biologischen Realität dar. Die gemessene Verminderung der Viabilität ist, im Vergleich zum nicht beeinflussten Wachstum der Kontrollzellen, eine Kombination aus zytotoxischen und zytostatischen Wirkeffekten [237]. Der Begriff wurde dennoch bewusst aus Gründen der Übersichtlichkeit und aufgrund einer fehlenden Differenzierungsmöglichkeit zwischen beiden Mechanismen genutzt. Zusätzlich wird der Begriff „Zytotoxizität“ für ähnliche Fragestellungen auch durch andere Gruppen angewendet [238].

4.2.1. Der MTT-Test und die Ermittlung der IC₅₀-Werte

Für die Untersuchung der Zytotoxizität wurde der MTT-Test genutzt, wobei jedoch insbesondere bei PTX und PTX-Konjugaten große Intertest-Variabilitäten auftraten, in deren Folge breite Vertrauensintervalle ermittelt wurden. Große Interassay-Variabilitäten bei Zytotoxizitätsmessungen sind nach Anwendung des MTT-Testes auch aus anderen Arbeiten bekannt [237]. Zusätzlich differieren die aus der Literatur bekannten IC₅₀-Werte für gleiche Zytostatika z. T. erheblich (Übersicht in [238]). Ursächlich für Intertest-Variabilitäten könnten instabile zelluläre Sensibilitäten auf gleiche Wirkstoffe, nicht kontrollierbare Variationen von Zellzyklusparametern und unterschiedliche Wachstumsraten zwischen den Zelllinien sein [237]. Photochemische Artefakte werden ebenfalls als Ursache für differierende IC₅₀-Werte angesehen [238].

Auch wenn der MTT-Test als schnell durchzuführender Test zur Ermittlung der Sensibilität bspw. von Lungentumor-Zelllinien auf Zytostatika bekannt ist [239] und vielfach, u. a. nach PTX-Inkubation, genutzt wird [240-242], ist er diskutabel. Verglichen mit einem ATP-Assay zeigte der MTT-Test zytostatikumsabhängig vorwiegend niedrigere Wachstumsinhibitionen [243]. Zwischen MTT- und ATP-Assay konnten für PTX IC₅₀-Werte ermittelt werden, die sich um den Faktor $\approx 7,5$ unterschieden (A549-Zellen) [243]. Zusätzlich kann die Absorptionsrate beim MTT-Test durch PTX-Inkubation erhöht werden (falsch hohe Viabilität) [244]. Auch die genutzten 96-Multiwell-Platten beeinflussen infolge „parabelförmiger Wachstumsmuster“ Inhibierungsversuche [245]. Für zukünftige IC₅₀-Berechnungen ist deshalb eine durch Faessel et al. vorgeschlagene Randomisierung der Plattenbelegung zu etablieren [245] und auf andere Testverfahren (ATP-Test, Zellzählung) auszuweichen.

4.2.2. Screening kovalenter dPGS-Zytostatika-Konjugate

Die dPGS-Zytostatika-Konjugate wurden auf 7 Zelllinien hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht, um ein Konjugat zur genaueren Evaluation auszuwählen.

Die Wirksamkeit der dPGS-Zytostatika-Konjugate und der freien Zytostatika war zelllinien-, konjugat- und zeitabhängig. Bei den dPGS-PTX-Konjugaten wiesen dPGSamin-PTX-(5 bzw. 6) insgesamt die beste Wirksamkeit auf. Im Vergleich dazu zeigten das hochbeladene dPGSamin-CAB-(6) und dPGSamin-CAB-(3) keinen inhibitorischen Effekt. dPGSamin-CAB-(5) wies, verglichen mit CAB, gute Wirksamkeiten auf. Die Zytotoxizität von dGSamin-DXR-(1)- und dPGamin-MTX-(2)-Konjugaten war gegenüber DXR bzw. MTX deutlich vermindert.

PTX und dPGS-PTX-Konjugate

Die dPGS-PTX-Konjugate wiesen differente Wirksamkeiten auf. dPGSamin-PTX-(5) und -(6) wiesen die niedrigsten IC_{50} -Werte der dPGS-PTX-Konjugate auf, die jedoch i. d. R. höher als die des PTX waren. Mit $IC_{50} = 15$ nmol/l besaß das Konjugat dPGSamin-PTX-(6) bei A431-Zellen gegenüber PTX ($IC_{50} = 95 \pm 78$ nmol/l) eine numerisch erhöhte zytotoxische Aktivität. Zusätzlich war die Synthese des dPGS-Anteils gegenüber dPGSamin-PTX-(5) verbessert worden (automatisierter Batch-Prozess), sodass trotz der niedrigeren IC_{50} -Werte des dPGSamin-PTX-(5) das Konjugat-(6) zur weiteren Analyse ausgewählt und bei A431-Zellen und A549-Zellen (Tierversuch) evaluiert wurde. Da dPGSamin-PTX-(6) im Folgenden diskutiert wird, soll es an dieser Stelle nicht ausführlich erörtert werden.

CAB und dPGS-CAB-Konjugate

Trotz eines hohen molaren Anteils an gebundenem CAB ($n = 7$ mol CAB/1 mol dPGS) war dPGSamin-CAB-(6) nicht wirksam. Ursächlich für die nicht nachweisbare Wirksamkeit könnte eine verminderte Löslichkeit oder eine Präzipitation gewesen sein. Unlösliche Drug-Targeting-Systeme erfüllen jedoch nicht die an sie gestellten Anforderungen und können häufig nicht als Arzneimittel eingesetzt werden [111]. Die Problematik der veränderlichen Löslichkeit bzw. der Präzipitation, in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von Wirkstoff:Träger ist auch bei anderen Drug-Targeting-Systemen bekannt [246]. Die hohe Beladung könnte auch die zelluläre Aufnahme verhindert haben, da der apolare CAB-Anteil die für dPGS bekannte Aufnahme über OATP-Transporter [161] beeinflussen könnte. Da jedoch dPGSamin-CAB-(5) ($n = 2$ mol CAB/1 mol dPGS) zytotoxisch aktiv war, ist das Optimum der Beladung von dPGS mit den einzelnen Zytostatika zu ermitteln.

Die Wahl des CAB sollte dennoch diskutiert werden, da CAB hepatisch in einen zytotoxisch aktiveren Metaboliten verstoffwechselt wird [63, 64]. Bei einer Anwendung von CAB in dPGS-CAB-Konjugaten wäre dies vermutlich nicht mehr in vergleichbarer Weise möglich. Zusätzlich erfolgt die Metabolisierung im Bindungsbereich zum dPGS-Polymer, sodass eine Metabolisierung nur nach Freisetzung des CAB möglich wäre. Dadurch würde jedoch der Verlust des Drug-Targeting-Mechanismus erfolgen, da nach Spaltung/Metabolisierung mit dPGSamin und CAB zwei einzelne Komponenten vorliegen würden. Deshalb sollten keine Wirkstoffe genutzt werden, deren Wirkung anteilig auf einem hepatisch aktivierten Metaboliten beruht.

MTX und dPGS-MTX-Konjugat

Das dPGSamin-MTX-(2) wies im Vergleich zu MTX eine geringere Wirksamkeit auf. Ursächlich dafür könnte die durch dPGSamin verursachte Bindungsinhibierung von MTX an die DHFR sein. Eine Freisetzung von MTX (Amidbindung) schien nicht oder nur in geringem Maße stattzufinden, da auch bei einer verlängerten Inkubationszeit ($t = 96$ h) die IC_{50} -Werte des dPGSamin-MTX-(2) im Vergleich zu MTX deutlich erhöht waren. Ohne eine Freisetzung ist der Wirkmechanismus des MTX [69] vermutlich aufgehoben, sodass dPGSamin-MTX-(2) aufgrund der fehlenden Wirksamkeit nicht weiter untersucht wurde. Die Bindungen bzw. die Linker sind deshalb für eine Freisetzung zu modifizieren (Esterbindung).

DXR und dPGS-DXR-Konjugate

Auch dPGSamin-DXR-(1) zeigte im Vergleich zu DXR eine deutlich verminderte Wirksamkeit. Ursächlich könnte dafür eine verminderte zelluläre oder nukleäre Aufnahme des dPGSamin-DXR-(1) bzw. dessen DXR-Anteils sein. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DXR und dPGSamin-DXR-(1) bestätigten, dass sich Letzteres perinukleär, nicht jedoch intranukleär, anreicherte. Aufgrund des interkalierenden Wirkmechanismus von DXR [71] kann ohne Freisetzung von DXR aus dPGSamin-DXR-(1) keine Wirkung erzielt werden. Da auch bei $t = 48$ h eine stark verminderte Wirksamkeit ermittelt wurde, kann von nur einer geringen/langsamen Freisetzung des DXR aus dem Konjugat ausgegangen werden.

Es sind Polyglycerol-DXR-Konjugate mit enzymatisch spaltbaren Linkern entwickelt worden [247], die verglichen mit DXR nur zu einer gering verminderten Wirksamkeit des Polyglycerol-DXR-Konjugates führten [247]. Diese Bindungsart könnte ein Modell zur Weiterentwicklung des dPGS-DXR darstellen. Aufgrund des fehlenden Überganges des DXR-Anteils in den Zellkern erfolgte keine weitere Evaluierung des dPGSamin-DXR-(1).

Methodische Aspekte

Die hohe Anzahl an Konjugaten und Zelllinien machte eine Reduktion der zu untersuchenden Konzentrationen notwendig. Dadurch wurden Voraussetzungen für genaue Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen nicht erreicht (2 Konzentrationen ober-/unterhalb von 50 %) [190]. Dennoch korrelieren unter bestimmten Voraussetzungen vorläufige Daten aus 2-Punkt-Messungen gut mit 10-Punkt-Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen [248]. Das Screening wurde dennoch nur zu einer ersten Eingrenzung des Konzentrationsbereiches genutzt, indem der genaue IC_{50} -Bereich wahrscheinlich liegt. Für detaillierte Struktur-Wirkungs-Ableitungen konnte es jedoch nicht genutzt werden, da die Zahl der untersuchten Konzentrationen gering war, die

IC₅₀-Werte z. T. nicht im untersuchten Konzentrationsbereich lagen und die Experimente aufgrund der hohen Substanzanzahl nicht wiederholt werden konnten.

PTX-Konjugate benötigen eine zytoplasmatische Anreicherung ohne die vorherige hepatische Biotransformation. Zusätzlich zu den zuvor diskutierten Begründungen wurde deshalb dPGSamin-PTX-(6) zur weiteren Analyse ausgewählt.

Dieses Konjugat wies vergleichbare L-Selektin-Bindungen wie das nicht konjugierte dPGSamin auf, wodurch auf den Erhalt der Bindungsfähigkeiten geschlossen werden könnte [157]. Dieser Aspekt ist insbesondere in Hinsicht auf die zuvor diskutierten Mechanismen im Xenograft-Tumor von hoher Bedeutung.

4.2.3. Zytotoxizität von PTX und dPGSamin-PTX-(6)

Zytotoxizität von PTX und dPGSamin-PTX-(6) bei Tumorzellen

IC₅₀-Wert-Berechnungen für dPGSamin-PTX-(6) wurden bei A549- und A431-Zellen durchgeführt.

Mit Zunahme der Konzentration und der Inkubationszeit verringerten sich bei A431- und A549-Zellen die IC₅₀-Werte für PTX und dPGSamin-PTX-(6). Die IC₅₀-Werte von dPGSamin-PTX-(6) waren dabei im Vergleich zu PTX erhöht [155].

Der IC₅₀-Wert für PTX bei A549-Zellen von IC₅₀ = 14,5 nmol/l (*t* = 48h) ist mit den Werten anderer Gruppen vergleichbar (IC₅₀ = 19 nmol/l [249]; IC₅₀ = 20 nmol/l [250]). Abweichend davon wurden jedoch auch deutlich höhere Werte beschrieben (IC₅₀ = 109 nmol/l) [251], wobei jedoch FK-12-Medium und Cremophor® EL als Lösungsmittel genutzt wurden [251]. Auch der errechnete IC₅₀-Wert für PTX bei A549-Zellen von IC₅₀ = 2,6 nmol/l (*t* = 72 h Inkubation) ist mit den IC₅₀-Werten anderer Veröffentlichungen vergleichbar (IC₅₀ = 2,3 nmol/l [252]; IC₅₀ = 3,6 nmol/l [253]; IC₅₀ = 3,0 nmol/l [254]; IC₅₀ = 8 nmol/l [255]).

Demgegenüber variieren jedoch die gefundenen IC₅₀-Werte für PTX bei A431-Zellen. Für *t* = 24h Inkubation wurde mit IC₅₀ = 138 nmol/l durch Miyata ein höherer IC₅₀-Wert beschrieben als der in dieser Arbeit präsentierte (IC₅₀ = 89 nmol/l) [256]. Zusätzlich differieren für *t* = 72 h die IC₅₀-Werte für PTX innerhalb der Literatur (IC₅₀ = 3,6 nmol/l [257]; IC₅₀ = 36 nmol/l [258]) und damit teilweise zu dem hier ermittelten Wert (IC₅₀ = 1,7 nmol/l). Trotz der partiellen Abweichungen der IC₅₀-Werte für PTX und den zuvor diskutierten Intertest-Abweichungen ließen die dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen auf eine in sich vorhandene Konsistenz der Ergebnisse schließen [155].

Der teilweise signifikante Unterschied der IC_{50} -Werte zwischen dPGSamin-PTX-(6) und PTX ist möglicherweise durch den Aufnahmemechanismus zu erklären. Im Gegensatz zu PTX, das u. a. durch freie Diffusion aufgenommen wird [47, 52], wird dPGS durch OATP-Transporter transportiert [161]. Dies gilt vermutlich auch für dPGSamin-PTX-(6), da eine freie Diffusion für dieses Konjugat nicht anzunehmen ist und endozytotische Aufnahmemechanismen von dPGS vorwiegend bei Makrophagen nachgewiesen wurden [161].

Zu differenzierten Aufnahmegeschwindigkeiten des Konjugates bei verschiedenen Zelllinien sind bislang keine Aussagen möglich, da nur A431-Zellen hinsichtlich einer detaillierten Aufnahme von dPGSamin-PTX-(6)-ICC untersucht worden sind (Kapitel 3.5.1.).

Da die ermittelten IC_{50} -Werte des dPGSamin-PTX-(6) und des PTX teilweise größenordnungsmäßig vergleichbar waren und bei höheren Inkubationszeiträumen ($t = 72$ h; $t = 48$ h [A431]) im niedrigen nanomolaren Bereich lagen, sollte dPGSamin-PTX-(6) weiter untersucht werden.

Zytotoxizität von PTX und dPGSamin-PTX-(6) bei HUVEC-Zellen

Die Wirkung des dPGSamin-PTX-(6) sollte auch bei nicht-malignen HUVEC-Zellen evaluiert werden, um erste Aussagen zur Sicherheit und Selektivität des Konjugates ableiten zu können. Die verglichen mit anderen Experimenten längere Inkubationszeit ($t = 72$ h; nach Adhäsion über Nacht) wurde aufgrund der hohen Verdopplungszeit von HUVEC-Zellen von $t = 92$ h in der logarithmischen Phase des Wachstums festgelegt [188].

Die IC_{50} -Werte von PTX und dPGSamin-PTX-(6) unterschieden sich bei der Inkubation auf HUVEC-Zellen signifikant (Faktor = 89-fach). Der gegenüber PTX erhöhte IC_{50} -Wert von dPGSamin-PTX-(6) könnte als Hinweis auf eine verbesserte Spezifität des Konjugates interpretiert werden. Grund für diese Annahme sind, verglichen mit dem hier vorgestellten Faktor, die deutlich niedrigeren Faktoren der IC_{50} -Differenz bei Tumorzellen. Zusätzlich wird PTX unselektiv aufgenommen [47]. Dennoch ist nicht eindeutig darstellbar, worauf dieses Ergebnis zurückzuführen ist, da dPGS-ICC auch in HUVEC-Zellen nachgewiesen werden konnte [153] und dPGSamin-PTX-(6) dadurch vermutlich ebenfalls in die HUVEC-Zellen aufgenommen werden kann. Ursächlich könnte eine deutlich verminderte Quantität des aufgenommenen PTX-Anteils bei der dPGSamin-PTX-(6)-Inkubation im Vergleich zum frei diffundierenden PTX sein.

Auch in diesem Experiment wurden hohe Intertest-Abweichungen, insbesondere bei PTX, nachgewiesen. Der hier errechnete IC_{50} -Wert für PTX ($IC_{50} = 0,45$ nmol/l) war dennoch größenordnungsmäßig mit den bekannten IC_{50} -Werten konform ($IC_{50} = 0,4$ nmol/l [259];

$IC_{50} = 2 \text{ nmol/l}$ [260]; $IC_{50} = 2,2 \text{ nmol/l}$ [261]) und das Ergebnis somit trotz der Inter-test-Abweichungen interpretierbar.

Einfluss des Sulfatierungsgrades von dPGSamin auf die Zytotoxizität von dPGSamin-PTX-(6)

Zur Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen sollten niedriger sulfatierte dPGS-Varianten hinsichtlich der Zytotoxizität bewertet werden, da bekannt ist, dass die zelluläre Aufnahme dendritischer Polyglycerole neben der Größe [215] auch von den funktionellen Gruppen/der Ladung abhängig ist [144]. Als Negativkontrolle sollte dPGamin-PTX genutzt werden, das aufgrund der nur marginalen zellulären Aufnahme von dPG-ICC [144] keine oder eine nur stark verminderte Wirkung vermitteln sollte.

Konform mit vorbekannten Ergebnissen [144], wies dPGSamin keine Inhibierung der Viabilität auf [155]. Demgegenüber konnte jedoch zwischen PTX, dPGSamin-PTX-(6), den niedriger sulfatierten dPGSamin-PTX-(6)-Derivaten und – unerwarteterweise – auch dem nicht sulfatierten dPGamin-PTX kein signifikanter Unterschied der IC_{50} -Werte belegt werden.

Die angenommene Struktur-Wirkungs-Beziehung konnte damit nicht bewiesen werden, wodurch die Hypothese der reduzierten *In-vitro*-Wirksamkeit bei einem verminderten Sulfatierungsgrad verworfen werden musste. Ursächlich dafür könnten eine unerwartet stattfindende Aufnahme von dPGamin-PTX oder die frühzeitige Freisetzung des zytotoxisch aktiven Wirkstoffes PTX vom dPGamin-PTX sein. Diese Hypothesen werden in den Kapiteln 4.4.–4.6. ausführlich überprüft und diskutiert.

Verglichen mit den zuvor dargestellten IC_{50} -Werten der Zeitabhängigkeitsanalyse, konnten in den hier diskutierten Experimenten sowohl für PTX als auch für dPGSamin-PTX-(6) signifikant erhöhte IC_{50} -Werte gefunden werden. Dies könnte durch unterschiedliche Präinkubationsbedingungen erklärt werden. Während im hier dargestellten Experiment die Substanzzugabe bereits nach einigen Stunden erfolgte, sind in den zuvor genannten Experimenten wirkstofffreie Präinkubationen zur Zelladhärenz genutzt worden. Dies könnte auf den Einfluss der Aussaat- und Präinkubationsbedingungen auf den Zellzyklus und damit folgend auf die Ergebnisse von Zytotoxizitätstests hinweisen [237].

4.3. Analyse ICC-markierter Substanzen

Zur weiteren Analyse von PTX, dPGSamin-PTX-(6), dPGSamin und dPGamin-PTX wurden die Konjugate mit ICC-markiert (mivenion® GmbH, Berlin). Fluorochrom-Markierungen der

dPGS-Derivate und von PTX stellen eine Möglichkeit zur Analyse der zellulären Aufnahme und Verteilung dar [144, 152, 154, 155, 191].

Einfluss der ICC-Markierung auf die Zytotoxizität

Durch eine ICC-Markierung werden die räumliche Struktur und die Größe der Konjugate verändert, wodurch ein Einfluss auf die biologische Aktivität ausgeübt werden könnte.

Die IC_{50} -Werte von PTX, verglichen mit PTX-ICC, und von dPGSamin-PTX-(6), im Vergleich zu dPGSamin-PTX-(6)-ICC, waren signifikant vermindert. Die ICC-Konjugation zeigte demnach einen negativen Einfluss auf die zytotoxische Wirksamkeit.

Eventuell waren die erhöhten IC_{50} -Werte der ICC-Konjugate auf ein verändertes Aufnahmeverhalten zurückführbar. Dabei unterschieden sich jedoch die relativen Anteile des ICC ($M = 930$ Da [156]) am Gesamtmolekulargewicht von PTX-ICC ($M \approx 1700$ Da) und dPGSamin-PTX-(6)-ICC ($M \approx 14,3$ kDa). Ursächlich könnte die ICC-Konjugation die Aufnahmegeschwindigkeit und folglich auch die *In-vitro*-Wirksamkeit, insbesondere bei PTX-ICC, verändert haben. Zusätzlich wurde die ICC-Konjugation an der C-13-Seitenkette des PTX durchgeführt, die jedoch einen pharmakologisch aktiven Anteil des PTX darstellt [262]. Dies könnte für eine Zytotoxizitätsverminderung ursächlich sein.

Der paradoxe Abfall der Viabilität bei $c = 1$ nmol/l PTX bzw. PTX-ICC war rational nicht erklärbar, da trotz mehrfacher Wiederholung, auch durch unterschiedliche Personen, vergleichbare Ergebnisse ermittelt wurden. Kontrolluntersuchungen durch Zellzählungen mit dem Casy®-System zeigten bei dieser Konzentration für PTX jedoch keinen deutlichen Abfall der lebenden Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Konzentration $c = 1$ nmol/l wurde aus diesem Grund aus der IC_{50} -Wert-Berechnung ausgeschlossen.

Analyse der Absorption und Fluoreszenz

Trotz der Anwendung des gleichen Farbstoffes wurde durch die Konjugation das Spektrum des ICC verändert, sodass sich die Wellenlängen der Absorptionsmaxima untereinander und z. T. von den bekannten Werten [156] geringfügig unterschieden. Zusätzlich differierte die Fluoreszenz der Konjugate und es traten Quenching-Effekte auf.

Die Untersuchung erfolgte mit Verdünnungen bezogen auf das Gesamtmolekulargewicht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Konjugate unterschiedliche molare Anteile des ICC-Farbstoffes gebunden hatten. Eine rechnerische „Normierung“ konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da bspw. die gemessenen Fluoreszenzwerte von dPGSamin-ICC trotz höherer ICC-Beladung ($n = 0,4$ mol ICC/1 mol PTX) gegenüber dem niedriger beladenen dPGSamin-PTX-(6)-ICC

($n = 0,2$ mol ICC/1 mol dPGS) vermindert waren. Verdünnungen bezogen auf den ICC-Anteil wären theoretisch möglich gewesen. Damit würden sich jedoch in den folgenden biologischen Untersuchungen auch die molaren Anteile von zytotoxisch aktivem PTX unterscheiden, die ihrerseits möglicherweise einen Einfluss auf die Aufnahme und Elimination ausüben (Kapitel 4.4). Zusätzlich erschwerte das Quenching die Interpretation. Ein quantitativer Vergleich zwischen den Substanzen hinsichtlich der (intrazellulären) Fluoreszenz war deshalb nicht möglich. Für einzelne Konjugate ist jedoch in sich eine Verlaufsanalyse der Fluoreszenz möglich gewesen. Für quantifizierende Analysen von Aufnahmekinetiken der dPGS-Fluorochrom-Konjugate ist es deshalb notwendig, neue Konjugate zu entwickeln, deren Fluoreszenzquantität vergleichbar hoch ist. Das Problem der Strukturveränderung durch die ICC-Konjugationen würde dadurch jedoch nicht umgangen werden. Es sollten andere, fluorochromunabhängige Methoden zur Quantifizierung der zellulären dPGS-Derivat-Aufnahme genutzt und weiterentwickelt werden [153, 160]. Für die Vergleichsmessung von PTX könnte [^3H]Paclitaxel genutzt werden [49, 52].

4.4. Aufnahme und Elimination bei Zellen *in vitro*

4.4.1. Aufnahme von PTX-ICC, dPGSamin-PTX-(6)-ICC, dPGSamin-ICC und dPGamin-PTX-ICC in A431-Zellen

Ein Drug-Targeting-System für Zytostatika muss wahlweise vollständig intrazellulär aufgenommen werden oder das Zytostatikum extrazellulär zur Aufnahme freisetzen, da Zytostatika ihre Wirkung in aller Regel intrazellulär bzw. intranukleär vermitteln [42]. Die Freisetzung der Wirkstoffe ist dabei u. a. vom Linker bzw. der Bindung abhängig [108]. Aufgrund der transporter-vermittelten Aufnahme von dPGS-Fluorochrom-Derivaten in Tumorzellen [144, 161] sollten Aufnahmekinetiken auch für dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dessen Kontrollen ermittelt werden. Die Zunahme der Fluoreszenz wird hier, wie im folgenden Kapitel erläutert wird, methodisch vereinfachend mit einer Aufnahme des Konjugates gleichgesetzt.

Bei der PTX-ICC-Inkubation konnte eine logarithmische Zunahme der Fluoreszenz mit einem Sättigungsplateau gefunden werden. dPGSamin-PTX-(6)-ICC wies im Vergleich dazu eine nicht gesättigte, lineare Kinetik der Fluoreszenzzunahme über $t = 48$ h auf, während die Fluoreszenz von dPGamin-PTX-ICC nur geringgradig über dem Kontrollniveau lag. Die Inkubation mit dPGSamin-ICC führte zu einer linearen Fluoreszenzzunahme bis $t \approx 10$ h. Danach wurde für dPGSamin-ICC ein Sättigungsplateau der Fluoreszenz nachgewiesen.

Die zelluläre Aufnahme von PTX erfolgt durch Diffusion [47] und über OATP1B1/3-Transporter [50]. In anderen Untersuchungen wurde ein Sättigungsplateau des intrazellulären PTX bereits nach einer Stunde Inkubationszeit erreicht [263]. Dafür ursächlich war möglicherweise das durch die ICC-Konjugation geänderte Molekulargewicht ($M_{PTX} = 850$ Da; $M_{PTX-ICC} \approx 1700$ Da) sowie die räumliche Struktur des PTX-ICC. Beide Parameter könnten die Aufnahmegeschwindigkeit beeinflussen. Dennoch waren auch die differierenden Zelllinien potentiell für die unterschiedlichen Kinetiken kausal verantwortlich (MCF7-Zellen [263] ggü. A431-Zellen). Die intrazelluläre Anreicherung des PTX ($c \geq 100$ nmol/l) ist von der Menge der intrazellulären Bindungsstellen und der induzierbaren Erhöhung der Tubulinkonzentration abhängig [264]. Diese Aspekte könnten im hier untersuchten Modell zur Sättigung beigetragen haben. Die gefundenen Unterschiede der Aufnahmekinetik zwischen PTX-ICC und dPGSamin-PTX-(6)-ICC (logarithmisch gegenüber linear) beruhen vermutlich auf den unterschiedlichen Aufnahmemechanismen, wobei die Diffusion bei PTX einen Anteil trägt [47], während dies für das dPGSamin-PTX-(6)-ICC nicht anzunehmen ist. Interessanterweise wurde für dPGSamin-PTX-(6)-ICC kein Sättigungsplateau innerhalb der Inkubationszeit gefunden ($t_{max} = 48$ h). Es wäre jedoch möglich, dass das Sättigungsplateau von dPGSamin-PTX-(6)-ICC erst nach $t > 48$ h erreicht werden würde und hier nicht abgebildet wurde. Es war damit nicht vollständig evaluierbar, ob die ermittelte Aufnahmefunktion von dPGSamin-PTX-(6) der des dPGSamin-ICC mit einer zeitlichen Verschiebung ähneln würde. Längere Inkubationen von PTX-beladenen Konjugaten wären aufgrund der Zytotoxizität in der hier genutzten Konzentration nur unter einem hohem Viabilitätsverlust der Zellen durchführbar (vgl. Daten der Zytotoxizität von dPGSamin-PTX-(6); Kapitel 3.2.2.).

Konsistent mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen sind auch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Inkubation von dPGSamin-PTX-(6)-ICC, wobei eine stetige optische Zunahme der Fluoreszenz gefunden wurde. Bereits nach $t = 30$ min konnte eine fluoreszenzmikroskopisch darstellbare Menge von dPGSamin-PTX-(6)-ICC gesehen werden, die vermutlich an die Zelloberfläche bzw. Transportproteine gebunden hatte. Die beobachteten Zellkernfragmentierungen wurden als histologische Zeichen der Toxizität interpretiert, die bei der inkubierten Konzentration ($c = 1$ μ mol/l dPGSamin-PTX-(6)-ICC) in Übereinstimmung zu den reduzierten Viabilitäten nach $t = 24$ h Inkubationszeit von dPGSamin-PTX-(6) steht.

Die Aufnahme von dPGSamin-ICC, das keine Bindung an Tubulin aufweisen kann oder toxisch wirkt, wurde im Gegensatz dazu gesättigt. Im Vergleich dazu stieg die Fluoreszenz nach Inkuba-

tion von dPGamin-PTX-ICC nur geringfügig über das Kontrollniveau an. Dieses erwartete Ergebnis war mit der bekannten marginalen Aufnahme von dPG-Derivaten in Verbindung zu bringen und hebt die Bedeutung der Ladung und Größe bei der Aufnahme von Polyglycerolen hervor [144, 215].

Da die intrazelluläre PTX-Konzentration u. a. von der extrazellulären Konzentration abhängig ist [263], sollten weitere Konzentrationsbereiche untersucht werden. Niedrigere Konzentrationen waren jedoch nicht mit den zur Verfügung stehenden Fluorochrom-Konjugaten im FACSCalibur™-System messbar, sodass auf andere Methoden ausgewichen werden muss.

Bei der Interpretation war, wie eingangs angedeutet, zu berücksichtigen, dass die gemessenen Fluoreszenzwerte nicht alleiniges Ergebnis eines zelleinwärts gerichteten Transportes, sondern auch einer hier nicht differenzierbaren Elimination darstellen. Auf diese wird im Folgenden eingegangen.

4.4.2. Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC und dPGSamin-ICC

Untersuchungen zur Elimination sollten aufzeigen, wie lange die Fluoreszenz von dPGSamin-PTX-(6)-ICC intrazellulär nachweisbar ist, nachdem das Konjugat extrazellulär entfernt worden war (intrazelluläre Retention).

Es wurde gezeigt, dass die Elimination von dPGSamin-PTX-(6)-ICC im Vergleich zu der Elimination von dPGSamin-ICC aus A431-Zellen verlangsamt war. Der zytotoxisch aktive Wirkanteil PTX des dPGSamin-PTX-(6)-ICC beeinflusste folglich die Elimination.

Die Fluoreszenzhalbwertszeit nach Inkubationsende von dPGSamin-ICC lag mit $t_{1/2} \approx 19$ h in einem ähnlichen Bereich, wie die durch Palkar et al. ermittelten Verdopplungszeiten von A431-Zellen ($t_1 = 21,5$ h; $t_2 = 22,8$ h) [265]. Es wäre damit möglich, dass nur eine „scheinbare“ Elimination gemessen wurde. Aufgrund der bekannten guten Biokompatibilität von dPGS und der fehlenden Inhibition des Zellwachstums in den Zytotoxizitätsuntersuchungen [144, 155] könnte die Fluoreszenzverminderung durch Zellteilung stattgefunden haben und aufgenommene Fluorochrom-Polymere auf Tochtergenerationen verteilt worden sein. Da der genaue Eliminationsmechanismus von dPGSamin(-ICC) jedoch bislang unbekannt ist, könnte auch ein intrazellulärer Abbau bzw. aktiver Transport stattfinden.

Im Vergleich dazu wurde innerhalb von $t = 48$ h keine Halbierung der Ausgangsfluoreszenz nach dPGSamin-PTX-(6)-ICC-Inkubation erreicht. Dies könnte einerseits auf einer PTX-vermittelten Bindung des Konjugates an Tubulin, andererseits jedoch auch auf der zytotoxi-

schen/zytostatischen Wirkung beruhen [54-56, 58], die eine Verteilung der Fluoreszenz auf Tochtergenerationen verhindert.

Diese Unterschiede der Eliminationskinetik und die möglichen Erklärungsansätze beider Konjugate könnten auch die zuvor dargestellten Aufnahmekinetiken beeinflusst haben.

Wie im Folgenden diskutiert wird, sollten auch intrazellulär stabile dPGS-PTX-Konjugate evaluiert werden. Mit einem solchen intrazellulär stabilen Konjugat könnte möglicherweise einer der Resistenzmechanismen gegenüber PTX gehemmt werden. P-gp-Transporter können durch einen zellauswärts gerichteten Transport von PTX zur Resistenz von Zellen beitragen [89-91, 266]. Substrate der P-gp-Transporter sind vorwiegend hydrophob, häufig ungeladen oder kationisch, enthalten vielfach aromatische Gruppen und weisen i. d. R. ein Molekulargewicht von $M = 200-1900$ Da auf [267, 268]. dPGS ist damit möglicherweise kein Substrat von P-gp-Transportern. Ein auch intrazellulär stabiles dPGS-PTX-Konjugat könnte demnach die Elimination des PTX-Anteils aus Zellen verlangsamen bzw. verhindern.

4.5. Nachweis des Wirkmechanismus von PTX und dPGSamin-PTX-(6)

Für die Zurückführung der viabilitätsmindernden Wirkung des dPGSamin-PTX-(6) auf den PTX-Anteil wurden Zellzyklusanalysen und Darstellungen der intrazellulären Tubulinverteilung genutzt. Gleichzeitig sollte die *In-vitro*-Wirkung von dPGamin-PTX genauer beurteilt werden. Beide Methoden stellen bekannte Wirkmechanismusedarstellungen für PTX dar [58, 252].

Während PTX zu einer deutlichen Erhöhung des G₂/M-Anteils führte, wiesen dPGSamin-PTX-(6) und dPGamin-PTX nur eine geringfügige Erhöhung des G₂/M-Anteils auf. Die nach höherer Inkubationskonzentration durchgeführten histologischen Darstellungen zeigten jedoch deutliche Veränderungen der Verteilung des Tubulins nach Inkubation von PTX, dPGSamin-PTX-(6) und dPGamin-PTX. dPGSamin beeinflusste den numerischen G₂/M-Anteil und das zytologische Bild der Tubulinverteilung nicht. Fehlende Hinweise auf Tubulin-, Zellkern- oder Zellzyklusveränderungen nach dPGSamin-Inkubation waren konsistent mit der bekannten *In-vitro*-Verträglichkeit und den hier dargestellten Viabilitätsuntersuchungen [144, 155]. Die Wirkung des PTX auf den Zellzyklus kann mit dem bekannten Wirkmechanismus in Verbindung gebracht werden [58] und ist zu vergleichbaren Ergebnissen bei A549-Zellen konform ($t = 18$ h Inkubation) [269]. Der deutlich geringer ausgeprägte Anstieg des G₂/M-Anteils durch die dPGSamin-PTX-(6)-Inkubation im Vergleich zu der PTX-Inkubation ist eventuell durch eine langsamere Aufnahme des Konjugates erklärbar. Zusätzlich unterschieden sich bei der gewählten Konzentration die Viabilitäten nach $t = 24$ h Inkubation von PTX bzw. dPGSamin-PTX-(6),

sodass das Ergebnis den zeitlich schnelleren Wirkeintritt für PTX in den gemessenen Zellzyklusparametern widerspiegelt. Dennoch ist der Anteil an G₂/M-Zellen nach $t = 12$ h Inkubation von dPGSamin-PTX-(6) niedriger als erwartet. Der Wirkmechanismus des dPGSamin-PTX-(6) wurde jedoch eindeutig mit der mikroskopisch dargestellten, PTX-vermittelten Wirkung auf die Verteilung von Tubulin nachgewiesen (höhere Konzentration). Diese Veränderungen waren in Einklang mit den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen. Die gewählte Konzentration in der Zellzyklusanalyse ist damit für die Inkubationszeit ($t = 12$ h) niedriger als die zur G₂/M-Anteils-Erhöhung notwendige Konzentration.

Aus den Experimenten bestätigte sich jedoch, dass auch dPGamin-PTX zu einer PTX-vermittelten Wirkung führte und diese auf den Zellzyklus vergleichbare Auswirkungen wie eine dPGSamin-PTX-(6)-Inkubation hat. Es konnte aus der Übereinstimmung der Tubulin-Darstellungen und der Zellzyklus-Ergebnisse geschlossen werden, dass dPGamin-PTX und dPGSamin-PTX-(6) die gleiche Wirksamkeit aufweisen. Diese Ergebnisse dienen der Bestätigung der primär unerwartet vergleichbar niedrigen IC₅₀-Werte von dPGSamin-PTX-(6) und dPGamin-PTX (IC₅₀ = 33 nmol/l bzw. 50 nmol/l; $t = 48$ h Inkubation). Es widerspricht jedoch der nach dPGamin-PTX-ICC-Inkubation nur geringfügig über das Kontrollniveau zunehmenden zellulären Fluoreszenz, die auf eine nur marginale zelluläre Aufnahme des Konjugates schließen ließ und mit Vorergebnissen zur Aufnahme von dPG-ICC übereinstimmend war [144, 155].

Basierend auf den theoretischen Möglichkeiten zur Erklärung dieses Effektes – der Verunreinigung der Probe mit freiem PTX, der zellulären Aufnahme von dPGamin-PTX oder der Freisetzung von PTX vom Polymer – konnte Letzteres angenommen werden, da Verunreinigungen aus dem Syntheseprozess ausgeschlossen werden konnten [270] und keine deutliche, über dem Kontrollniveau liegende Aufnahme für dPGamin-PTX-ICC nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der gleichen Bindungsart hatte dieses Ergebnis auch Auswirkungen auf die Interpretation der dPGSamin-PTX-(6)-Ergebnisse [155].

4.6. Freisetzung des PTX und Struktur des dPGSamin-PTX-(6)-Konjugates

Freisetzung von PTX

Die vermutete Freisetzung von PTX aus den dPGSamin-PTX-(6)- bzw. dPGamin-PTX-Konjugaten wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographien nachgewiesen (A. Sousa Hervés; ehem. Inst. f. Chemie u. Biochemie, Freie Universität, Berlin) [155]. Die Freisetzung von PTX vom dPGSamin-PTX-(6)-Konjugat findet innerhalb weniger Stunden durch eine Ester-Hydrolyse statt (75 % PTX-Freisetzung nach $t = 3,5$ h in Plasma) [155]. Die

gefundenen Unterschiede in der Freisetzungsgeschwindigkeit zwischen dPGSamin-PTX-(6) und dPGamin-PTX in Abhängigkeit vom pH-Wert werden an anderer Stelle ausführlich diskutiert [155]. Vergleichbare Ester-Verbindungen zur Konjugation von PTX wurden zuvor auch bei anderen makromolekularen Trägern genutzt [118, 191] und stellen eine gebräuchliche Bindungsart in diesem Bereich dar [108]. Im Vergleich zu der durch A. Sousa Hervés nachgewiesenen schnellen Freisetzung von PTX aus dPGSamin-PTX-(6) differiert die Freisetzungsgeschwindigkeit von PTX aus anderen Konjugaten mit Esterbindungen erheblich (vgl. Diskussion [155]).

Interessanterweise wurde am dPGSamin-DXR-(1)-Konjugat histologisch gezeigt, dass sich dieses um, nicht jedoch im Zellkern anreicherte und eine deutlich verminderte Zytotoxizität aufwies. Das Konjugat enthielt jedoch ebenfalls eine Esterbindung zur Konjugation (dPGSamin mit DXR-Succinat [NHS-Ester]; Amidbindung am dPGS; Esterbindung am DXR). Eine Freisetzung scheint aufgrund der histologischen und zytotoxischen Ergebnisse in diesem Konjugat nur verlangsamt oder in geringerem Maße stattgefunden zu haben.

Für die Stabilität der Esterbindung bei dem Poly-L-Glutaminsäure-PTX-Konjugat (CT-2103, *Paclitaxel poliglumex*) sind möglicherweise sterische Effekte verantwortlich, die eine Esterspaltung durch Esterasen verhindern [118]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit neben der Bindungsart auch von anderen Faktoren, wie dem pH-Wert und dem zu untersuchenden Konjugat, abhängig ist [108, 155, 191].

Gleichzeitig sind für die Inkubation von dPGSamin-PTX-(6) auf HUVEC-Zellen, verglichen mit PTX, eine signifikant verminderte Zytotoxizität und eine hohe Differenz der IC₅₀-Werte nachgewiesen worden. Eine dort möglicherweise geringgradige oder verlangsamte Freisetzung des PTX aus dPGSamin-PTX-(6) könnte auf die abweichenden Kulturbedingungen und insbesondere den Anteil und die Art des Serums mit einer differentiellen Esteraseaktivität zurückzuführen sein. Die Freisetzung des zytotoxisch aktiven Wirkstoffes vom Polymer ist deshalb auch für die spezifischen Zellkulturbedingungen einzeln zu evaluieren, um die Freisetzungskinetik mit den Ergebnissen der *In-vitro*-Zytotoxizitätstests korrelieren zu können.

Mit dem Nachweis der unerwartet schnellen Freisetzung von PTX vom dPGSamin-PTX-(6) sind auch die vorgestellten Zytotoxizitätswerte nur mit Einschränkungen interpretierbar, da keine Differenzierung der Wirkung zwischen konjugatgebundenem und frei vorliegendem PTX möglich ist [155]. Zusätzlich sind keine Freisetzungskinetiken für die genutzten spezifischen Kulturbedingungen vorhanden, mit denen Korrelationen erstellt werden könnten.

Chemische Struktur des dPGSamin-PTX-(6)

Neben der Freisetzung ist auch die chemische Struktur des dPGSamin-PTX-(6)-Konjugates zu reflektieren. Die Bindung des PTX an das dPGS-Polymer erfolgte über einen Ester an der Position C-2' der C-13-Seitenkette des PTX [155]. Die Seitenkette und insbesondere die 2'-OH-Gruppe trägt jedoch hauptsächlich zur Bindung von PTX an Tubulin bei und ist für dessen Wirksamkeit essentiell [262]. Diese Konjugation über die C-2'-Position, die auch bei *Paclitaxel poliglumex* genutzt wurde, verhindert eine zytotoxische Wirkung des PTX vor dessen Freisetzung und könnte damit eine vorzeitige systemische Wirkung vermindern [118]. Aufgrund der frühzeitigen Freisetzung des PTX vom dPGSamin-PTX-(6) (Plasma) [155] war dieser pharmakologisch erwünschte Effekt für das hier untersuchte Konjugat nicht zu erwarten. Zusätzlich ist auch ein durch dPGSamin-vermitteltes Drug-Targeting innerhalb der kurzen Zeitspanne der Stabilität vermutlich nicht ausreichend möglich.

Die vorzeitige Freisetzung könnte durch Modifikation der Bindung so verändert werden, dass keine oder eine nur langsame Freisetzung des PTX vom dPGS-Kern stattfinden kann.

Es ist anzunehmen, dass ein stabiles dPGS-PTX-Konjugat, aufgrund des dPGS-Transportes (OATP) [161], ebenfalls zellulär aufgenommen werden kann. Für auch intrazellulär stabile Konjugationen sollte jedoch eine zu der C-2'-Position differente Bindungsstelle gewählt werden. Modifikationen der OH-Gruppe der C-7-Position des PTX-Kernes (zu 7-Acetylpaclitaxel) führten bspw. nur zu einer geringen Verminderung der Aktivität von PTX *in vitro* [271]. Demgegenüber stehen jedoch dazu differente Ergebnisse der Aktivität nach Modifikation der C-7-Position, bspw. mit Phosphaten (keine *In-vitro*-Aktivität) [81]. Die C-7-Position des PTX sollte trotz dieser diskrepanten Ergebnisse als Bindungsort für die Weiterentwicklung des dPGS-PTX-Konjugates evaluiert werden, um Konjugationen an der pharmakologisch wichtigen C-13-Seitenkette zu vermeiden.

Auf den möglichen Einfluss eines auch intrazellulär stabilen Konjugates auf die Elimination wurde bereits eingegangen (Kapitel 4.4.2.).

4.7. Eignet sich dPGS als Drug-Targeting-System?

Das Polymer dPGS weist eine Vielzahl von Eigenschaften auf, die eine Anwendbarkeit als Drug-Targeting-System ermöglichen könnten (Kapitel 1.4.5). Grundsätzlich muss ein Drug-Targeting-System biokompatibel sein [129] und sollte sich im Zielgewebe anreichern können [103].

Diese Arbeit untersuchte die Eignung des dPGS als Drug-Targeting-System in zwei verschiedenen Abschnitten: (1.) der Anwendung von dPGS *in vivo* und (2.) durch die Analyse kovalenter dPGS-Zytostatika-Konjugate *in vitro*.

In vivo wurde gezeigt, dass dPGS keine toxischen Effekte verursacht [195]. Gleichzeitig wurden der Median des relativen Tumolvolumens vermindert (n. s.), die Proliferation im Tumorgewebe signifikant reduziert und eine histologisch nachweisbare Anreicherung von dPGS im tumorumbegleitenden Bindegewebe dargestellt.

Das Polymer dPGS erfüllt durch diese Aspekte pharmakologische Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Anwendung als Drug-Targeting-System *in vivo* und sollte weiter evaluiert werden.

Zusätzliche *In-vivo*-Untersuchungen zur Pharmakokinetik (Verteilung in andere Kompartimente und deren Quantifizierung), Langzeittoxizität und zur Wirksamkeit des dPGS sind jedoch notwendig. Gleichzeitig sind bei der Weiterentwicklung die diskutierten, möglicherweise problematischen Effekte einer subkutanen Injektion von dPGS-Wirkstoff-Konjugaten zu bedenken.

Das Polymer dPGS eignet sich weiterhin zur Konjugation mit Zytostatika [155]. Zur Auswahl und Charakterisierung eines dPGS-Zytostatika-Konjugates wurden *In-vitro*-Untersuchungen durchgeführt. Das evaluierte dPGS-Zytostatika-Konjugat (dPGSamin-PTX-(6)) wies eine im Vergleich zu PTX teilweise signifikant geringere Zytotoxizität bei A431-/A549-Zellen und eine signifikant geringere Zytotoxizität bei nicht-malignen HUVEC-Zellen auf, wobei sich die Faktoren der IC₅₀-Differenzen jedoch deutlich unterschieden. Zusätzlich erfolgte die Zunahme der Fluoreszenz von mit dPGSamin-PTX-(6)-ICC-inkubierten Zellen linear und ohne Sättigung.

Dennoch repräsentierte das untersuchte dPGSamin-PTX-(6) keine geeignete Drug-Targeting-Verbindung, da eine frühzeitige Freisetzung des zytotoxischen Wirkstoffanteils (PTX) vom potentiellen Drug-Targeting-Anteil (dPGSamin) im Rahmen dieser Arbeit vermutet und diese Freisetzung letztlich auch bestätigt wurde [155]. Durch die frühzeitige Freisetzung, vor allem im Plasma [155], war ein verbessertes pharmakologisches Profil hinsichtlich der selektiven Anreicherung von PTX um Tumoren und einer verminderten systemischen Toxizität für dieses Konjugat nicht zu erwarten.

Die Verbindung zwischen Wirkstoff und dPGS ist deshalb zu modifizieren und für jedes neue Konjugat hinsichtlich der Wirkstofffreisetzung zu evaluieren [155]. Dabei müssen zytosolisch

aktive Wirkstoffe von nukleär aktiven Wirkstoffen unterschieden und das Aufnahmeverhalten (Geschwindigkeit, nukleäre Aufnahme) in das neue Konzept einbezogen werden.

Die nicht wirksamen dPGS-Zytostatika-Konjugate sollten strukturiert untersucht und die benannten Hypothesen zur fehlenden Wirksamkeit überprüft werden (fehlende Aufnahme, Strukturveränderung). Eine Weiterentwicklung von dPGS-CAB-Konjugaten sollte jedoch nicht weiter verfolgt werden. Die Erhöhung des zytotoxisch aktiven Wirkstoffanteils könnte die Wirksamkeit verbessern, wobei jedoch der Erhalt der Löslichkeit und dPGS-spezifischer Eigenschaften für ein mögliches Drug-Targeting essentiell ist (Bindungsverhalten, zelluläre Aufnahme).

Um eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten zu können, sollten zukünftig definierte Molekulargewichte untersucht und keine polydispersen Polymere mehr genutzt werden. Neue Fluorochrom-Konjugate sind so zu synthetisieren, dass deren Fluoreszenz quantitativ zwischen den verschiedenen Konjugaten vergleichbar ist.

Insgesamt könnte das dendritische Polyglycerolsulfat ein potentiell Drug-Targeting-System zur Anwendung in der Tumorchemotherapie darstellen. Die methodischen Diskussionen und die Resultate aus der Anwendung von dPGS *in vivo* sowie der Analyse von dPGS-Zytostatika-Konjugaten *in vitro* stellen die Grundlage zur Weiterentwicklung und -evaluierung von dPGS als potentiell Drug-Targeting-System dar.

V. Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Lazebnik, Y., *What are the hallmarks of cancer?* Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 232-3.
4. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
5. Fearon, E.R., S.R. Hamilton, and B. Vogelstein, *Clonal analysis of human colorectal tumors*. Science, 1987. **238**(4824): p. 193-7.
6. Wagener, C. and O. Müller, *Ursachen der Tumorentstehung*, in *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen*, C. Wagener and O. Müller, Editors. 2010, Thieme: Stuttgart [u.a.]. p. 61-76.
7. Wagener, C. and O. Müller, *Mechanismen der Tumorentstehung*, in *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen*, C. Wagener and O. Müller, Editors. 2010, Thieme: Stuttgart [u.a.]. p. 77-133.
8. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 502-11.
9. Wagener, C. and O. Müller, *Mechanismen der malignen Progression*, in *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen*, C. Wagener and O. Müller, Editors. 2010, Thieme: Stuttgart [u.a.]. p. 325-389.
10. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
11. Toribara, N.W. and M.H. Sleisenger, *Screening for colorectal cancer*. N Engl J Med, 1995. **332**(13): p. 861-7.
12. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
13. Podsypanina, K., Y.C. Du, M. Jechlinger, L.J. Beverly, D. Hambarzumyan, and H. Varmus, *Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1841-4.
14. Ansieau, S., J. Bastid, A. Doreau, A.P. Morel, B.P. Bouchet, C. Thomas, F. Fauvet, I. Puisieux, C. Doglioni, S. Piccinin, R. Maestro, T. Voeltzel, A. Selmi, S. Valsesia-Wittmann, C. Caron de Fromental, and A. Puisieux, *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence*. Cancer Cell, 2008. **14**(1): p. 79-89.
15. Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, A. Daskalakis, M. Granzow, A. Ahr, T.J. Blankenstein, M. Kaufmann, J. Diebold, H. Arnholdt, P. Muller, J. Bischoff, D. Harich, G. Schlimok, G. Riethmuller, R. Eils, and C.A. Klein, *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
16. Klein, C.A., *Cancer. The metastasis cascade*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1785-7.
17. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
18. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
19. Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl, *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9339-44.
20. Adams, J.M. and A. Strasser, *Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones?* Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4018-21.
21. O'Brien, C.A., A. Pollett, S. Gallinger, and J.E. Dick, *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
22. Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, E. Pillozzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle, and R. De Maria, *Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 504-14.
23. Shi, M.F., J. Jiao, W.G. Lu, F. Ye, D. Ma, Q.G. Dong, and X. Xie, *Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(22): p. 3915-25.
24. Zhang, S., C. Balch, M.W. Chan, H.C. Lai, D. Matei, J.M. Schilder, P.S. Yan, T.H. Huang, and K.P. Nephew, *Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4311-20.
25. Kelly, P.N., A. Dakic, J.M. Adams, S.L. Nutt, and A. Strasser, *Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells*. Science, 2007. **317**(5836): p. 337.
26. Yoo, M.H. and D.L. Hatfield, *The cancer stem cell theory: is it correct?* Mol Cells, 2008. **26**(5): p. 514-6.

27. Shackleton, M., E. Quintana, E.R. Fearon, and S.J. Morrison, *Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution*. Cell, 2009. **138**(5): p. 822-9.
28. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
29. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. J Pathol, 2002. **196**(3): p. 254-65.
30. Lin, E.Y., J.F. Li, G. Bricard, W. Wang, Y. Deng, R. Sellers, S.A. Porcelli, and J.W. Pollard, *Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages*. Mol Oncol, 2007. **1**(3): p. 288-302.
31. Lin, E.Y., J.F. Li, L. Gnatovskiy, Y. Deng, L. Zhu, D.A. Grzesik, H. Qian, X.N. Xue, and J.W. Pollard, *Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11238-46.
32. Goswami, S., E. Sahai, J.B. Wyckoff, M. Cammer, D. Cox, F.J. Pixley, E.R. Stanley, J.E. Segall, and J.S. Condeelis, *Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5278-83.
33. Wyckoff, J., W. Wang, E.Y. Lin, Y. Wang, F. Pixley, E.R. Stanley, T. Graf, J.W. Pollard, J. Segall, and J. Condeelis, *A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7022-9.
34. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
35. Pikarsky, E., R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, and Y. Ben-Neriah, *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*. Nature, 2004. **431**(7007): p. 461-6.
36. Kumar, M., D.F. Allison, N.N. Baranova, J.J. Wamsley, A.J. Katz, S. Bekiranov, D.R. Jones, and M.W. Mayo, *NF-kappaB regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68597.
37. Li, J., G.K. Lau, L. Chen, S.S. Dong, H.Y. Lan, X.R. Huang, Y. Li, J.M. Luk, Y.F. Yuan, and X.Y. Guan, *Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21816.
38. Liu, F., K. Bardhan, D. Yang, M. Thangaraju, V. Ganapathy, J.L. Waller, G.B. Liles, J.R. Lee, and K. Liu, *NF-kappaB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression*. J Biol Chem, 2012. **287**(30): p. 25530-40.
39. Weitz, J., H.E. Vogelsang, and J.R. Siewert, *Prinzipien der onkologischen Chirurgie*, in *Praxis der Viszeralchirurgie Onkologische Chirurgie*, J.R. Siewert, M. Rothmund, and V. Schumpelick, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 213-223.
40. Kimmig, B.N., *Strahlentherapie*, in *Onkologische Therapie: Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren ; mit diagnostischen Hinweisen ; mit 145 Tabellen*, H.D. Bruhn, et al., Editors. 2004, Schattauer: Stuttgart [u.a.]. p. 141-159.
41. Sack, H., *Strahlentherapie - Allgemeine Prinzipien*, in *Therapiekonzepte Onkologie*, S. Seeber and J. Schütte, Editors. 2007, Springer: Heidelberg. p. 196-205.
42. Thiel, E., *Allgemeine Prinzipien der Pharmakotherapie neoplastischer Erkrankungen*, in *Klinische Pharmakologie*, M. Wehling and M.B.u.M.v.D. H.-C., Editors. 2011, Thieme: Stuttgart [u. a.]. p. 356-359.
43. Makkouk, A. and G.J. Weiner, *Cancer Immunotherapy and Breaking Immune Tolerance: New Approaches to an Old Challenge*. Cancer Res, 2015. **75**(1): p. 5-10.
44. Wani, M.C., H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, and A.T. McPhail, *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 1971. **93**(9): p. 2325-7.
45. Ojima, I., I. Habus, M. Zhao, M. Zucco, Y.H. Park, C.M. Sun, and T. Brigaud, *New and efficient approaches to the semisynthesis of taxol and its C-13 side chain analogs by means of beta-lactam synthon method*. Tetrahedron, 1992. **48**(34): p. 6985-7012.
46. Nicolaou, K.C., Z. Yang, J.J. Liu, H. Ueno, P.G. Nantermet, R.K. Guy, C.F. Claiborne, J. Renaud, E.A. Couladouros, K. Paulvannan, and et al., *Total synthesis of taxol*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 630-4.
47. Ndungu, J.M., Y.J. Lu, S. Zhu, C. Yang, X. Wang, G. Chen, D.M. Shin, J.P. Snyder, M. Shoji, and A. Sun, *Targeted delivery of paclitaxel to tumor cells: synthesis and in vitro evaluation*. J Med Chem, 2010. **53**(8): p. 3127-32.
48. van de Steeg, E., A. van Esch, E. Wagenaar, C.M. van der Kruijssen, O. van Tellingen, K.E. Kenworthy, and A.H. Schinkel, *High impact of Oatp1a/1b transporters on in vivo disposition of the hydrophobic anticancer drug paclitaxel*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(2): p. 294-301.

49. Smith, N.F., M.R. Acharya, N. Desai, W.D. Figg, and A. Sparreboom, *Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(8): p. 815-8.
50. Svoboda, M., K. Wlcek, B. Taferner, S. Hering, B. Stieger, D. Tong, R. Zeillinger, T. Thalhammer, and W. Jager, *Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 in ovarian cancer cells: relevance for paclitaxel transport*. *Biomed Pharmacother*, 2011. **65**(6): p. 417-26.
51. Eiseman, J.L., N.D. Eddington, J. Leslie, C. MacAuley, D.L. Sentz, M. Zuhowski, J.M. Kujawa, D. Young, and M.J. Egorin, *Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994. **34**(6): p. 465-71.
52. Walle, U.K. and T. Walle, *Taxol transport by human intestinal epithelial Caco-2 cells*. *Drug Metab Dispos*, 1998. **26**(4): p. 343-6.
53. Desai, A. and T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997. **13**: p. 83-117.
54. Rao, S., N.E. Krauss, J.M. Heering, C.S. Swindell, I. Ringel, G.A. Orr, and S.B. Horwitz, *3'-(p-azidobenzamido)taxol photolabels the N-terminal 31 amino acids of beta-tubulin*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(5): p. 3132-4.
55. Rao, S., G.A. Orr, A.G. Chaudhary, D.G. Kingston, and S.B. Horwitz, *Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-Azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(35): p. 20235-8.
56. Loeb, C., C. Combeau, L. Ehret-Sabatier, A. Breton-Gilet, D. Faucher, B. Rousseau, A. Commercon, and M. Goeldner, *[3H](azidophenyl)ureido taxoid photolabels peptide amino acids 281-304 of alpha-tubulin*. *Biochemistry*, 1997. **36**(13): p. 3820-5.
57. Schiff, P.B., J. Fant, and S.B. Horwitz, *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*. *Nature*, 1979. **277**(5698): p. 665-7.
58. Schiff, P.B. and S.B. Horwitz, *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(3): p. 1561-5.
59. Jordan, M.A., R.J. Toso, D. Thrower, and L. Wilson, *Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(20): p. 9552-6.
60. Giannakakou, P., R. Robey, T. Fojo, and M.V. Blagosklonny, *Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity*. *Oncogene*, 2001. **20**(29): p. 3806-13.
61. Abu-Khalaf, M.M. and L.N. Harris, *Antimicrotubule Agents*, in *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*, V.T. DeVita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg, Editors. 2011, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA USA. p. 413-421.
62. Tew, K.D., *Alkylating Agents*, in *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*, V.T. DeVita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg, Editors. 2011, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA USA. p. 375-385.
63. Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, *Leukeran®*, 2012.
64. Lee, F.Y., P. Coe, and P. Workman, *Pharmacokinetic basis for the comparative antitumor activity and toxicity of chlorambucil, phenylacetic acid mustard and beta, beta-difluorochlorambucil (CB 7103) in mice*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1986. **17**(1): p. 21-9.
65. Terasawa, T., N.A. Trikalinos, B. Djulbegovic, and T.A. Trikalinos, *Comparative efficacy of first-line therapies for advanced-stage chronic lymphocytic leukemia: a multiple-treatment meta-analysis*. *Cancer Treat Rev*, 2013. **39**(4): p. 340-9.
66. Panasci, L., J.P. Paiement, G. Christodoulopoulos, A. Belenkov, A. Malapetsa, and R. Aloyz, *Chlorambucil drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: the emerging role of DNA repair*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(3): p. 454-61.
67. Koler, R.D. and A.L. Forsgren, *Hepatotoxicity due to chlorambucil; report of a case*. *J Am Med Assoc*, 1958. **167**(3): p. 316-7.
68. Cole, S.R., T.J. Myers, and A.U. Klatsky, *Pulmonary disease with chlorambucil therapy*. *Cancer*, 1978. **41**(2): p. 455-9.
69. Saif, W.M. and E. Chu, *Antimetabolites*, in *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*, V.T. DeVita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg, Editors. 2011, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA USA. p. 393-401.
70. Arcamone, F., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, and C. Spalla, *Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius*. *Biotechnol Bioeng*, 1969. **11**(6): p. 1101-10.

71. Rasheed, Z.A. and E.H. Rubin, *Topoisomerase-Interacting Agents*, in DeVita, Hellman, and Rosenberg's *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, V.T. DeVita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg, Editors. 2011, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA USA. p. 402-412.
72. Tewey, K.M., T.C. Rowe, L. Yang, B.D. Halligan, and L.F. Liu, *Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II*. *Science*, 1984. **226**(4673): p. 466-8.
73. Goodman, J. and P. Hochstein, *Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977. **77**(2): p. 797-803.
74. Doroshow, J.H. and K.J. Davies, *Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(7): p. 3068-74.
75. Lefrak, E.A., J. Pitha, S. Rosenheim, and J.A. Gottlieb, *A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity*. *Cancer*, 1973. **32**(2): p. 302-14.
76. Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer, *Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials*. *Cancer*, 2003. **97**(11): p. 2869-79.
77. Singla, A.K., A. Garg, and D. Aggarwal, *Paclitaxel and its formulations*. *Int J Pharm*, 2002. **235**(1-2): p. 179-92.
78. Tarr, B.D. and S.H. Yalkowsky, *A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs*. *J Parenter Sci Technol*, 1987. **41**(1): p. 31-3.
79. Rowinsky, E.K., L.A. Cazenave, and R.C. Donehower, *Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent*. *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(15): p. 1247-59.
80. Rodriguez-Antona, C., *Pharmacogenomics of paclitaxel*. *Pharmacogenomics*, 2010. **11**(5): p. 621-3.
81. Vyas, D.M., H. Wong, A.R. Crosswell, a.M. Casazza, J.O. Knipe, S.W. Mamber, and T.W. Doyle, *Synthesis and antitumor evaluation of water soluble taxol phosphates*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1993. **3**(6): p. 1357-1360.
82. Wiernik, P.H., E.L. Schwartz, J.J. Strauman, J.P. Dutcher, R.B. Lipton, and E. Paietta, *Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol*. *Cancer Res*, 1987. **47**(9): p. 2486-93.
83. Kris, M.G., J.P. O'Connell, R.J. Gralla, M.S. Wertheim, R.M. Parente, P.B. Schiff, and C.W. Young, *Phase I trial of taxol given as a 3-hour infusion every 21 days*. *Cancer Treat Rep*, 1986. **70**(5): p. 605-7.
84. Wiernik, P.H., E.L. Schwartz, A. Einzig, J.J. Strauman, R.B. Lipton, and J.P. Dutcher, *Phase I trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 1987. **5**(8): p. 1232-9.
85. Szebeni, J., F.M. Muggia, and C.R. Alving, *Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(4): p. 300-6.
86. Gelderblom, H., K. Mross, A.J. ten Tije, D. Behringer, S. Mielke, D.M. van Zomeren, J. Verweij, and A. Sparreboom, *Comparative pharmacokinetics of unbound paclitaxel during 1- and 3-hour infusions*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(2): p. 574-81.
87. O'Connor, T.L. and E. Kossoff, *Delayed seizure associated with paclitaxel-Cremophor el in a patient with early-stage breast cancer*. *Pharmacotherapy*, 2009. **29**(8): p. 993-6.
88. De Giorgi, U., G. Rosti, M. Monti, G.L. Frassinetti, and M. Marangolo, *Onycholysis secondary to multiple paclitaxel 1-hour infusions: possible role for its vehicle (Cremophor EL)*. *Ann Oncol*, 2003. **14**(10): p. 1588-9.
89. Stordal, B., M. Hamon, V. McEneaney, S. Roche, J.P. Gillet, J.J. O'Leary, M. Gottesman, and M. Clynes, *Resistance to paclitaxel in a cisplatin-resistant ovarian cancer cell line is mediated by P-glycoprotein*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40717.
90. Wang, Y., Q. Chen, S. Jin, W. Deng, S. Li, Q. Tong, and Y. Chen, *Up-regulation of P-glycoprotein is involved in the increased paclitaxel resistance in human esophageal cancer radioresistant cells*. *Scand J Gastroenterol*, 2012. **47**(7): p. 802-8.
91. Takano, M., Y. Otani, M. Tanda, M. Kawami, J. Nagai, and R. Yumoto, *Paclitaxel-resistance conferred by altered expression of efflux and influx transporters for paclitaxel in the human hepatoma cell line, HepG2*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2009. **24**(5): p. 418-27.
92. Ding, P.R., A.K. Tiwari, S. Ohnuma, J.W. Lee, X. An, C.L. Dai, Q.S. Lu, S. Singh, D.H. Yang, T.T. Talele, S.V. Ambudkar, and Z.S. Chen, *The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil is a potent inhibitor of ABCB1/P-glycoprotein transporter*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19329.
93. Duan, Z., K.A. Brakora, and M.V. Seiden, *Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(7): p. 833-8.
94. Ren, F., R. Chen, Y. Wang, Y. Sun, Y. Jiang, and G. Li, *Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer*. *Pharm Res*, 2011. **28**(4): p. 897-906.

95. Zhan, Z., S. Scala, A. Monks, C. Hose, S. Bates, and T. Fojo, *Resistance to paclitaxel mediated by P-glycoprotein can be modulated by changes in the schedule of administration*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1997. **40**(3): p. 245-50.
96. Rice, A., Y. Liu, M.L. Michaelis, R.H. Himes, G.I. Georg, and K.L. Audus, *Chemical modification of paclitaxel (Taxol) reduces P-glycoprotein interactions and increases permeation across the blood-brain barrier in vitro and in situ*. *J Med Chem*, 2005. **48**(3): p. 832-8.
97. Penson, R.T., E. Oliva, S.J. Skates, T. Glyptis, A.F. Fuller, Jr., A. Goodman, and M.V. Seiden, *Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples*. *Gynecol Oncol*, 2004. **93**(1): p. 98-106.
98. Huisman, M.T., A.A. Chhatta, O. van Tellingen, J.H. Beijnen, and A.H. Schinkel, *MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(5): p. 824-9.
99. Giannakakou, P., D.L. Sackett, Y.K. Kang, Z. Zhan, J.T. Buters, T. Fojo, and M.S. Poruchynsky, *Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(27): p. 17118-25.
100. Monzo, M., R. Rosell, J.J. Sanchez, J.S. Lee, A. O'Brate, J.L. Gonzalez-Larriba, V. Alberola, J.C. Lorenzo, L. Nunez, J.Y. Ro, and C. Martin, *Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(6): p. 1786-93.
101. Han, E.K., L. Gehrke, S.K. Tahir, R.B. Credo, S.P. Cherian, H. Sham, S.H. Rosenberg, and S. Ng, *Modulation of drug resistance by alpha-tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines*. *Eur J Cancer*, 2000. **36**(12): p. 1565-71.
102. Bae, Y.H. and K. Park, *Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility*. *J Control Release*, 2011. **153**(3): p. 198-205.
103. Torchilin, V.P., *Drug targeting*. *Eur J Pharm Sci*, 2000. **11 Suppl 2**: p. S81-91.
104. Agarwal, A., A. Asthana, U. Gupta, and N.K. Jain, *Tumour and dendrimers: a review on drug delivery aspects*. *J Pharm Pharmacol*, 2008. **60**(6): p. 671-88.
105. Bousif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr, *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
106. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. *Cancer Res*, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
107. Ringsdorf, H., *Structure and properties of pharmacologically active polymers*. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, 1975. **51**(1): p. 135-153.
108. Brocchini, S. and R. Duncan, *Pendent drugs, release from polymers*, in *Encyclopedia of controlled drug delivery*, E. Mathiowitz, Editor. 1999, John Wiley and Sons: New York. p. 786-816.
109. Benseler, G.E. and A. Kaegi, *Benselers griechisch-deutsches Wörterbuch : mit einem alphabetischen Verzeichnis zur Bestimmung seltener und unregelmäßiger Verbformen*. *Griechisch-deutsches Wörterbuch*, in *Griechisch-deutsches Wörterbuch* 1985, VEB Verlag Enzyklopädie Leipzig: Leipzig. p. S. 165.
110. Haag, R. and F. Kratz, *Polymer therapeutics: concepts and applications*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. **45**(8): p. 1198-215.
111. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009. **71**(3): p. 409-19.
112. Larson, N. and H. Ghandehari, *Polymeric conjugates for drug delivery*. *Chem Mater*, 2012. **24**(5): p. 840-853.
113. Socinski, M.A., I. Bondarenko, N.A. Karaseva, A.M. Makhson, I. Vynnychenko, I. Okamoto, J.K. Hon, V. Hirsh, P. Bhar, H. Zhang, J.L. Iglesias, and M.F. Renschler, *Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(17): p. 2055-62.
114. Schwartzberg, L.S., F.P. Arena, D.M. Mintzer, A.L. Epperson, and M.S. Walker, *Phase II multicenter trial of albumin-bound paclitaxel and capecitabine in first-line treatment of patients with metastatic breast cancer*. *Clin Breast Cancer*, 2012. **12**(2): p. 87-93.
115. Nyman, D.W., K.J. Campbell, E. Hersh, K. Long, K. Richardson, V. Trieu, N. Desai, M.J. Hawkins, and D.D. Von Hoff, *Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(31): p. 7785-93.
116. Gradishar, W.J., S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins, and J. O'Shaughnessy, *Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(31): p. 7794-803.

117. Desai, N., V. Trieu, Z. Yao, L. Louie, S. Ci, A. Yang, C. Tao, T. De, B. Beals, D. Dykes, P. Noker, R. Yao, E. Labao, M. Hawkins, and P. Soon-Shiong, *Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(4): p. 1317-24.
118. Singer, J.W., B. Baker, P. De Vries, A. Kumar, S. Shaffer, E. Vawter, M. Bolton, and P. Garzone, *Poly-(L)-glutamic acid-paclitaxel (CT-2103) [XYOTAX], a biodegradable polymeric drug conjugate: characterization, preclinical pharmacology, and preliminary clinical data*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **519**: p. 81-99.
119. Langer, C.J., K.J. O'Byrne, M.A. Socinski, S.M. Mikhailov, K. Lesniewski-Kmak, M. Smakal, T.E. Ciuleanu, S.V. Orlov, M. Dediu, D. Heigener, A.J. Eisenfeld, L. Sandalic, F.B. Oldham, J.W. Singer, and H.J. Ross, *Phase III trial comparing paclitaxel poliglumex (CT-2103, PPX) in combination with carboplatin versus standard paclitaxel and carboplatin in the treatment of PS 2 patients with chemotherapy-naïve advanced non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2008. **3**(6): p. 623-30.
120. Park, K., G.Y. Lee, Y.S. Kim, M. Yu, R.W. Park, I.S. Kim, S.Y. Kim, and Y. Byun, *Heparin-deoxycholic acid chemical conjugate as an anticancer drug carrier and its antitumor activity*. *J Control Release*, 2006. **114**(3): p. 300-6.
121. Cho, K.J., H.T. Moon, G.E. Park, O.C. Jeon, Y. Byun, and Y.K. Lee, *Preparation of sodium deoxycholate (DOC) conjugated heparin derivatives for inhibition of angiogenesis and cancer cell growth*. *Bioconjug Chem*, 2008. **19**(7): p. 1346-51.
122. Wang, Y., D. Xin, K. Liu, M. Zhu, and J. Xiang, *Heparin-paclitaxel conjugates as drug delivery system: synthesis, self-assembly property, drug release, and antitumor activity*. *Bioconjug Chem*, 2009. **20**(12): p. 2214-21.
123. Torchilin, V.P., *Multifunctional nanocarriers*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. **58**(14): p. 1532-55.
124. Stathopoulos, G.P., D. Antoniou, J. Dimitroulis, P. Michalopoulou, A. Bastas, K. Marosis, J. Stathopoulos, A. Provata, P. Yiamboudakis, D. Veldekis, N. Lolis, N. Georgatou, M. Toubis, C. Pappas, and G. Tsoukalas, *Liposomal cisplatin combined with paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in non-small-cell lung cancer: a randomized phase III multicenter trial*. *Ann Oncol*, 2010. **21**(11): p. 2227-32.
125. van der Meel, R., S. Oliveira, I. Altintas, R. Haselberg, J. van der Veecken, R.C. Roovers, P.M. van Bergen en Henegouwen, G. Storm, W.E. Hennink, R.M. Schiffelers, and R.J. Kok, *Tumor-targeted Nanobullets: Anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment*. *J Control Release*, 2012. **159**(2): p. 281-9.
126. Barenholz, Y., *Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*. *J Control Release*, 2012. **160**(2): p. 117-34.
127. O'Brien, M.E., N. Wigler, M. Inbar, R. Rosso, E. Grischke, A. Santoro, R. Catane, D.G. Kieback, P. Tomczak, S.P. Ackland, F. Orlandi, L. Mellars, L. Alland, C. Tendler, and C.B.C.S. Group, *Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer*. *Ann Oncol*, 2004. **15**(3): p. 440-9.
128. Klibanov, A.L., K. Maruyama, V.P. Torchilin, and L. Huang, *Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes*. *FEBS Lett*, 1990. **268**(1): p. 235-7.
129. Greish, K., J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu, and H. Maeda, *Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting*. *Clin Pharmacokinet*, 2003. **42**(13): p. 1089-105.
130. Endrich, B., H.S. Reinhold, J.F. Gross, and M. Intaglietta, *Tissue perfusion inhomogeneity during early tumor growth in rats*. *J Natl Cancer Inst*, 1979. **62**(2): p. 387-95.
131. Less, J.R., T.C. Skalak, E.M. Sevick, and R.K. Jain, *Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions*. *Cancer Res*, 1991. **51**(1): p. 265-73.
132. Awwad, H.K., M. el Naggar, N. Mocktar, and M. Barsoum, *Inter-capillary distance measurement as an indicator of hypoxia in carcinoma of the cervix uteri*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1986. **12**(8): p. 1329-33.
133. Boucher, Y., J.M. Kirkwood, D. Opacic, M. Desantis, and R.K. Jain, *Interstitial hypertension in superficial metastatic melanomas in humans*. *Cancer Res*, 1991. **51**(24): p. 6691-4.
134. Less, J.R., M.C. Posner, Y. Boucher, D. Borochovit, N. Wolmark, and R.K. Jain, *Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors*. *Cancer Res*, 1992. **52**(22): p. 6371-4.
135. Gutmann, R., M. Leunig, J. Feyh, A.E. Goetz, K. Messmer, E. Kastenbauer, and R.K. Jain, *Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size*. *Cancer Res*, 1992. **52**(7): p. 1993-5.
136. Boucher, Y., L.T. Baxter, and R.K. Jain, *Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy*. *Cancer Res*, 1990. **50**(15): p. 4478-84.
137. Kuh, H.J., S.H. Jang, M.G. Wientjes, J.R. Weaver, and J.L. Au, *Determinants of paclitaxel penetration and accumulation in human solid tumor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **290**(2): p. 871-80.

138. Lee, H., H. Fonge, B. Hoang, R.M. Reilly, and C. Allen, *The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles*. Mol Pharm, 2010. **7**(4): p. 1195-208.
139. Lee, H., B. Hoang, H. Fonge, R.M. Reilly, and C. Allen, *In vivo distribution of polymeric nanoparticles at the whole-body, tumor, and cellular levels*. Pharm Res, 2010. **27**(11): p. 2343-55.
140. Schadlich, A., H. Caysa, T. Mueller, F. Tenambergen, C. Rose, A. Gopferich, J. Kuntsche, and K. Mader, *Tumor accumulation of NIR fluorescent PEG-PLA nanoparticles: impact of particle size and human xenograft tumor model*. ACS Nano, 2011. **5**(11): p. 8710-20.
141. Bae, Y.H., *Drug targeting and tumor heterogeneity*. J Control Release, 2009. **133**(1): p. 2-3.
142. Bernhard, G., J. Dervede, S. Enders, R. Haag, R. Tauber, H. Türk, and H. Weinhart, *Dendritische Polyglycerolsulfate und -sulfonate und deren Verwendung bei entzündlichen Erkrankungen*, D.P.-u. Markenamt, Editor 2008: Bundesrepublik Deutschland.
143. Türk, H., R. Haag, and S. Alban, *Dendritic polyglycerol sulfates as new heparin analogues and potent inhibitors of the complement system*. Bioconjug Chem, 2004. **15**(1): p. 162-7.
144. Khandare, J., A. Mohr, M. Calderon, P. Welker, K. Licha, and R. Haag, *Structure-biocompatibility relationship of dendritic polyglycerol derivatives*. Biomaterials, 2010. **31**(15): p. 4268-77.
145. Weinhart, M., D. Groger, S. Enders, J. Dervede, and R. Haag, *Synthesis of dendritic polyglycerol anions and their efficiency toward L-selectin inhibition*. Biomacromolecules, 2011. **12**(7): p. 2502-11.
146. Calderon, M., M.A. Qadir, S.K. Sharma, and R. Haag, *Dendritic polyglycerols for biomedical applications*. Adv Mater, 2010. **22**(2): p. 190-218.
147. Khandare, J., M. Calderon, N.M. Dagia, and R. Haag, *Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(7): p. 2824-48.
148. Dervede, J., A. Rausch, M. Weinhart, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zugel, A. von Bonin, and R. Haag, *Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 19679-84.
149. Sunder, A., R. Hanselmann, H. Frey, and R. Mülhaupt, *Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization*. Macromolecules, 1999. **32**(13): p. 4240-4246.
150. Weinhart, M., D. Groger, S. Enders, S.B. Riese, J. Dervede, R.K. Kainthan, D.E. Brooks, and R. Haag, *The role of dimension in multivalent binding events: structure-activity relationship of dendritic polyglycerol sulfate binding to L-selectin in correlation with size and surface charge density*. Macromol Biosci, 2011. **11**(8): p. 1088-98.
151. Paulus, F., R. Schulze, D. Steinhilber, M. Zieringer, I. Steinke, P. Welker, K. Licha, S. Wedepohl, J. Dervede, and R. Haag, *The effect of polyglycerol sulfate branching on inflammatory processes*. Macromol Biosci, 2014. **14**(5): p. 643-54.
152. Licha, K., P. Welker, M. Weinhart, N. Wegner, S. Kern, S. Reichert, I. Gemeinhardt, C. Weissbach, B. Ebert, R. Haag, and M. Schirner, *Fluorescence imaging with multifunctional polyglycerol sulfates: novel polymeric near-IR probes targeting inflammation*. Bioconjug Chem, 2011. **22**(12): p. 2453-60.
153. Gröger, D., F. Paulus, K. Licha, P. Welker, M. Weinhart, C. Holzhausen, L. Mundhenk, U. Abram, A.D. Gruber, and R. Haag, *Synthesis and Biological Evaluation of Radio and Dye Labeled Amino Functionalized Dendritic Polyglycerol Sulfates as Multivalent Antiinflammatory Compounds*. Bioconjug Chem, 2013.
154. Biffi, S., S. Dal Monego, C. Dullin, C. Garrovo, B. Bosnjak, K. Licha, P. Welker, M.M. Epstein, and F. Alves, *Dendritic polyglycerolsulfate near infrared fluorescent (NIRF) dye conjugate for non-invasively monitoring of inflammation in an allergic asthma mouse model*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e57150.
155. Sousa-Herves, A., P. Wurfel, N. Wegner, J. Khandare, K. Licha, R. Haag, P. Welker, and M. Calderon, *Dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery: pitfalls of ester linkage*. Nanoscale, 2015. **7**(9): p. 3923-32.
156. Bauer, K.D. and J.W. Jacobberger, *Analysis of intracellular Proteins: II. Application*, in *Flow Cytometry Second Edition Part A*, Z. Darzynkiewicz, P.J. Robinson, and H.A. Crissman, Editors. 1994, Academic Press, Inc.: San Diego, California, London. p. 356-359.
157. Dervede, J., Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Zentralinstitut f. Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, , *unveröffentlichte Daten*.
158. Licha, K., M. Schirner, P. Welker, R. Haag, M. Weinhart, and F. Paulus, *Polyanionic multivalent macromolecules for intracellular targeting of proliferation and protein synthesis*, 2012, Patent: WO 2011095311 A1.
159. Welker, P., mivenion GmbH, Berlin, *unveröffentlichte Daten*.
160. Holzhausen, C., D. Groger, L. Mundhenk, P. Welker, R. Haag, and A.D. Gruber, *Tissue and cellular localization of nanoparticles using (35)S labeling and light microscopic autoradiography*. Nanomedicine, 2013. **9**(4): p. 465-8.

161. Welker, P., K. Licha, D. Mangoldt, M. Grube, M. Keiser, H.K. Kroemer, J. Dervedde, I. Gemeinhardt, J. Schnorr, L. Nögel, R. Haag, and M. Schirner, *Cellular uptake of sulfated polymers via organic anion transporters and scavenger receptors*, in *Manuskript in Vorbereitung*.
162. Hagenbuch, B. and B. Stieger, *The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 396-412.
163. Abe, T., M. Unno, T. Onogawa, T. Tokui, T.N. Kondo, R. Nakagomi, H. Adachi, K. Fujiwara, M. Okabe, T. Suzuki, K. Nunoki, E. Sato, M. Kakyo, T. Nishio, J. Sugita, N. Asano, M. Tanemoto, M. Seki, F. Date, K. Ono, Y. Kondo, K. Shiiba, M. Suzuki, H. Ohtani, T. Shimosegawa, K. Iinuma, H. Nagura, S. Ito, and S. Matsuno, *LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1689-99.
164. Ballesterio, M.R., M.J. Monte, O. Briz, F. Jimenez, F. Gonzalez-San Martin, and J.J. Marin, *Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polypos*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(6): p. 729-38.
165. Monks, N.R., S. Liu, Y. Xu, H. Yu, A.S. Bendelow, and J.A. Moscow, *Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 587-98.
166. Wlcek, K., M. Svoboda, T. Thalhammer, F. Sellner, G. Krupitza, and W. Jaeger, *Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(9): p. 1450-5.
167. Nehls, M., K. Luno, M. Schorpp, S. Krause, U. Matysiak-Scholze, C.M. Prokop, H.J. Hedrich, and T. Boehm, *A yeast artificial chromosome contig on mouse chromosome 11 encompassing the nu locus*. Eur J Immunol, 1994. **24**(7): p. 1721-3.
168. Takahashi, Y., A. Shimizu, T. Sakai, Y. Endo, N. Osawa, H. Shisa, and T. Honjo, *Mapping of the nu gene using congenic nude strains and in situ hybridization*. J Exp Med, 1992. **175**(3): p. 873-6.
169. Corbeaux, T., I. Hess, J.B. Swann, B. Kanzler, A. Haas-Assenbaum, and T. Boehm, *Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(38): p. 16613-8.
170. Nowell, C.S., N. Bredenkamp, S. Tetelin, X. Jin, C. Tischner, H. Vaidya, J.M. Sheridan, F.H. Stenhouse, R. Heussen, A.J. Smith, and C.C. Blackburn, *Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence*. PLoS Genet, 2011. **7**(11): p. e1002348.
171. Mori, K., M. Itoi, N. Tsukamoto, and T. Amagai, *Foxn1 is essential for vascularization of the murine thymus anlage*. Cell Immunol, 2010. **260**(2): p. 66-9.
172. Pantelouris, E.M., *Absence of thymus in a mouse mutant*. Nature, 1968. **217**(5126): p. 370-1.
173. Sprent, J., *Migration and Lifespan of Circulating B Lymphocytes of Nude (nu/nu) Mice*, in *Proceedings of The First International Workshop on Nude Mice*, J. Rygaard, Editor. 1974, Gustav Fischer Verlag: Stuttgart. p. 11-22.
174. Lev, R. and S.S. Spicer, *Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at Low Ph*. J Histochem Cytochem, 1964. **12**: p. 309.
175. Aesch, E., S. Büchl-Zimmermann, A. Burmester, S. Dänhardt-Pfeiffer, C. Desel, C. Hamers, G. Jach, M. Kässens, J. Makovitzky, M. Mulisch, B. Nixdorf-Bergweiler, D. Pütz, B. Riedelsheimer, F. Boom, R. Wegerhoff, and U. Welsch, *Anhang 1 Tabellen*, in *Romeis Mikroskopische Technik*, M. Mulisch and U. Welsch, Editors. 2010, Spektrum: Heidelberg. p. 501-518.
176. Giard, D.J., S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, and W.P. Parks, *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
177. Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, and G. Todaro, *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. Int J Cancer, 1976. **17**(1): p. 62-70.
178. Shapiro, D.L., L.L. Nardone, S.A. Rooney, E.K. Motoyama, and J.L. Munoz, *Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 1978. **530**(2): p. 197-207.
179. Foster, K.A., C.G. Oster, M.M. Mayer, M.L. Avery, and K.L. Audus, *Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism*. Exp Cell Res, 1998. **243**(2): p. 359-66.
180. Behrens, B.C., T.C. Hamilton, H. Masuda, K.R. Grotzinger, J. Whang-Peng, K.G. Louie, T. Knutsen, W.M. McKoy, R.C. Young, and R.F. Ozols, *Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues*. Cancer Res, 1987. **47**(2): p. 414-8.
181. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565-77.

182. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. *histiocytic lymphoma*. NCI Dictionary of Cancer Terms 2015 [cited 2015 04. March]; Available from: <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=373019>.
183. Hass, R., H. Bartels, N. Topley, M. Hadam, L. Kohler, M. Goppelt-Strube, and K. Resch, *TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens*. Eur J Cell Biol, 1989. **48**(2): p. 282-93.
184. Heffelfinger, S.C., H.H. Hawkins, J. Barrish, L. Taylor, and G.J. Darlington, *SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin*. In Vitro Cell Dev Biol, 1992. **28A**(2): p. 136-42.
185. Brattain, M.G., W.D. Fine, F.M. Khaled, J. Thompson, and D.E. Brattain, *Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma*. Cancer Res, 1981. **41**(5): p. 1751-6.
186. Kaku, M., T. Nishiyama, K. Yagawa, and M. Abe, *Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma*. Gann, 1980. **71**(5): p. 596-601.
187. Iguchi, H., I. Hayashi, and A. Kono, *A somatostatin-secreting cell line established from a human pancreatic islet cell carcinoma (somatostatinoma): release experiment and immunohistochemical study*. Cancer Res, 1990. **50**(12): p. 3691-3.
188. Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker, and C.R. Minick, *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
189. Berridge, M.V., A.S. Tan, K.D. McCoy, and R. Wang, *The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts*. Biochemica, 1996. **4**: p. 14-19.
190. Sebaugh, J.L., *Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation*. Pharm Stat, 2011. **10**(2): p. 128-34.
191. Khandare, J.J., S. Jayant, A. Singh, P. Chandna, Y. Wang, N. Vorsa, and T. Minko, *Dendrimer versus linear conjugate: Influence of polymeric architecture on the delivery and anticancer effect of paclitaxel*. Bioconjug Chem, 2006. **17**(6): p. 1464-72.
192. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
193. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.
194. Bernas, T. and J. Dobrucki, *Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes*. Cytometry, 2002. **47**(4): p. 236-42.
195. Nowak, C., *Protokoll zum Versuch: Test Substance NM-8001 (Mivenion GmbH): Therapy of human lung carcinoma A549 s.c.*, C. Nowak, Editor 03.12.2008, EPO Experimentelle Pharmakologie & Onkologie GmbH; Robert-Rössle-Str. 10, 13122 Berlin.
196. Gerdes, J., U. Schwab, H. Lemke, and H. Stein, *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. Int J Cancer, 1983. **31**(1): p. 13-20.
197. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** (Pt 1): p. 1-16.
198. Sridharan, G. and A.A. Shankar, *Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(2): p. 251-5.
199. Würfel, P., P. Welker, K. Licha, D. Mangoldt, F. Serowka, and M. Schirner. *Poster: Dendritisches Polyglycerolsulfat als Drug-Delivery-System in der Tumorchemotherapie*. in 4. Berliner Posterkongress „Wissenschaftliches Arbeiten im Reformstudiengang Medizin“. 2013. Berlin (Germany).
200. Aesch, E., S. Büchl-Zimmermann, A. Burmester, S. Dänhardt-Pfeiffer, C. Desel, C. Hamers, G. Jach, M. Kässens, J. Makovitzky, M. Mulisch, B. Nixdorf-Bergweiler, D. Pütz, B. Riedelsheimer, F. Boom, R. Wegerhoff, and U. Welsch, *Färbungen*, in *Romeis Mikroskopische Technik*, M. Mulisch and U. Welsch, Editors. 2010, Spektrum: Heidelberg. p. 181-297.
201. Sousa-Herves, A., P. Welker, P. Würfel, K. Licha, J. Khandare, M. Calderón, and R. Haag. *Oral Communication: Multifunctional dendritic polyglycerol as a novel platform for paclitaxel delivery*. in VI. Mediterranean Organic Chemistry Meeting-REQOMED. 2013. Granada (Spain).
202. Angeloni, L., G. Smulevich, and M.P. Marzocchi, *Absorption, fluorescence and resonance Raman spectra of adriamycin and its complex with DNA*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1982. **38**(2): p. 213-217.
203. Shankey, T.V., P.S. Rabinovitch, B. Bagwell, K.D. Bauer, R.E. Duque, D.W. Hedley, B.H. Mayall, L. Wheelless, and C. Cox, *Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry*. Cytometry, 1993. **14**(5): p. 472-7.
204. Sousa-Herves, A., P. Welker, P. Würfel, K. Licha, J. Khandare, M. Calderón, and R. Haag. *Poster: Novel conjugates from multifunctional polyglycerol sulfate and paclitaxel*. in 8th International Dendrimer Symposium. 2013. Madrid (Spain).

205. Sousa-Herves, A., P. Welker, P. Würfel, K. Licha, J. Khandare, M. Calderón, and R. Haag. *Poster: Multifunctional dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery*. in *Xth SPLC-CRS Conference on Controlled Release*. 2013. Valencia (Spain).
206. Kelland, L.R., *Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(6): p. 827-36.
207. Pradeep, C.R., E.S. Sunila, and G. Kuttan, *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies*. *Integr Cancer Ther*, 2005. **4**(4): p. 315-21.
208. Amini, A., S. Masoumi Moghaddam, D.L. Morris, and M.H. Pourgholami, *The critical role of vascular endothelial growth factor in tumor angiogenesis*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012. **12**(1): p. 23-43.
209. Nakamura, T., K. Matsumoto, A. Kiritoshi, Y. Tano, and T. Nakamura, *Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions*. *Cancer Res*, 1997. **57**(15): p. 3305-13.
210. Connolly, E.C., J. Freimuth, and R.J. Akhurst, *Complexities of TGF-beta targeted cancer therapy*. *Int J Biol Sci*, 2012. **8**(7): p. 964-78.
211. Kasai, H., J.T. Allen, R.M. Mason, T. Kamimura, and Z. Zhang, *TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)*. *Respir Res*, 2005. **6**: p. 56.
212. Zhang, H.J., H.Y. Wang, H.T. Zhang, J.M. Su, J. Zhu, H.B. Wang, W.Y. Zhou, H. Zhang, M.C. Zhao, L. Zhang, and X.F. Chen, *Transforming growth factor-beta1 promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition*. *Mol Cell Biochem*, 2011. **355**(1-2): p. 309-14.
213. Chen, X.F., H.J. Zhang, H.B. Wang, J. Zhu, W.Y. Zhou, H. Zhang, M.C. Zhao, J.M. Su, W. Gao, L. Zhang, K. Fei, H.T. Zhang, and H.Y. Wang, *Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways*. *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(4): p. 3549-56.
214. Pertovaara, L., A. Kaipainen, T. Mustonen, A. Orpana, N. Ferrara, O. Saksela, and K. Alitalo, *Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6271-4.
215. Reichert, S., P. Welker, M. Calderon, J. Khandare, D. Mangoldt, K. Licha, R.K. Kainthan, D.E. Brooks, and R. Haag, *Size-dependant cellular uptake of dendritic polyglycerol*. *Small*, 2011. **7**(6): p. 820-9.
216. Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi, *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
217. Schumacher, K., W. Haensch, C. Roefzaad, and P.M. Schlag, *Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas*. *Cancer Res*, 2001. **61**(10): p. 3932-6.
218. Stevenson, J.L., A. Varki, and L. Borsig, *Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects*. *Thromb Res*, 2007. **120 Suppl 2**: p. S107-11.
219. Mathieu, A., M. Rimmelink, N. D'Haene, S. Penant, J.F. Gaussin, R. Van Ginckel, F. Darro, R. Kiss, and I. Salmon, *Development of a chemoresistant orthotopic human nonsmall cell lung carcinoma model in nude mice: analyses of tumor heterogeneity in relation to the immunohistochemical levels of expression of cyclooxygenase-2, ornithine decarboxylase, lung-related resistance protein, prostaglandin E synthetase, and glutathione-S-transferase-alpha (GST)-alpha, GST-mu, and GST-pi*. *Cancer*, 2004. **101**(8): p. 1908-18.
220. Kuo, T.H., T. Kubota, M. Watanabe, T. Furukawa, S. Kase, H. Tanino, Y. Saikawa, K. Ishibiki, M. Kitajima, and R.M. Hoffman, *Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data*. *Anticancer Res*, 1993. **13**(3): p. 627-30.
221. Fidler, I.J., *Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture*. *Cancer Res*, 1990. **50**(19): p. 6130-8.
222. Bullwinkel, J., B. Baron-Luhr, A. Ludemann, C. Wohlenberg, J. Gerdes, and T. Scholzen, *Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells*. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(3): p. 624-35.
223. Walker, R.A., *Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I*. *Histopathology*, 2006. **49**(4): p. 406-10.
224. Taylor, C.R. and R.M. Levenson, *Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II*. *Histopathology*, 2006. **49**(4): p. 411-24.
225. Cheng, Y.J., C.H. Lee, Y.P. Lin, J.Y. Huang, C.C. Su, W.T. Chang, and B.C. Yang, *Caspase-3 enhances lung metastasis and cell migration in a protease-independent mechanism through the ERK pathway*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(6): p. 1278-85.

226. Huang, Q., F. Li, X. Liu, W. Li, W. Shi, F.F. Liu, B. O'Sullivan, Z. He, Y. Peng, A.C. Tan, L. Zhou, J. Shen, G. Han, X.J. Wang, J. Thorburn, A. Thorburn, A. Jimeno, D. Raben, J.S. Bedford, and C.Y. Li, *Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy*. Nat Med, 2011. **17**(7): p. 860-6.
227. Donato, A.L., Q. Huang, X. Liu, F. Li, M.A. Zimmerman, and C.Y. Li, *Caspase 3 promotes surviving melanoma tumor cell growth after cytotoxic therapy*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(6): p. 1686-92.
228. Chen, W., Z. Li, L. Bai, and Y. Lin, *NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 1172-85.
229. He, H.N., X. Wang, X.L. Zheng, H. Sun, X.W. Shi, Y.J. Zhong, B. Huang, L. Yang, J.K. Li, L.C. Liao, L. Zhang, L.N. Hu, and Y. Lin, *Concurrent blockade of the NF-kappaB and Akt pathways potently sensitizes cancer cells to chemotherapeutic-induced cytotoxicity*. Cancer Lett, 2010. **295**(1): p. 38-43.
230. Keller, R., M.W. Hess, and J.F. Riley, *Mast cells in the skin of normal, hairless and athymic mice*. Experientia, 1976. **32**(2): p. 171-2.
231. Ghannadan, M., M. Baghestanian, F. Wimazal, M. Eisenmenger, D. Latal, G. Kargul, S. Walchshofer, C. Sillaber, K. Lechner, and P. Valent, *Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(4): p. 689-95.
232. Hayat, M.A., *Staining and Related Agents - Alcian Blue*, in *Stains and cytochemical methods*, M.A. Hayat, Editor. 1993, Plenum Press: New York u.a. p. 80-88.
233. Christensen, B. and R. Lullmann-Rauch, *On the alcianophilia of the drug suramin used as a tool for inducing experimental mucopolysaccharidosis*. Histochemistry, 1988. **89**(4): p. 365-7.
234. Woods, A., G. Wang, and F. Beier, *RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11626-34.
235. Björnsson, S., *Simultaneous preparation and quantitation of proteoglycans by precipitation with alcian blue*. Anal Biochem, 1993. **210**(2): p. 282-91.
236. Jain, R.K., *Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors*. Cancer Res, 1990. **50**(3 Suppl): p. 814s-819s.
237. Campling, B.G., J. Pym, H.M. Baker, S.P. Cole, and Y.M. Lam, *Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay*. Br J Cancer, 1991. **63**(1): p. 75-83.
238. Heuser, M., M. Kopun, W. Rittgen, and C. Granzow, *Cytotoxicity determination without photochemical artifacts*. Cancer Lett, 2005. **223**(1): p. 57-66.
239. Cole, S.P., *Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay*. Cancer Chemother Pharmacol, 1986. **17**(3): p. 259-63.
240. Reinecke, P., T. Kalinski, C. Mahotka, M. Schmitz, M. Dejosez, H.E. Gabbert, and C.D. Gerharz, *Paclitaxel/Taxol sensitivity in human renal cell carcinoma is not determined by the p53 status*. Cancer Lett, 2005. **222**(2): p. 165-71.
241. Bai, Z., Z. Zhang, X. Qu, W. Han, and X. Ma, *Sensitization of breast cancer cells to taxol by inhibition of taxol resistance gene 1*. Oncol Lett, 2012. **3**(1): p. 135-140.
242. Zhang, K., H. Song, P. Yang, X. Dai, Y. Li, L. Wang, J. Du, K. Pan, and T. Zhang, *Silencing dishevelled-1 sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells via AKT/GSK-3beta/beta-catenin signalling*. Cell Prolif, 2015. **48**(2): p. 249-58.
243. Ulukaya, E., F. Ozdikicioglu, A.Y. Oral, and M. Demirci, *The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested*. Toxicol In Vitro, 2008. **22**(1): p. 232-9.
244. Ulukaya, E., M. Colakogullari, and E.J. Wood, *Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay*. Chemotherapy, 2004. **50**(1): p. 43-50.
245. Faessel, H.M., L.M. Levasseur, H.K. Slocum, and W.R. Greco, *Parabolic growth patterns in 96-well plate cell growth experiments*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(5): p. 270-8.
246. Safavy, A., J.A. Bonner, H.W. Waksal, D.J. Buchsbaum, G.Y. Gillespie, M.B. Khazaeli, R. Arani, D.T. Chen, M. Carpenter, and K.P. Raisch, *Synthesis and biological evaluation of paclitaxel-C225 conjugate as a model for targeted drug delivery*. Bioconjug Chem, 2003. **14**(2): p. 302-10.
247. Calderon, M., R. Graeser, F. Kratz, and R. Haag, *Development of enzymatically cleavable prodrugs derived from dendritic polyglycerol*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(14): p. 3725-8.
248. Turner, R.J. and S.J. Charlton, *Assessing the minimum number of data points required for accurate IC50 determination*. Assay Drug Dev Technol, 2005. **3**(5): p. 525-31.
249. Yamori, T., S. Sato, H. Chikazawa, and T. Kadota, *Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts*. Jpn J Cancer Res, 1997. **88**(12): p. 1205-10.
250. Padar, S., C. van Breemen, D.W. Thomas, J.A. Uchizono, J.C. Livesey, and R. Rahimian, *Differential regulation of calcium homeostasis in adenocarcinoma cell line A549 and its Taxol-resistant subclone*. Br J Pharmacol, 2004. **142**(2): p. 305-16.

251. Gill, K.K., A. Kaddoumi, and S. Nazzal, *Mixed micelles of PEG(2000)-DSPE and vitamin-E TPGS for concurrent delivery of paclitaxel and parthenolide: enhanced chemosensitization and antitumor efficacy against non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines*. Eur J Pharm Sci, 2012. **46**(1-2): p. 64-71.
252. Wang, H., H. Li, M. Zuo, Y. Zhang, H. Liu, W. Fang, and X. Chen, *Lx2-32c, a novel taxane and its antitumor activities in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 2008. **268**(1): p. 89-97.
253. Ojima, I., J.C. Slater, E. Michaud, S.D. Kuduk, P.Y. Bounaud, P. Vrignaud, M.C. Bissery, J.M. Veith, P. Pera, and R.J. Bernacki, *Syntheses and structure-activity relationships of the second-generation antitumor taxoids: exceptional activity against drug-resistant cancer cells*. J Med Chem, 1996. **39**(20): p. 3889-96.
254. Ojima, I., X. Geng, X. Wu, C. Qu, C.P. Borella, H. Xie, S.D. Wilhelm, B.A. Leece, L.M. Bartle, V.S. Goldmacher, and R.V. Chari, *Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates*. J Med Chem, 2002. **45**(26): p. 5620-3.
255. Owonikoko, T.K., S.S. Ramalingam, B. Kanterewicz, T.E. Balias, C.P. Belani, and P.A. Hershberger, *Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small-cell lung cancer cells*. Int J Cancer, 2010. **126**(3): p. 743-55.
256. Miyata, R., M. Ueda, H. Jinno, T. Konno, K. Ishihara, N. Ando, and Y. Kitagawa, *Selective targeting by preS1 domain of hepatitis B surface antigen conjugated with phosphorylcholine-based amphiphilic block copolymer micelles as a biocompatible, drug delivery carrier for treatment of human hepatocellular carcinoma with paclitaxel*. Int J Cancer, 2009. **124**(10): p. 2460-7.
257. Lichtner, R.B., A. Rotgeri, T. Bunte, B. Buchmann, J. Hoffmann, W. Schwede, W. Skuballa, and U. Klar, *Subcellular distribution of epothilones in human tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11743-8.
258. Sain, N., B. Krishnan, M.G. Ormerod, A. De Rienzo, W.M. Liu, S.B. Kaye, P. Workman, and A.L. Jackman, *Potentiation of paclitaxel activity by the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated AKT*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(5): p. 1197-208.
259. Rypa, C., H. Mann-Steinberg, M.L. Biniossek, R. Satchi-Fainaro, and F. Kratz, *In vitro and in vivo evaluation of a paclitaxel conjugate with the divalent peptide E-[c(RGDfK)2] that targets integrin alpha v beta 3*. Int J Pharm, 2009. **368**(1-2): p. 89-97.
260. Pasquier, E., M. Carre, B. Pourroy, L. Camoin, O. Rebai, C. Briand, and D. Braguer, *Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(10): p. 1301-10.
261. Naumova, E., P. Ubezio, A. Garofalo, P. Borsotti, L. Cassis, E. Riccardi, E. Scanziani, S.A. Eccles, M.R. Bani, and R. Giavazzi, *The vascular targeting property of paclitaxel is enhanced by SU6668, a receptor tyrosine kinase inhibitor, causing apoptosis of endothelial cells and inhibition of angiogenesis*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1839-49.
262. Sharma, S., C. Lagisetti, B. Poliks, R.M. Coates, D.G. Kingston, and S. Bane, *Dissecting paclitaxel-microtubule association: quantitative assessment of the 2'-OH group*. Biochemistry, 2013. **52**(13): p. 2328-36.
263. Kuh, H.J., S.H. Jang, M.G. Wientjes, and J.L. Au, *Computational model of intracellular pharmacokinetics of paclitaxel*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(3): p. 761-70.
264. Jang, S.H., M.G. Wientjes, and J.L. Au, *Determinants of paclitaxel uptake, accumulation and retention in solid tumors*. Invest New Drugs, 2001. **19**(2): p. 113-23.
265. Palkar, P.S., M.G. Borland, S. Naruhn, C.H. Ferry, C. Lee, U.H. Sk, A.K. Sharma, S. Amin, I.A. Murray, C.R. Anderson, G.H. Perdew, F.J. Gonzalez, R. Muller, and J.M. Peters, *Cellular and pharmacological selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta antagonist GSK3787*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(3): p. 419-30.
266. Jang, S.H., M.G. Wientjes, and J.L. Au, *Kinetics of P-glycoprotein-mediated efflux of paclitaxel*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 1236-42.
267. Schinkel, A.H. and J.W. Jonker, *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(1): p. 3-29.
268. International Transporter, C., K.M. Giacomini, S.M. Huang, D.J. Tweedie, L.Z. Benet, K.L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K.M. Hillgren, K.A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R.B. Kim, C.A. Lee, M. Niemi, J.W. Polli, Y. Sugiyama, P.W. Swaan, J.A. Ware, S.H. Wright, S.W. Yee, M.J. Zamek-Gliszczynski, and L. Zhang, *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
269. Torres, K. and S.B. Horwitz, *Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3620-6.
270. Licha, K., *persönliche Mitteilung*, 2013.
271. Mellado, W., N.F. Magri, D.G. Kingston, R. Garcia-Arenas, G.A. Orr, and S.B. Horwitz, *Preparation and biological activity of taxol acetates*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **124**(2): p. 329-36.

VI. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

VI.I. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Patrick Würfel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Dendritische Polyglycerolsulfate in der Tumorchemotherapie“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den 17.04.2015

Patrick Würfel

VI.II. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Patrick Würfel hatte folgenden Anteil an den genannten Publikationen:

Publikation 1:

Sousa-Herves, A.†; Würfel, P.†; Wegner, N.; Khandare, J.; Licha, K.; Haag, R.; Welker, P.; Calderón, M. “Dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery: pitfalls of ester linkage”. *Nanoscale*, 2015 Feb 19;7(9):3923–32. DOI: 10.1039/c4nr04428b.

† **Beide Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.**

Anteilserklärung:

Konzeption, Durchführung und Auswertung der Experimente zur Kinetik der zellulären Aufnahme und Elimination (Durchflusszytometrie), zu den *in vitro* Zytotoxizitätsexperimenten bei A431- und A549-Zellen und zur immunhistochemischen Darstellung des Tubulins (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie). Anteilige Beiträge zum schriftlichen Manuskript und zu dessen Kontrolle.

Publikation 2:

Würfel, P.; Welker, P.; Licha, K.; Mangoldt, D.; Serowka, F.; Schirner, M.

„Dendritisches Polyglycerolsulfat als Drug-Delivery-System in der Tumorchemotherapie“.

4. Berliner Posterkongress „Wissenschaftliches Arbeiten im Reformstudiengang Medizin“, 2013.

Anteilserklärung:

Konzeption, Durchführung und Auswertung der histologischen Darstellung der Akkumulation von dPGS um Lungenkarzinome *in vivo* (Alcianblau-Färbung) und der Experimente zur Kinetik der zellulären Aufnahme (Durchflusszytometrie). Erstellung des Posters und Präsentation.

Publikation 3:

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; Würfel, P.; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Multifunctional dendritic polyglycerol as a novel platform for paclitaxel delivery“.

Vortrag durch Sousa Hervés, A.

VI. Mediterranean Organic Chemistry Meeting-REQOMED, 2013.

Anteilserklärung:

Konzeption, Durchführung und Auswertung von Experimenten zur Aufnahme von dPGS-PTX (= dPGSamin-PTX-(6)-ICC; Fluoreszenzmikroskopie) und zur zytotoxischen Wirkung in Tumorzellen (immunhistochemische Darstellung des Tubulins; konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie).

Publikation 4:

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Novel conjugates from multifunctional polyglycerol sulfate and paclitaxel”.

Poster von Sousa Hervés, A.

8th International Dendrimer Symposium, 2013.

Anteilserklärung:

Konzeption, Durchführung und Auswertung von Experimenten zur immunhistochemischen Darstellung des Tubulins (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie).

Publikation 5:

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Multifunctional dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery”.

Poster von Sousa Hervés, A.

Xth SPLC-CRS Conference on Controlled Release, 2013.

Anteilserklärung:

Konzeption, Durchführung und Auswertung von Experimenten zur immunhistochemischen Darstellung des Tubulins (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie).

Berlin, den 17.04.2015

PD. Dr. rer. nat. Pia Welker

(Stempel)

Berlin, den 17.04.2015

Patrick Würfel

VII. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VIII. Publikationsliste

Sousa-Herves, A.†; **Würfel, P.†**; Wegner, N.; Khandare, J.; Licha, K.; Haag, R.; Welker, P.; Calderón, M.

„Dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery: pitfalls of ester linkage”.

Nanoscale, 2015 Feb 19;7(9):3923–32. DOI: 10.1039/c4nr04428b.

† **Beide Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.**

Würfel, P.; Welker, P.; Licha, K.; Mangoldt, D.; Serowka, F.; Schirner, M.

„Dendritisches Polyglycerolsulfat als Drug-Delivery-System in der Tumorchemotherapie“.

4. Berliner Posterkongress „Wissenschaftliches Arbeiten im Reformstudiengang Medizin“, 2013.

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Multifunctional dendritic polyglycerol as a novel platform for paclitaxel delivery”.

Vortrag durch Sousa Hervés, A.

VI. Mediterranean Organic Chemistry Meeting-REQOMED, 2013.

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Novel conjugates from multifunctional polyglycerol sulfate and paclitaxel”.

Poster von Sousa Hervés, A.

8th International Dendrimer Symposium, 2013.

Sousa-Herves, A.; Welker, P.; **Würfel, P.**; Licha, K.; Khandare, J.; Calderón, M.; Haag, R.

„Multifunctional dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery”.

Poster von Sousa Hervés, A.

Xth SPLC-CRS Conference on Controlled Release, 2013.

IX. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Pia Welker für ihre langjährige und stets sehr gute Betreuung, die gemeinsamen Diskussionen über diese Arbeit sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ich bedanke mich für die vielen Möglichkeiten, die mir durch ihre Betreuung und Lehre sowie die fortwährende Unterstützung ermöglicht wurden.

Ein vielfacher Dank ist an Frauke Serowka und Dipl.-Biol. Dorothea Mangoldt gerichtet. Ich danke insbesondere für ihre Mühen, mir die vielfältigen Arbeitsweisen der Zellkultur, der Herstellung mikroskopischer Präparate und der Durchflusszytometrie beizubringen. Zusätzlich möchte ich Frau Dipl.-Biol. Mangoldt für die zahlreichen gemeinsamen Gespräche zur Durchflusszytometrie danken. Frau Dr. Welker, Frau Serowka und Frau Mangoldt sei gleichermaßen für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre im Labor gedankt.

Herrn PD Dr. Kai Licha möchte ich an dieser Stelle für die hilfreichen Diskussionen und die Beantwortung meiner Fragen vielmals danken. Neben den vorerwähnten Personen danke ich herzlich Frau Dr. Ana Sousa Hervés für ihre Unterstützung, Hilfe und die gute Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikation. Für diese sei auch Prof. Marcelo Calderón gedankt.

Gleichzeitig gilt mein Dank auch Herrn Dr. Malte Bahner und Herrn Dr. Michael Schirner für die Möglichkeit, in ihren Laboren tätig sein zu dürfen.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Thomas Kahl und Frau Aljona Borschewski für die Einführung in die Methodik der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie sowie Dipl.-Chem.-Ing. Sven Guhl für die technische Hilfe bei der Fluoreszenz-Analyse danken. Für die Auskunft zu meinen statistischen Fragen danke ich Herrn Dipl.-Math. oec. Traugott Wierer.

Für das Korrektorat dieser Arbeit sei Frau Dr. Antje Kronenberg, Herrn Dr. Niels C. Lösch und meinem Vater Dr. Volkmar Würfel herzlich gedankt.

Ich danke besonders meinen Eltern und Großeltern, die mich im Studium der Medizin und während der Dissertation beständig unterstützt haben. Gleichzeitig geht ein vielfacher Dank auch an meine engsten Freunde, die mir in den letzten Jahren bei der Erstellung dieser Arbeit motivierend zur Seite standen.

Vielen Dank.